



# **Fractionnement d'un hydrolysat de protéines de saumon par électrodialyse avec empilement de membranes d'ultrafiltration afin de concentrer, isoler et identifier des peptides glucorégulateurs.**

**Thèse**

**Loïc Henaux**

**Doctorat en sciences et technologie des aliments**  
**Philosophiæ doctor (Ph. D.)**

Québec, Canada

**Fractionnement d'un hydrolysat de  
protéines de saumon par électrodialyse  
avec empilement de membranes  
d'ultrafiltration afin de concentrer,  
isoler et identifier des peptides  
glucorégulateurs.**

**Thèse  
Loïc Henaux**

Sous la direction de :  
Laurent Bazinet, directeur de recherche  
André Marette, codirecteur de recherche

## Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est un trouble multifactoriel complexe de l'homéostasie du glucose. Cette maladie, bien qu'elle possède une composante génétique, est principalement induite par des causes socio-environnementales comme de mauvaises habitudes alimentaires. En dépit des mesures hygiéno-diététiques et des traitements médicaux utilisés pour prévenir et traiter la maladie, le DT2 ne cesse de progresser. L'identification et la production de peptides bioactifs à partir de sources naturelles offrent une alternative intéressante aux médicaments de synthèse, dont les préoccupations concernant les effets secondaires ne cessent d'augmenter. Ainsi, en raison de leur abondance et leur richesse en molécule bioactive, les coproduits de la transformation du poisson offrent une source presque inépuisable de peptides bioactifs. En effet, lors d'études précédentes, il a été démontré que des protéines de morue et de saumon permettaient d'améliorer la santé cardio-métabolique *in vivo*, et d'améliorer la captation du glucose musculaire, de diminuer la production du glucose hépatique et l'inflammation. De plus, avec un nombre de plus en plus important d'individus à nourrir, l'industrie de la transformation doit augmenter sa production, et les déchets ne cessent de s'accumuler. Néanmoins, afin d'exercer leur effet bioactif, il est nécessaire de libérer ces peptides bioactifs des structures protéiques au sein desquelles ils sont imbriqués et sous forme inactive générant ainsi des hydrolysats complexes. Par la suite, une ou plusieurs étapes de séparation sont utilisées afin de concentrer ces peptides dans des fractions plus actives, par exemple en fractionnant ces hydrolysats complexes par électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration. En effet, Il a été démontré l'efficacité de l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration pour la génération de fractions améliorant, *in vitro*, la captation du glucose à partir d'hydrolysats de protéines de soya et de saumon. Ainsi, l'objectif principal de cette thèse était de concentrer et d'identifier des peptides bioactifs par le fractionnement d'un hydrolysat de protéines issu d'un coproduit de saumon.

par l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration, et d'étudier l'impact de ces fractions et peptides sur le DT2.

Lors de la première étude, il a été démontré qu'un empilement judicieux de membranes permettait de fractionner les peptides issus d'un hydrolysat de coproduit de saumon, en générant des fractions possédant des peptides avec des propriétés physico-chimiques (charge et masse) différentes. De plus, cet empilement de trois membranes d'ultrafiltration de seuils de coupure différents a permis de moduler la réponse *in vitro* de la captation du glucose. En effet, des peptides cationiques de plus haut poids moléculaire ont amélioré la captation du glucose dans une étude *in vitro*, alors que les peptides cationiques de plus faible poids moléculaire ont démontré un effet inhibiteur de la bioactivité. Finalement, l'analyse par spectrométrie de masse des fractions a permis de caractériser (temps de rétention et charge) 17 peptides cationiques et 21 peptides anioniques, potentiellement responsables de l'effet bioactif des fractions.

Lors de la deuxième étude, le fractionnement par EDUF des fractions finales récupérées lors de la précédente séparation et l'étude *in vitro* de la bioactivité de ces fractions (captation du glucose, production du glucose hépatique et inflammation) ont permis d'identifier deux fractions très prometteuses, démontrant un effet sur ces trois bioactivités. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem de ces fractions a permis d'identifier, à l'aide de base de données, la séquence peptidique de 24 peptides anioniques, potentiellement responsables de ces effets bioactifs.

Finalement, lors de la troisième étude, basées sur l'analyse des spectres obtenus par spectrométrie de masse en tandem, 13 peptides ont été sélectionnés et synthétisés, puis testés individuellement pour leurs capacités à augmenter l'absorption du glucose au niveau de cellules musculaires, à diminuer la production de glucose hépatique et finalement à diminuer la réponse inflammatoire de macrophages. Ainsi, pour la première fois, quatre nouveaux peptides ont été identifiés à partir de coproduits de saumon, et leurs propriétés glucorégulatrices *in vitro* ont été démontrées.

# Abstract

Type 2 diabetes (T2DM) is a complex multifactorial disorder of glucose homeostasis. This disease has a genetic basis but is mainly caused by socio-environmental behaviours, such as overeating and a lack of physical activity. Despite dietary measures and medical treatments used to prevent and treat the disease, T2D continues to progress. The identification and production of bioactive peptides from natural sources offer an interesting alternative to synthetic drugs, whose concerns about side effects are constantly increasing. Thus, because of their abundance and richness in bioactive molecules, fish processing co-products offer an almost inexhaustible source of bioactive peptides. Indeed, in previous studies, cod and salmon proteins have been shown to improve cardio-metabolic health in *in vivo* studies, and to improve muscle glucose uptake, decrease hepatic glucose production, and inflammation. In addition, with a growing number of people to feed, the processing industry is at its height, and waste continues to accumulate. Nevertheless, in order to exert their bioactive effect, it is necessary to release these bioactive peptides from native proteins. Subsequently, one or more separation, using for example electrodialysis with ultrafiltration membranes, are needed to concentrate these peptides and generate bioactive fractions. Indeed, it was previously demonstrated the effectiveness of electrodialysis with ultrafiltration membranes to generate bioactive fractions, from complex matrices, able to improve the glucose uptake *in vitro*, from soy and salmon protein hydrolysates. In this context, the main objective of this thesis was to concentrate and identify bioactive peptides, by fractionating a protein hydrolysate from a salmon co-product, by electrodialysis with ultrafiltration membranes, and to study the impact of these fractions and peptides on T2D.

In the first study, results demonstrated that a triple size selective separation by EDUF allowed to generate peptide fractions with different physicochemical properties (charge and mass). Moreover, it was demonstrated that such a separation allowed to modulate the *in vitro* response of the fractions for glucose metabolism. Indeed, from a single EDUF separation, cationic peptides with higher molecular weights were concentrated and demonstrated to enhance their glucose uptake capacity. Whereas, cationic peptides with lower molecular weights have decreased the glucose uptake capacity. In addition, analyses by mass spectrometry of the

fractions allowed to characterize (retention time and charge) 17 cationic peptides and 21 anionic peptides, potentially responsible for the bioactive effect of the fractions.

In a second study, a second EDUF fractionation, using as feed solution the final fractions recovered during the previous separation was performed. The selectivity of the process was confirmed by liquid chromatography-mass spectrometry analyses. Moreover, *in vitro* study of the bioactivities (glucose uptake, hepatic glucose production and inflammation) effect of these fractions, led to the identification of two very promising fractions, demonstrating a simultaneous effect on all three bioactivities tested. In addition, the tandem mass spectrometry analysis of these fractions allowed the sequence identification of 24 anionic peptides, potentially responsible for these bioactive effects.

Finally, in a third study, based on the analysis of the spectra obtained by tandem mass spectrometry, 13 peptides were selected and synthesized, then individually tested for their ability to increase glucose uptake in muscle cells, to reduce glucose production by hepatic cells, and to decrease the inflammatory response of macrophages. Thus, for the first time, four new peptides identified from salmon by-products, demonstrated *in vitro* glucoregulatory properties.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract.....	v
Table des matières .....	vii
Liste des figures, tableaux, illustrations .....	xii
Liste des abréviations, sigles, acronymes .....	xv
Remerciements .....	xix
Avant-propos.....	xxi
Introduction .....	24
1. Synthèse bibliographique.....	28
1.1. Le contrôle de la glycémie par l'insuline .....	28
1.1.1. Généralités .....	28
1.1.2. L'insuline .....	28
1.1.2.1. Structure, biosynthèse .....	29
1.1.2.2. Sécrétion de l'insuline .....	30
1.1.2.3. Mode d'action de l'insuline .....	31
1.2. Le diabète de type 2.....	35
1.2.1. Définition.....	35
1.2.2. La pathophysiologie du Diabète de Type 2.....	36
1.2.3. L'obésité, l'inflammation et la résistance à l'insuline. ....	37
1.2.3.1. Le tissu adipeux.....	37
1.2.3.2. L'obésité, un état pro-inflammatoire .....	38
1.2.3.3. L'inflammation et la résistance à l'insuline. ....	38
1.2.4. L'insulinorésistance au niveau du foie et des muscles squelettiques.....	40
1.2.5. Le dysfonctionnement des cellules $\beta$ dans la sécrétion d'insuline.....	42
1.2.6. Traitement du diabète de type 2.....	43
1.3. Les coproduits de poissons et leur valorisation. ....	46
1.3.1. État des lieux.....	46
1.3.2. Les coproduits de l'industrie de transformation du poisson.....	46
1.3.3. Valorisation des protéines de poisson.....	47
1.3.3.1. Composition protéique des muscles de poisson. ....	47
1.3.3.2. Effets de protéines et hydrolysats protéiques de poissons contre le DT2.....	49
1.3.3.3. Effets d'hydrolysats protéiques de saumons contre le DT2 .....	51
1.4. Production de peptides bioactifs.....	52

1.4.1.	Production d'un hydrolysat protéique de coproduits alimentaires .....	53
1.4.1.1.	Hydrolyse chimique : .....	53
1.4.1.2.	Fermentation microbienne.....	53
1.4.1.3.	Hydrolyse enzymatique :.....	54
1.4.2.	Le fractionnement de l'hydrolysat .....	57
1.4.2.1.	Les procédés chromatographiques .....	58
1.4.2.2.	Les procédés membranaires .....	59
1.4.2.2.1.	Séparation par les procédés baromembranaires.....	59
1.4.2.2.2.	Séparation par les procédés électro-baromembranaires.....	62
1.4.2.2.3.	Séparation par électrodialyse avec membrane de filtration .....	63
1.4.2.2.3.1.	Principes de l'électrodialyse conventionnelle .....	63
1.4.2.2.3.2.	Principes de l'électrodialyse avec membranes de filtration (EDMF).....	65
1.4.3.	L'identification de peptides bioactifs.....	71
1.4.3.1.	La spectrométrie de masse. ....	71
1.4.3.1.1.	La source d'ionisation .....	71
1.4.3.1.2.	Les analyseurs de masse.....	73
1.4.3.2.	La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	76
1.4.3.3.	Fragmentation des ions.....	76
1.4.3.4.	La recherche dans des bases de données. ....	77
1.4.3.5.	Le séquençage de <i>novo</i> .....	78
<b>2.</b>	<b>Problématique, hypothèse et objectifs de recherche .....</b>	<b>83</b>
2.1.	Problématique.....	83
2.2.	Hypothèse.....	84
2.3.	Objectifs de recherche .....	84
<b>3.</b>	<b>How Triple Size-Selective Membrane Separation of Peptides from Salmon Protein Hydrolysate Orientate their Biological Response on Glucose Uptake .....</b>	<b>86</b>
3.1.	Résumé.....	88
3.2.	Abstract .....	89
3.3.	Introduction .....	90
3.4.	Experimental section .....	92
3.4.1.	Materials and electrodialysis cell.....	92
3.4.1.1.	Electrodialysis configurations .....	92
3.4.1.2.	Electroseparation protocol.....	94
3.4.2.	Materials and methods .....	95
3.4.2.1.	Hydrolysate preparation .....	95
3.4.2.2.	Membranes .....	95
3.4.3.	Analyses.....	96
3.4.3.1.	pH.....	96
3.4.3.2.	Relative energy consumption of the EDUF process.....	96

3.4.3.3.	Peptide concentration and Nitrogen concentration determination .....	96
3.4.3.4.	Final peptide migration rates .....	96
3.4.3.5.	RP-UPLC and mass spectrometry analyses.....	97
3.4.3.6.	Glucose uptake experiments.....	98
3.4.4.	Statistical analyses .....	98
3.5.	Results and discussion.....	99
3.5.1.	Evolution of peptide concentration and final migration rates .....	99
3.5.2.	Characterization of Peptide profile by RP-UPLC-MS .....	101
3.5.3.	Relative Energy Consumption .....	103
3.5.4.	Glucose Uptake Experiments.....	103
3.6.	Conclusions .....	109
3.7.	Acknowledgements .....	109
<b>4.</b>	<b>Simultaneous Glucoregulatory and Anti-Inflammatory activities of Peptides fractions from Salmon Protein Hydrolysate obtained following their separation by electrodialysis with ultrafiltration membrane, and peptide identification: a natural product approach against type 2 diabetes .....</b>	<b>112</b>
4.1.	Résumé .....	114
4.2.	Abstract .....	114
4.3.	Introduction .....	116
4.4.	Materials and Methods .....	117
4.4.1.	Materials and electrodialysis cell .....	117
4.4.1.1.	Hydrolysate preparation .....	117
4.4.1.2.	Chemicals .....	118
4.4.1.3.	Membranes .....	118
4.4.1.4.	Electrodialysis Configurations .....	118
4.4.1.5.	Electroseparation protocol.....	119
4.4.2.	Analyses.....	120
4.4.2.1.	Glucose Uptake Experiments .....	120
4.4.2.2.	Hepatic Glucose Production Experiments .....	121
4.4.2.3.	Anti-inflammatory Experiments.....	121
4.4.2.4.	RP-UPLC and mass spectrometry analyses.....	122
4.4.2.5.	Statistical Analyses .....	122
4.5.	Results and discussion.....	123
4.5.1.	Effect of EDUF fractions on glucose uptake. ....	123
4.5.2.	Effect of EDUF Fractions on Hepatic Glucose Production .....	125
4.5.3.	Effect of EDUF fractions on inflammation.....	126
4.5.4.	Evolution of Peptide Profile During the EDUF Separation and identification of potential bioactive peptides. ....	127
Conclusion .....	136	
4.6.	Acknowledgments .....	137
<b>5.</b>	<b>Identification of four novel glucoregulatory peptides, from salmon by-product hydrolysate....</b>	<b>139</b>

5.1.	Résumé .....	141
5.2.	Abstract .....	142
5.3.	Introduction .....	143
5.4.	Material and methods .....	144
5.4.1.1.	RP-UPLC and mass spectrometry analyses.....	144
5.4.2.	Peptide Synthesis .....	144
5.4.3.	<i>In vitro</i> experiments .....	145
5.4.3.1.	Glucose uptake experiments.....	145
5.4.3.2.	Hepatic Glucose Production Experiments.....	146
5.4.3.3.	Anti-inflammatory Experiments.....	146
5.5.	Results .....	147
5.5.1.	Identification and synthesis of potential bioactive peptides.....	147
5.5.2.	<i>In vitro</i> experiments .....	148
5.5.2.1.	Glucose uptake experiments.....	148
5.5.2.2.	Hepatic Glucose Production.....	150
5.5.2.3.	Anti-inflammatory Experiments.....	152
5.6.	Discussion .....	153
5.7.	Conclusion.....	156
5.8.	Acknowledgments .....	157
	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>159</b>
	Principaux résultats et retour sur l'hypothèse .....	159
	Contribution originale de la thèse .....	161
	Principales limites, contraintes et techniques.....	162
	Perspectives.....	163
	<b>Références.....</b>	<b>166</b>

# Liste des figures, tableaux, illustrations

## Liste des figures

### ○ Chapitre 1

Figure 1-1 Schéma de la biosynthèse de l'insuline dans les cellules $\beta$ des îlots de Langerhans. Adapté de Jones & Persaud (2016) [36].....	30
Figure 1-2. Mécanismes menant à l'excrétion par exocytose de l'insuline des les cellules $\beta$ . Tiré de Jones & Persaud, 2017 [36].....	31
Figure 1-3 Principaux effets de l'insuline dans ses trois tissus cibles (foie, muscles et tissu adipeux).Adapté de Capeau (2003) [41].....	32
Figure 1-4 Structure du récepteur de l'insuline, et les sites de fixations de l'hormone. Tiré de M. White (2016) [43]......	33
Figure 1-5 Principales voies de signalisation de l'insuline. Tiré de J. Capeau, 2003 [41]. .....	34
<i>Figure 1-6 Nombre estimé de personnes atteintes de diabète à travers le monde et par région, en 2015 et 2040 (20-79 ans). Tiré de L'Atlas du DIABÈTE de la FID Septième édition 2015 [45]</i> .....	36
Figure 1-7 Expansion du tissu adipeux durant un gain de poids et les molécules synthétisée. Adapté de Tilg and Moschen (2006) [58] IL-1 $\beta$ : Interleukine 1- $\beta$ . CCL2 : CC-chemokine ligand 2. ....	40
Figure 1-8 Mécanismes mettant en cause la surnutrition dans l'établissement de l'insulinorésistance des tissus cibles de l'insuline. Tirée de Petersen & Schulman, 2018 [35].....	41
Figure 1-9 Principales étapes pour l'identification de peptides bioactifs à partir d'un coproduit alimentaire. 53	53
Figure 1-10 Schéma d'une protéine avant l'hydrolyse enzymatique (étape 1) et après l'action des enzymes (étape 2)[115] .....	55
Figure 1-11 Différentes familles d'enzyme en fonction de leur mode d'action. ....	56
Figure 1-12 Schéma représentant les différents procédés baromembranaires, ainsi que les différentes tailles de molécules retenues par les membranes. Adapté de Suwal et al. (2015) [130].....	60
Figure 1-13 Schéma des différents mécanismes pouvant entraîner le colmatage des membranes de filtration, d'après Saxena et al., 2009 [131] .....	61
Figure 1-14 Principe de l'électro-filtration. D'après Saxena et al., 2009 [131] .....	62
Figure 1-15 : Représentation schématique d'une cellule d'ÉDC permettant la déminéralisation du lactosérum doux. La cellule d'ÉDC se compose d'un empilement de membranes échangeuses d'anions et membranes échangeuses de cations, empilées entre deux électrodes. Tiré de Lemay et al (2018) [139].....	64
Figure 1-16 Schéma représentant la récupération spécifique des peptides cationiques (gauche) et des peptides anioniques (droite) par ÉDUF. Adaptée de Poulin et al. (2006)[141] .....	65
Figure 1-17 Schéma représentant la récupération simultanée des peptides cationiques et anioniques par ÉDUF. Adaptée de Durand et al., 2019 [90].....	66
Figure 1-18 Principe de l'ionisation par le MALDI. Adaptée de Przybylski (2016) [128] .....	72
Figure 1-19 Principe de l'ionisation par ESI. Tirée de <a href="http://mass-spectro.com/electrospray">http://mass-spectro.com/electrospray</a> [164].....	73
Figure 1-20 Principe de l'analyseur quadripolaire. Avec une distance entre les deux électrodes de même tension égale à deux fois le rayon r. les électrodes possèdent un potentiel $\Phi_0$ qui est la somme d'un courant continu (U) et d'un courant alternatif (V) de haute fréquence ( $\omega$ ). Adaptée de <a href="http://mass-spectro.com/quadrupole-mass-analyzer">http://mass-spectro.com/quadrupole-mass-analyzer</a> [165] .....	74
Figure 1-21 Principe de l'analyseur TOF. Adaptée de <a href="http://mass-spectro.com/analyseur-temps-de-vol">http://mass-spectro.com/analyseur-temps-de-vol</a> [167] .....	75
Figure 1-22 Spectre d'analyse MS (a) Spectre d'analyse MS/MS (b). Adaptée de Costa et al 2011 [161] .....	75
Figure 1-23 Nomenclature standard d'un spectre de fragmentation d'un peptide. Adaptée de Liu 2015 [169]. .....	77
Figure 1-24 Schéma classique de l'identification de peptides via la recherche dans les bases de données. Adaptée de Costa et al (2011) [161] .....	78
Figure 1-25 Exemple du spectre MS/MS du peptide YSEMPPGK, identifié par séquençage de novo. Tirée de Liu et al (2015) [159] .....	80

○ **Chapitre 3**

Figure .3-1 Schematic layout showing EDUF membranes configurations (a) cationic and (b) anionic, for the fractionation of salmon protein hydrolysate (SPH). AEM: anion-exchange membrane, CEM: cation exchange membrane, UFM: ultrafiltration membrane, P <sup>+</sup> : cationic peptides; P <sup>-</sup> : anionic peptides, P <sup>+/-</sup> : neutral peptides, A <sub>rc</sub> : anionic recovery compartments and C <sub>rc</sub> : cationic recovery compartments. ....	93
Figure 3-2: <i>Evolution of peptide concentration in (a) cationic (Cationic Recovered Compartment 1, Cationic Recovered Compartment 2, Cationic Recovered Compartment 3, respectively, CRC1, CRC2, and CRC3) and (b) anionic (Anionic Recovered Compartment 1, Anionic Recovered Compartment 2, Anionic Recovered Compartment 3, respectively ARC1, ARC2, and ARC3) compartments during 6 h of the electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) process. Lowercase letters are used to compare the three recovered compartments of the same configuration where capital letters are used to compare the recovered compartments between anionic and cationic configurations. Values followed by different letters were statistically different.</i> ....	99
Figure 3-3 Profiles of peptide molecular weight in (a) USPH, C <sub>FFC</sub> , and A <sub>FFC</sub> , (b) cationic compartments (CRC1, CRC2, and CRC3) and (c) anionic compartment (ARC1, ARC2, and ARC3) generated after 6 h of the EDUF process. Means with different lowercase letters within a molecular weight range are significantly different ( $p < 0.05$ ). ....	102
Figure 3-4 Glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells in absence or presence of insulin stimulation by (a) USPH, C <sub>FFC</sub> , and A <sub>FFC</sub> , (b) cationic compartments (CRC1, CRC2, and CRC3) and (c) anionic compartments (ARC1, ARC2, and ARC3) generated after 6 h of the EDUF process. Data represent mean $\pm$ SEM, n = 9. One asterisk indicate that mean values are significantly different ( $p < 0.05$ ) than the mean value for the control. ....	105

○ **Chapitre 4**

Figure 4-1 Schematic EDUF cell a) configuration n°1 for the fractionation of C <sub>FFC</sub> (Cationic final feed compartment) and b) configuration n°2 for and the fractionation of A <sub>FFC</sub> (Anionic final feed compartment), generated from a previous work [195]. ....	119
Figure 4-2 Glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells with or without insulin stimulation by a) the recovery compartments from EDUF configuration 1 and b) the recovery compartments from EDUF configuration 2. Data represent mean $\pm$ SEM, n = 9. An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value. ....	125
Figure 4-3. In-vitro hepatic production from FAO cells with or without insulin inhibition, by a) the recovery compartments from EDUF configuration 1 and b) the recovery compartments from EDUF configuration 2. Data represent mean $\pm$ SEM, n = 6. An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value.....	126
Figure 4-4. Inflammatory activity on J774 macrophages in absence or presence of LPS stimulation by a) the recovery compartments from EDUF configuration 1 and b) the recovery compartments from EDUF configuration 2. Data represent mean $\pm$ SEM, n = 6. An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's (+LPS) mean value.....	127
Figure 4-5.a Overlaid RP-HPLC profiles of the three EDUF fractions separated by EDUF configuration 1 and a zoom in retention time between (I) 2 and 15 minutes, (II) 15 and 30 minutes, (III) 30 and 50 minutes. ....	129
Figure 4-6.b Overlaid RP-HPLC profiles of the three EDUF fractions separated by EDUF configuration 2, and a zoom in retention time between (I) 2 and 14 minutes (II) 20 and 40 minutes. ....	130

- ***Chapitre 5***

Figure 5-1 UHPLC MS-MS analysis of ions peak m/z of 623.316 Da corresponding to the sequence of LTDYL	147
and b) theoretical fragmentation spectra of LTDYL .....	
Figure 5-2 Effects of synthetic peptides on the glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells in basal	149
(a and c) or insulin-stimulated (b and d) conditions. Data are expressed as mean ± SEM, n = 9. An asterisk	
indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value. ....	
Figure 5-3 Dose-response effect of IPVE on the glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells in basal	150
(a and c) or insulin-stimulated (b and d) conditions. Data are expressed as mean ± SEM, n = 9. An asterisk	
indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value. ....	
Figure 5-4 Effects of synthetic peptides on in vitro hepatic production from FAO cells in basal (a and c) and	151
insulin-stimulated (b and d) conditions. Data are expressed as mean ± SEM, n = 6. An asterisk indicates that	
mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value. Two asterisks indicate that	
mean values are very significantly different ( $P < 0.01$ ) from the control's mean value .....	
Figure 5-5 Effects of peptides on the nitric oxide (NO) production on lipopolysaccharide (LPS)-induced J774	152
macrophage cells. Data are expressed as mean ± standard deviation, n = 4.....	
Figure 5-6 Insulin receptor pathway. Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc.	
<a href="https://www.cellsignal.com">https://www.cellsignal.com</a> [217]. Red frame: AKT/AS160 pathway. Green frame: mTOR/p70S6K pathway.	
Blue frame: PI3K/PKC pathway .....	154

## **Liste des tableaux**

- ***Chapitre 1***

Tableau 1-1 Différentes classes de médicaments utilisées dans le traitement du diabète de type 2, ainsi que le	45
coût quotidien de l'utilisation de ces traitements. D'après David E. Moller (2001) [46,83]. ....	
Tableau 1-2 Composition des muscles de certains poissons. Adapté de Venugopal et Shahidi (1996) [89]....	47
Tableau 1-3 Principales techniques de séparation et leurs critères de sélection, d'après Przybylski (2016) [128].	58
.....	
Tableau 1-4 : Fractions ou composés bioactifs concentrés par EDUF, à partir d'hydrolysats protéiques. ....	68
Tableau 1-5 Masse des 20 acides aminés standards .....	79
Tableau 1-6 Liste non exhaustive de peptides bioactifs agissant contre le DT2, identifiés à partir de coproduits	
marins. ....	80

- ***Chapitre 3***

Tableau 3-1 The relative energy consumption, peptide migration rate, and peptide concentration in cationic and	
anionic configuration compartments. lowercase letters are used to compare the three recovered compartments	
of the same configuration, means with different lowercase letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Whereas	
capital letters are used to compare the recovered compartments between anionic and cationic configuration,	
means with different capital letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).....	100
Tableau 3-2 Cationic and anionic peptides simultaneously present in each cationic (Cffc, Crc1 and Crc2) and	
anionic (Arc1, ARC2 and Arc3) bioactive fractions .....	107

- ***Chapitre 4***

Tableau 4-1 RP-HPLC and MS results for peaks presenting significant differences after EDUF separation in samples of recovery and initial compartments .....	131
Tableau 4-2 Characterization and sequences of potential gluco-regulatory peptides.....	134

- ***Chapitre 5***

Tableau 5-1 Sequences and characteristics of synthetic peptides.....	148
--	-----

# Liste des abréviations, sigles, acronymes

AAs : Acides aminés

A<sub>FFC</sub> : Anionic final feed compartment / Fraction finale du compartiment d'alimentation anionique

A<sub>FFC2</sub> : Anionic final feed compartment 2 / Fraction finale du compartiment d'alimentation anionique 2

A<sub>RC1</sub> : Anionic recovery compartment 1 / Compartiment de recuperation des peptides anioniques 1

A<sub>RC2</sub> : Anionic recovery compartment 2 / Compartiment de recuperation des peptides anioniques 2

A<sub>RC3</sub> : Anionic recovery compartment 3 / Compartiment de recuperation des peptides anioniques 3

C<sub>FFC</sub> : Cationic final feed compartment / Fraction finale du compartiment d'alimentation cationique

C<sub>FFC2</sub> : Cationic final feed compartment 2 / Fraction finale du compartiment d'alimentation cationique 2

COX-2 : Cyclo-oxygénase 2

CR : Zone riche en cystéine

C<sub>RC1</sub> : Cationic recovery compartment 1 / Compartiment de recuperation des peptides cationiques 1

C<sub>RC2</sub> : Cationic recovery compartment 2 / Compartiment de recuperation des peptides cationiques 2

C<sub>RC3</sub> : Cationic recovery compartment 3 / Compartiment de recuperation des peptides cationiques 3

DPP-IV : dipeptidyl peptidase-IV

DT2 : Diabète de type 2

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ED : Électrodialyse conventionnelle

EDUF : Électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration

Fn<sub>3</sub>-1/2 : Zones riches en fibronectine de type 3 – 1/2

HGP : Production du glucose hépatique

IL-1 $\beta$  : Interleukine-1 $\beta$

IL-6 : Interleukine-6

iNOS : forme inducible de l'oxyde nitrique synthase

IRS-1/2 : Substrat du récepteur de l'insuline-1/2

L1 : Zone riche en Leucine 1

LC-MS : Chromatography liquid couplée avec la spéctrométrie de masse

MS/MS : spéctrométrie de masse en tandem

mTOR : mammalian target of rapamycin

NF : nanofiltration

NO : Oxyde nitrique

PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E2

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PPAR $\gamma$  : peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$

RI : Récepteur de l'insuline

SPH : Hydrolysat protéique de saumon

TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha

UF : ultrafiltration

UFM : ultrafiltration membranes

U<sub>SPH</sub> : Unfractionnated salmon protein hydrolysate / Hydrolysat protéique de saumon non-fractionné

## **Liste des acides aminés :**

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

*À ma famille, mes ami(e)s et ma conjointe*

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Laurent Bazinet pour m'avoir accordé sa confiance pour réaliser ce beau projet. Merci Laurent, pour ta disponibilité et la confiance sans faille que tu m'as accordée. Je te suis extrêmement reconnaissant pour ton soutien à la fois professionnel et humain, pour le dynamisme que tu crées dans l'équipe et qui nous pousse au dépassement de soi. Je te remercie aussi pour les nombreuses opportunités, de congrès nationaux ou internationaux, de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner. Laurent, ta passion, ta rigueur et ta créativité sont des exemples à suivre, et inspirants.

J'aimerais également remercier mon codirecteur de thèse, le Dr André Marette, de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et de m'avoir permis de développer de nombreuses compétences connexes. Je te remercie aussi pour l'enthousiasme que tu as eu à chacune de nos rencontres, lorsque je te montrais mes résultats, qui a été une source de motivation supplémentaire.

Je remercie également le Dr Sergey Mikhaylin d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Je le remercie aussi pour sa disponibilité, pour nous pousser toujours un peu plus loin dans notre réflexion lors de nos réunions le lundi. Sergey, je te remercie plus personnellement pour ta grande gentillesse, je suis heureux d'avoir d'abord été ton collègue, puis ton ami.

Finalement, je remercie également les Drs Rozenn Ravallec, Hélène Jacques et Jean Amiot d'avoir généreusement acceptés d'être membres du jury.

Un grand merci également à nos deux professionnelles de recherche, Jacinthe Thibodeau et Véronique Perreault. Tout d'abord Jacinthe, pour ton sourire et ta bonne humeur. Je te remercie pour tous ces moments de rires partagés, mais aussi de nous avoir accueillis chez toi à de nombreuses occasions. Évidemment, je te remercie aussi pour ton expertise professionnelle et toute l'aide que tu m'as apportées pour les analyses chromatographiques et de spectrométrie de masse. Véronique, je te remercie également de ton soutien, de m'avoir pris sous ton aile lors de mon stage de maîtrise, et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci à toutes les deux.

Je remercie également Bruno Marcotte pour son aide extrêmement précieuse pour la réalisation des études *in vitro*. Je te remercie tout d'abord d'avoir eu la patience de me former à ces techniques, mais aussi pour ton soutien et tes nombreux conseils.

À tous mes amis d'ici, Romain, Précillia, Guillaume, Irène, Lysis, Antoine (Kalas) et Antoine (Paragon), Marc-Henri, Djè, Baptiste et d'ailleurs Anatole et Lucie, Maxime M. et Julie, Maxime B. et Élodie, Sébastien et Laetitia, Julien et Marine, Romain V, Julien B, Rémi P et bien d'autres. À mes collègues Rachel, Sarah, Mira, Noémie B, Claudie, Valentine, Mélanie, Sabita et anciens collègues Mathieu, Élodie, Stéphanie, Shyam, Valérie et Marion. Je remercie tout particulièrement Alice, avec qui j'ai démarré cette magnifique aventure ici depuis le premier jour. Sans toi, rien de ceci n'aurait été envisageable. Merci pour tous ces merveilleux souvenirs.

Je tiens également à remercier Noémie, ma compagne et meilleure amie. Merci de m'accompagner dans mon quotidien, de me soutenir et de me pousser chaque jour à être le meilleur. On forme une bonne équipe !

Je remercie ma famille, Liévine, Mathilde, Lou-Anne, Papa, Maman. Ainsi que mes cousins et cousines, oncles et tantes, mais aussi ma marraine et mamie. Je vous remercie tous, du fond du cœur pour votre soutien inconditionnel, d'avoir tous de près ou de loin participé à mon épanouissement. J'espère vous avoir rendu fier. J'ai également une pensée toute particulière pour mon papy (Michel) et ma mamie (Liliane), à qui je dédie modestement ce travail.

# **Avant-propos**

La présente thèse de doctorat s'intéresse à la valorisation d'un coproduit issue de la transformation de saumon. Il s'agit de générer des fractions bioactives et d'identifier les peptides bioactifs, par l'utilisation d'un procédé innovateur, sélectif et écoresponsable, afin de répondre à deux enjeux importants de l'actualité. Tout d'abord, détourner un produit de l'enfouissement, afin de réduire l'impact environnemental de l'industrie de transformation du saumon et de générer des fractions bioactives, à haute valeur ajoutée et à destination du marché nutraceutique. Puis, de générer de nouveaux produits d'origine naturelle ayant des propriétés antidiabétiques, afin de limiter le développement du diabète de type 2. Pour fin de présentation, cette thèse est divisée en sept chapitres. Le premier chapitre correspond à l'introduction générale de l'étude, tandis que le deuxième constitue un état de l'art sur lequel l'hypothèse et les objectifs de la recherche se sont appuyés. Le chapitre 3 présente ainsi le but du projet, l'hypothèse qui y est rattachée et les objectifs de recherche qui en découlent. Les chapitres 4, 5, 6, rédigés en anglais, correspondent aux travaux de recherche effectués dans le cadre de cette thèse, et sont présentés sous forme d'articles scientifiques. Dans les trois articles scientifiques présentés dans la thèse de doctorat, l'entièreté de la planification et de l'exécution des expériences ainsi que l'analyse des résultats a été effectuée par l'auteur de cette thèse, de même que la rédaction de ce chapitre. Jacinthe Thibodeau a apporté son aide dans l'exécution des expériences et des analyses de spectrométrie de masse. Les Drs Geneviève Pilon et Tom Gill, collaborateurs scientifiques du projet ont participé à la correction et révision du premier chapitre de résultat. Le Dr André Marette, codirecteur a participé à la discussion et révision du premier chapitre de résultat. Le Dr Laurent Bazinet directeur du projet a été responsable de la conception et de la planification des expériences, mais aussi de la discussion et de la révision des articles scientifiques.

Le *premier chapitre* est une introduction générale de la thèse.

Le *deuxième chapitre* intitulé « Synthèse bibliographique » introduit les connaissances actuelles sur le diabète de type 2, le développement de la maladie, la problématique sur les

traitements actuels, sur l'utilisation de produits naturels, notamment de peptides bioactifs issus de coproduits marins, représentant une alternative aux traitements de synthèse actuels. Ainsi, il sera abordé les différentes techniques pour produire, fractionner et identifier ces peptides bioactifs. Notamment par l'utilisation d'une technologie récente, innovante et écoresponsable, l'électrodialyse avec membranes d'ultrafiltration.

Le *troisième chapitre* fait état du contexte et de la problématique de l'étude et présente l'hypothèse de recherche ainsi que les objectifs.

Le *quatrième chapitre* intitulé « How Triple Size-Selective Membrane Separation of Peptides from Salmon Protein Hydrolysate Orientate their Biological Response on Glucose Uptake » s'intéresse à l'impact d'un empilement spécifique de membranes d'UF, dans un module d'EDUF, sur la séparation d'un hydrolysat de protéines de saumon, et l'impact de cette séparation sur la capacité des fractions générées à moduler *in vitro* l'absorption du glucose. Cet article a été publié dans l'*International Journal of Molecular Sciences* en avril 2019.

Le *cinquième chapitre* intitulé « Simultaneous Glucoregulatory and Anti-Inflammatory activities of Peptides fractions from Salmon Protein Hydrolysate obtained following their separation by electrodialysis with ultrafiltration membrane, and peptide identification: a natural product response against type 2 diabetes » s'intéresse à la réalisation d'une deuxième séparation par EDUF, utilisant comme solution d'alimentation, les deux solutions finales générées lors du *quatrième chapitre*. L'impact de ces fractions sur plusieurs bioactivités (absorption du glucose, production du glucose hépatique et inflammation) impliquées dans le DT2 a été étudié, ainsi que l'identification de séquences peptidiques pouvant potentiellement être à l'origine de ces bioactivités. La soumission de cet article est en attente d'une décision concernant la prise d'un brevet.

Le *sixième chapitre* intitulé « Identification of four novel glucoregulatory peptides, from salmon by-product hydrolysate » a permis de valider ou non l'effet bioactif sur l'absorption

du glucose, la production du glucose hépatique et l'inflammation de 13 peptides identifiés et synthétisés.

Enfin, le *septième chapitre* conclut cette thèse en soulignant les principaux résultats ainsi que les perspectives pour apporter une meilleure valorisation des résultats dans le cadre de cette thèse de doctorat.

Finalement, quatre autres articles ont été rédigés en tant que coauteur démontrant ainsi l'importance des expertises développées dans le cadre de ce doctorat :

- Perreault, V; **Henaux, L**; Bazinet, L; Doyen, L. Pretreatment of flaxseed protein isolate with high hydrostatic pressure: impacts on protein structure, enzymatic hydrolysis and final hydrolysate antioxidant properties. *Food Chemistry*, 221 : 1805-1812.
- Marie, G.C.U.; Perreault, V.; **Henaux, L.**; Carnovale, V.; Aluko, R.; Marette, A.; Doyen, A.; Bazinet, L. 2019. Impact of a high hydrostatic pressure pretreatment on the separation of bioactive peptides from flaxseed protein hydrolysates by electrodialysis with ultrafiltration membranes. *Separation and Purification Technology*, 211 : 241-251
- Valle, M.; Mitchell, P.; Pilon, G.; Varin, T.; **Henaux, L.**; Rolin, J.; McLeod, R.; Gill, T.; Richard, D.; Wohl, M.-C.; Jacques, H.; Gagnon, C.; Bazinet, L.; Marette, A. Low-molecular weight salmon peptides limit the development of obesity and associated metabolic disorders by modulating the gut-liver axis in high-fat and sucrose fed and vitamin D deficient LDL<sup>r</sup>-/-ApoB100/100 mice.
- Faucher, M.; **Henaux, L.**; Chaudron, C.; Mikhaylin, S.; Margni, M.; Bazinet, L. Electromembrane approach to substantially improve the ecoefficiency of deacidified cranberry juice production: physicochemical properties, life cycle assessment and ecoefficiency score. Submitted to *Journal of Cleaner Production*.

## Introduction

Le diabète de type 2 (DT2) est un trouble multifactoriel complexe de l'homéostasie du glucose. Cette maladie, bien qu'elle possède une composante génétique, est principalement induite par des causes socio-environnementales comme de mauvaises habitudes alimentaires (régimes trop riches en gras et/ou sucres) et d'un manque d'activité physique [1]. Cette maladie ne cesse de prendre de l'ampleur et a atteint des proportions pandémiques. En effet, d'après la fédération internationale du diabète (FID) [2], en 2001 151 millions de personnes dans le monde étaient atteintes par le DT2, alors qu'en 2017, ce nombre s'était élevé à 425 millions de personnes [2]. Le DT2 est une maladie menant à une hyperglycémie chronique, c'est une maladie non contagieuse qui se développe lentement. Le DT2 se caractérise à la fois par une déficience dans l'action de l'insuline (insulinorésistance), mais aussi dans sa sécrétion par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans au niveau du pancréas. Actuellement, les principales voies thérapeutiques utilisées, afin de prévenir et contenir le DT2, sont d'abord des mesures hygiéno-diététiques puis médicales [3]. Cependant, la modification du style de vie est difficile à maintenir sur le long terme (à cause des coûts associés à l'intervention des différents professionnels de la santé, du manque de compliance des patients), de plus la prise régulière de médicaments peut entraîner l'apparition d'effets secondaires et/ou mener à une diminution de son efficacité [3,4]. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouveaux produits préventifs ou thérapeutiques, plus sécuritaires, afin de ralentir le développement toujours plus important du DT2.

L'industrialisation et notamment l'industrie du secteur alimentaire engendre une accumulation de déchets toujours plus importante [5]. À l'heure où les ressources pouvant être transformées s'amenuisent, la valorisation de ces déchets, qui de par leur richesse en composés encore actifs, représentent de nouvelles ressources à haut potentiel de valorisation. En effet, de nombreuses études ont démontré la présence de molécules actives et bénéfiques pour la santé à partir de divers coproduits alimentaires, faisant de ces coproduits alimentaires une source importante de nutraceutiques [6–10]. C'est notamment le cas des coproduits marins qui ont démontré à travers plusieurs études leurs propriétés à agir contre le DT2. En effet, Lavigne *et al.* (2000, 2001)[11,12] ont rapporté qu'une alimentation riche en protéines de morue améliore la tolérance au glucose et

la sensibilité à l’insuline chez le rat, et pouvait empêcher le développement de l’insulinorésistance des cellules des muscles squelettiques chez des rats obèses (obésité induite par une diète obésogène). Pilon *et al.* (2011) ont obtenu des résultats similaires et mis en évidence, qu’une diète riche en peptides de saumon, issus d’un hydrolysat protéique de saumon non fractionné, pouvait générer des effets bénéfiques sur le DT2, comme une augmentation de la sensibilité à l’insuline améliorant le métabolisme du glucose, ou encore une diminution de la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  (de l’anglais, tumor necrosis factor- $\alpha$ ) ou encore de l’IL-6 (de l’anglais, interleukin-6) [13]. Récemment, Chevrier *et al.* (2015) ont rapporté que les peptides de faibles poids moléculaires (<1 kDa), issus de la protéolyse de sous-produits de saumon, pouvaient améliorer, *in vitro* (sur des cellules musculaires L6) et *in vivo* (sur des rats diabétiques), la tolérance au glucose et la sensibilité à l’insuline [4].

La production, la séparation et la caractérisation de peptides bioactifs (PBs) à partir de différentes sources alimentaires représentent des enjeux importants pour la recherche agroalimentaire. L’hydrolyse enzymatique est l’une des procédures les plus utilisées pour générer des PBs à partir de protéines [14]. Cependant, les hydrolysats générés après hydrolyse enzymatique sont des mixtures complexes de peptides, pouvant posséder des propriétés physicochimiques similaires (masse moléculaire, charge, taille...). De plus, il a été démontré que les PBs possèdent souvent de faibles poids moléculaires [15,16] et que leur charge globale est un facteur important pour l’expression de leurs bioactivités [17]. Cependant afin de maximiser ces effets bioactifs, il est nécessaire d’optimiser la séparation des PBs afin de les concentrer [18]. Plusieurs stratégies et technologies de séparation ont déjà été utilisées pour le fractionnement d’hydrolysats protéiques complexes. Parmi ces technologies permettant la séparation des peptides on retrouve les technologies chromatographiques [19,20], les technologies membranaires (comme les techniques baromembranaires ou électro-baromembranaires) [21–27]. Néanmoins, ces technologies bien que matures, présentent des limites dans leur utilisation notamment à cause de problèmes liés à la sélectivité, par exemple pour les technologies baromembranaires, ou par l’utilisation de solvants qui est impactant pour l’environnement, dans le cas de la chromatographie [28]. C’est pourquoi, il est nécessaire d’étudier et de développer de nouvelles technologies innovantes et plus efficaces afin d’optimiser le fractionnement d’hydrolysats complexes [29].

Dans ce contexte, l'électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF) représente une alternative prometteuse (peu coûteuse, sélective et respectueuse de l'environnement) aux procédés conventionnels de séparation [29]. En effet, ce procédé est basé, à la fois, sur les différences de mobilité électrophorétique des peptides, mais également sur les propriétés des membranes (seuil de coupure). Ainsi la possibilité d'utiliser plusieurs membranes d'ultrafiltration (UFMs) va augmenter la sélectivité dans la séparation de mixtures peptidiques complexes [29]. De plus, dans un contexte où les enjeux environnementaux sont de plus en plus importants pour les industries, la séparation des peptides sans l'utilisation de solvants et la capacité d'adaptation à la production à très grande échelle sont autant d'atouts rendant l'intégration de l'EDUF plus facile dans une ligne de production industrielle [29]. De plus, le fractionnement par l'EDUF permettrait de générer des fractions plus bioactives mais aussi plus pures, facilitant l'identification des PBs. Dans cet optique, ce projet de doctorat se focalise sur le fractionnement d'un hydrolysat complexe de coproduits de saumon, par EDUF, permettant l'identification de peptides antidiabétiques.

# **Chapitre 1**

# **Synthèse bibliographique**

# **1. Synthèse bibliographique**

## **1.1. Le contrôle de la glycémie par l'insuline**

### **1.1.1. Généralités**

La glycémie est définie par la variation du taux de sucre dans le sang au cours d'une journée. En effet, elle est comprise entre une valeur minimale de 0,7 à 1,1g/L à jeun, et n'excède pas 1,4g/L en période postprandiale [30]. Cette faible variation, malgré la prise alimentaire, est due à la présence d'un système de régulation hormonale. Le rôle du pancréas dans la régulation a été mis en évidence par deux chercheurs allemands, Mering et Minkowski [31] qui, par l'ablation du pancréas chez le chien (pancréatectomie), ont démontré le rôle clef de cet organe dans la régulation de la glycémie. Un peu plus tard, dans les années 1920, une équipe de l'université de Toronto, menée par Frederik Banting et Charles Best [32] testent l'efficacité de l'injection d'extraits pancréatiques chez un patient humain atteint du diabète. Si le jeune patient Leonard Thompson, âgé de 14 ans, est insensible au premières injections, une amélioration nette de la qualité des extraits, permettra 23 jours plus tard d'obtenir des résultats importants avec une diminution du sucre dans le sang et dans les urines jusqu'à un taux normal, et une atténuation d'autres symptômes en lien avec le diabète [33]. Finalement, ces travaux seront récompensés un peu plus tard par l'attribution d'un prix Nobel de médecine à Frederick G. Banting et son équipe en 1923, pour la découverte de l'insuline et de son rôle d'hormone hypoglycémiant [32–34].

### **1.1.2. L'insuline**

L'insuline est la seule hormone peptidique hypoglycémiant sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas. Sa fonction principale est de maintenir l'équilibre du taux de glucose contenu dans le sang. Le rôle de l'insuline dans l'homéostasie du glucose est caractérisé par son action direct sur des tissus cibles, comme les muscles squelettiques, le foie ou encore le tissu adipeux (TA) [35].

### **1.1.2.1. Structure, biosynthèse**

Le gène codant pour la préproinsuline, précurseur de l’insuline, se trouve sur le chromosome 11, et se compose de trois exons, un codant pour le peptide signal, le deuxième pour la chaîne B de l’insuline et une partie du peptide C, et le dernier code pour le reste du peptide C ainsi que la chaîne A de l’insuline [36]. La synthèse et la sécrétion de l’insuline, comme présentée dans la figure 1-1, se font dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans [37]. Chez les mammifères, le pancréas peut contenir jusqu'à plus d'un million d'îlots de Langerhans, chacun composé d'environ un millier de cellules endocrines, dont 60% sont des cellules  $\beta$  [36].

La synthèse de l’insuline se fait à partir de la préproinsuline. Ainsi, la préproinsuline est hydrolysée en proinsuline dans le réticulum endoplasmique rugueux, par des enzymes protéolytiques qui vont cliver le peptide signal et former ainsi la proinsuline [36]. La proinsuline est un peptide de 9kDa formée de trois régions, les chaînes A et B qui vont former l’insuline, et un peptide de liaison, le peptide C, dont la principale fonction est d’aligner les chaînes A et B de l’insuline afin de favoriser la formation des ponts disulfures et ainsi assurer le bon repliement du peptide avant son clivage [36]. La proinsuline est transportée par des microvésicules dans l’appareil de Golgi. Le clivage de la proinsuline en insuline initié dans l’appareil de Golgi, se poursuit lors de la maturation des granules d’exocytose, et nécessite l’action subséquente d’un trio d’enzymes, à savoir deux endopeptidases (proprotein convertase 2 et 3) et la carboxypeptidase H [38].

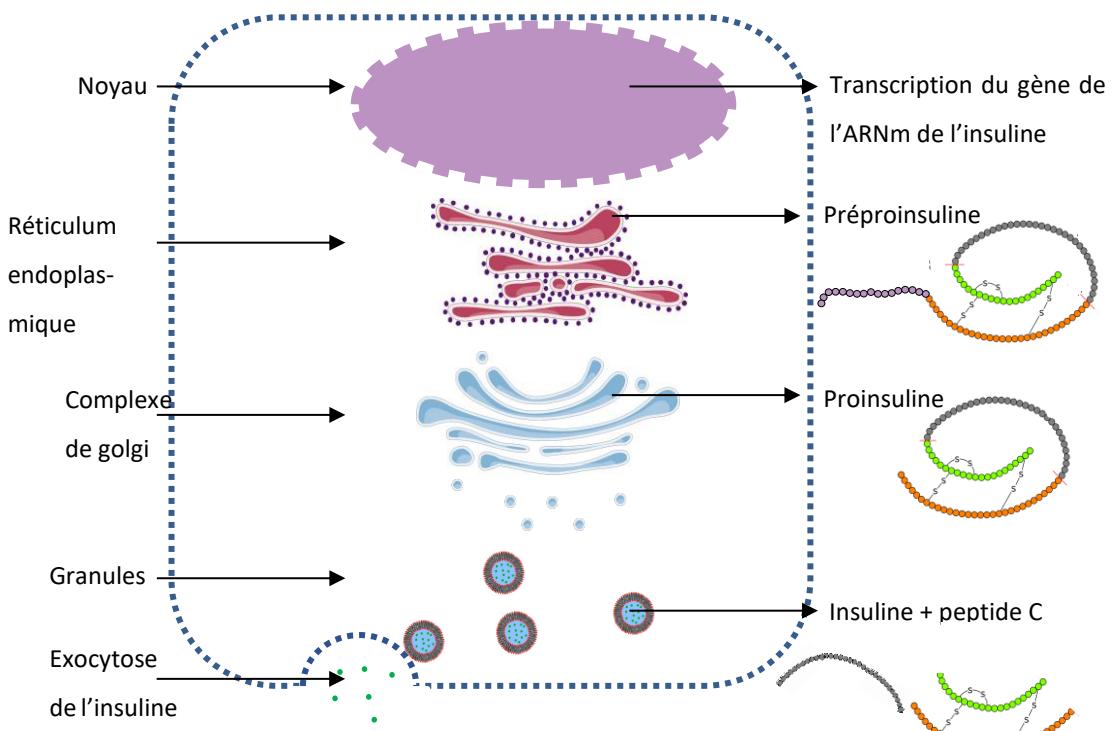


Figure 1-1 Schéma de la biosynthèse de l'insuline dans les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Adapté de Jones & Persaud (2016) [36]

### 1.1.2.2. Sécrétion de l'insuline

La sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  est adaptative et dépend notamment de la variation de la concentration de certains nutriments, tels que le glucose, les acides gras ou encore les acides aminés dans le sang [37]. Ainsi, lorsque les nutriments sont absorbés par le système gastro-intestinal, les cellules  $\beta$  détectent l'augmentation de la concentration de ces nutriments et libèrent l'insuline, par exocytose, afin de métaboliser et stocker ces nutriments dans les tissus périphériques cibles. En effet, comme décrit par Jones et al, [36] et présenté sur la figure 1-2, le glucose extracellulaire est internalisé via le transporteur du glucose 2 (GLUT, de l'anglais GLUcose Transport) à travers la membrane de la cellules  $\beta$ . Ce glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate via une glucokinase, ce qui engendre la glycolyse, qui est un processus libérateur d'énergie [39]. Ainsi, le ratio ATP/ADP augmente dans le cytoplasme des cellules et entraîne une fermeture des canaux potassiques, sensibles à l'ATP. Il s'en suit une augmentation de la concentration du potassium dans la cellule, entraînant sa dépolarisation et stimulant par la même occasion la rentrée du calcium dans la cellule via les

canaux calciques. L'augmentation de la concentration en calcium cytosolique déclenche l'exocytose des granules d'insuline et ainsi sa sécrétion [36,40].

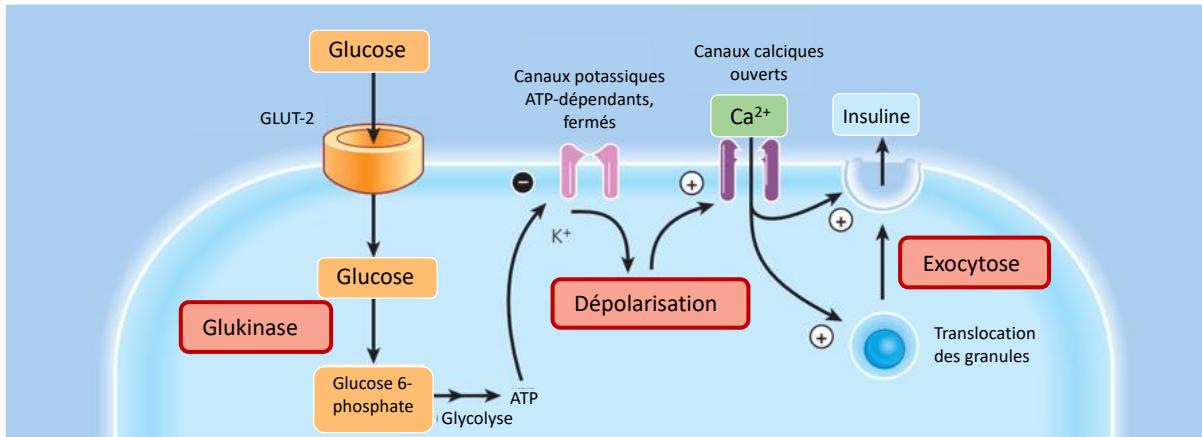


Figure 1-2. Mécanismes menant à l'excrétion par exocytose de l'insuline des les cellules  $\beta$ . Tiré de Jones & Persaud, 2017 [36]

Certains acides aminés chargés positivement peuvent aussi être initiateurs de la sécrétion de l'insuline, c'est le cas par exemple de la lysine et de l'arginine. Ces derniers pénètrent dans les cellules via des transporteurs spécifiques pour les acides aminés chargés positivement. Comme expliqué par Jones et al [36], l'accumulation de ces charges positives dépolarise directement la cellule entraînant l'exocytose des granules d'insuline. La leucine possède aussi la capacité à stimuler la sécrétion de l'insuline, en diminuant la perméabilité de la cellule au potassium, en dépolarisant la cellule et en favorisant la rentrée du calcium [36].

### 1.1.2.3. Mode d'action de l'insuline

L'insuline joue un rôle majeur dans la mise en réserve et l'utilisation de substrats énergétiques. En effet, l'augmentation de la sécrétion d'insuline va être induite par une augmentation des niveaux de glucose sanguin. Ainsi, l'insuline sous l'effet de sa liaison à un récepteur membranaire spécifique particulièrement exprimé au niveau de trois tissus cibles : les muscles, le foie et le tissu adipeux [41], va permettre l'augmentation de la captation du glucose, principalement au niveau des muscles squelettiques (les muscles squelettiques utilisent 35 à 40% du glucose) et moindrement au niveau du tissu TA (utilise environ 10%), tandis qu'elle inhibe la production de glucose hépatique (HGP) [41,42].

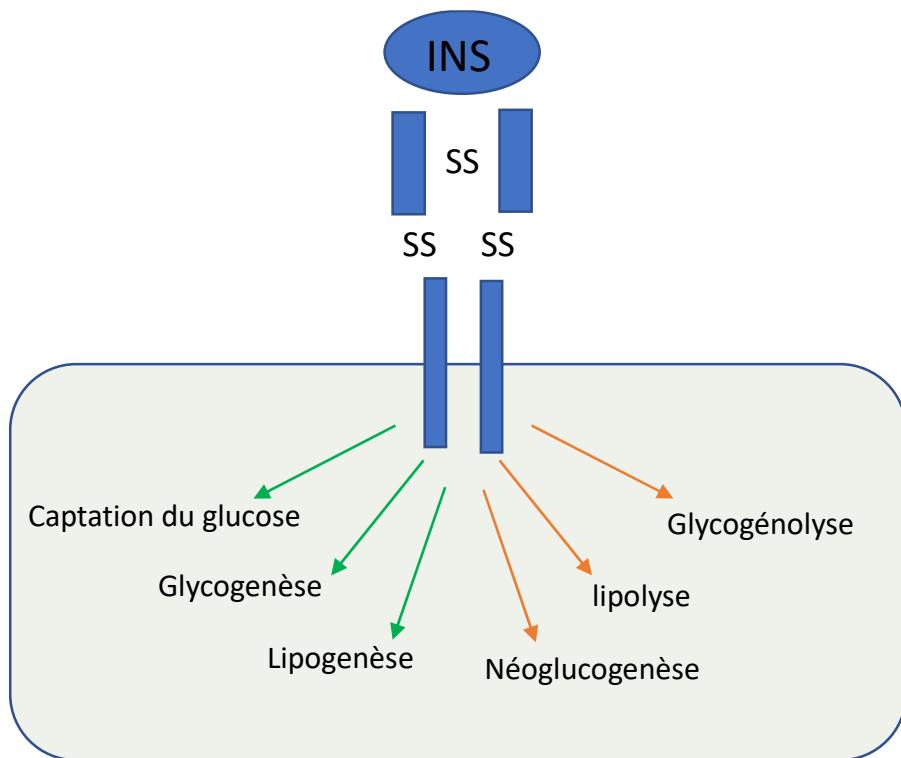


Figure 1-3 Principaux effets de l'insuline dans ses trois tissus cibles (foie, muscles et tissu adipeux). Adapté de Capeau (2003) [41]

Le récepteur de l'insuline (RI) appartient à la super famille des récepteurs tyrosine kinase, et est exprimé à la surface de toutes les cellules, mais plus particulièrement dans les trois tissus cibles [41]. Le RI est formé de deux chaînes extracellulaires ou chaînes  $\alpha$  et deux chaînes transmembranaires ou chaînes  $\beta$  formant un hétérotétramère  $\alpha_2\beta_2$  [43]. La partie extracellulaire du récepteur est stabilisée via la présence de deux ponts disulfures entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , en plus de liaisons non covalentes.

La liaison de l'hormone (Figure 1-4) sur son récepteur se fait sur les sous unités  $\alpha$ ; la chaîne A de l'insuline se fixe sur la zone L1 et CR, qui sont respectivement des zones riches en leucines et cystéines, et la chaîne B se lie à la jonction des zones Fn<sub>3</sub>1 et Fn<sub>3</sub>2 qui sont des domaines complets de fibronectine de type 3 [43].

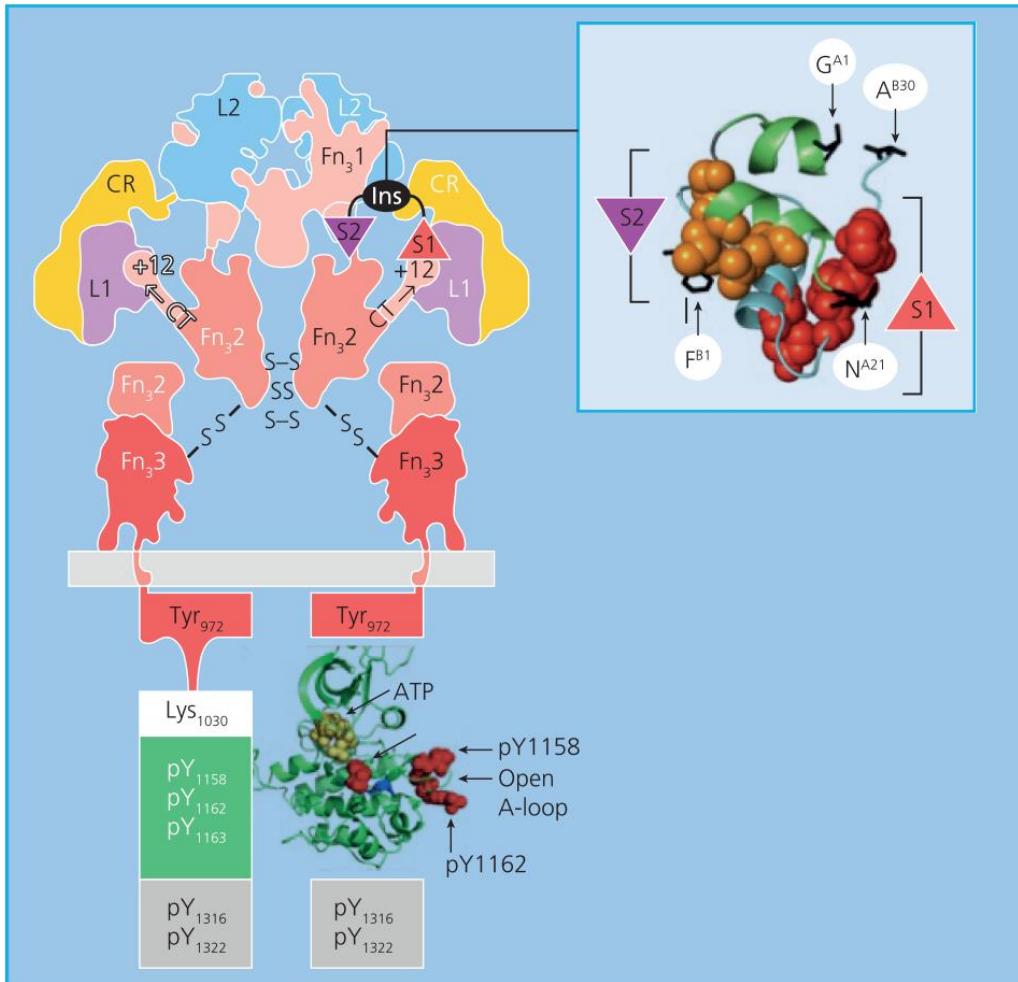


Figure 1-4 Structure du récepteur de l'insuline, et les sites de fixations de l'hormone. Tiré de M. White (2016) [43].

*Ins : Insuline, L1 et L2 : motifs riches en Leucine 1 et 2, CR : motifs riches en Cystéine, S1 et S2 : motifs riches en Serine, Fn31, 2 et 3 : domaines riches en fibronectine de type 3, Tyr : Tyrosine, Lys : Lysine, pY : site de phosphorylation de la tyrosine, G<sup>A1</sup> : Glycine en position 1 (en partant du coté N-Term) de la chaîne A de l'insuline, N<sup>A21</sup> : Asparagine en position 21 de la chaîne A de l'insuline, F<sup>B1</sup> : Phénylalanine en position 1 de la chaîne B de l'insuline, A<sup>B30</sup> : Alanine en position 30 de la chaîne B de l'insuline.*

Une fois l'insuline liée, son action se fait principalement via la voie phosphatidyl-inositol 3 (PI3) Kinase [35]. Cette voie permet l'entrée du glucose dans les cellules via la translocation de vésicules contenant les transporteurs GLUT4 dans les cellules musculaires et les adipocytes. Brièvement, les substrats du récepteur à l'insuline-1 et 2 (IRS-1/2) se lient au RI au niveau de la tyrosine 960 phosphorylée [43]. La protéine IRS se retrouve elle aussi phosphorylée et est reconnue par des protéines relais (en violet) par exemple (figure 1-5) le domaine SH2 (src homology 2), sous-unité de la PI3K. La PI3K activée crée des sites de reconnaissance pour d'autres protéines telles que les protéines kinase B (PKB)/Akt ou la

PDK1/2 (3-phosphoinositide-dependant protein kinase 1/2), qui une fois phosphorylées, activent à leur tour d'autres intermédiaires protéiques qui permettent entre autres la synthèse du glycogène et le transport du glucose[41,43].

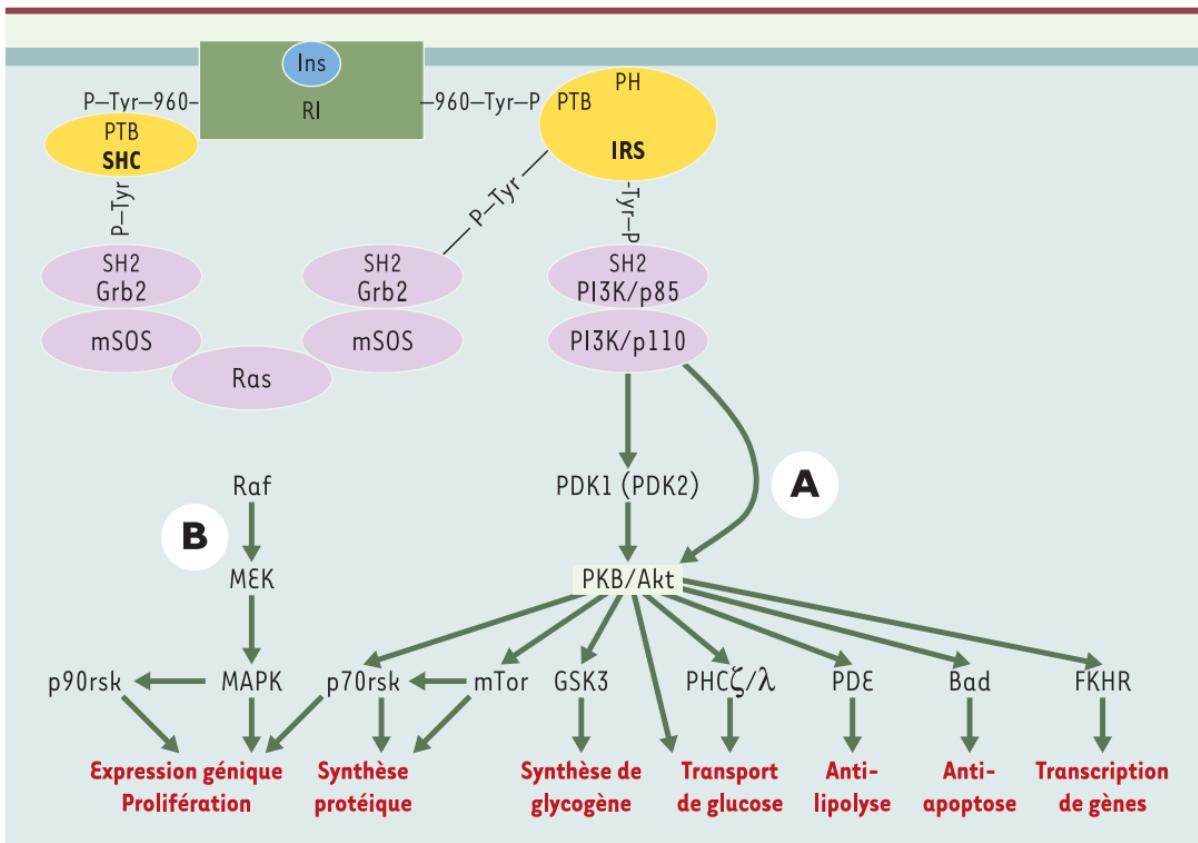


Figure 1-5 Principales voies de signalisation de l'insuline. Tiré de J. Capeau, 2003 [41].

RI : Récepteur de l'insuline, IRS : Insulin Receptor Substrate (en jaune), domaine PTB : phosphotyrosine binding site, Protéines relais en violet, PIRK : phosphatidyl-inositol 3 kinase, Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2, PDK1/2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2), PKB/Akt : Protein kinase B, GSK3 : glycogène synthase 3 kinase (GSK3), mTOR : mammalian target of rapamycin, Bad : protéine pro-apoptotique,

Il existe plusieurs pathologies liées à un défaut de la sécrétion et de l'utilisation de l'insuline menant à une hyperglycémie chez les patients. Par exemple les diabètes de type 1, 2 et gestationnel. Dans la prochaine section, les défauts concernant l'utilisation et la sécrétion de l'insuline menant au développement du diabète de type 2, en lien avec le présent travail, seront abordés plus particulièrement.

## 1.2. Le diabète de type 2

### 1.2.1. Définition

En 2015, plus de 415 millions de personnes étaient atteintes par le diabète (dont environ 90% souffraient du diabète de type 2). Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie multifactorielle caractérisée par une hyperglycémie non contrôlée [44]. Le développement du DT2, bien qu'il ait une composante génétique, est grandement lié à nos habitudes de vie, comme la sédentarisation et de mauvaises habitudes alimentaires [1].

D'après la Fédération internationale du diabète (IDF), si la progression persiste, d'ici 2040, c'est plus de 642 millions de personnes qui seront atteintes par le DT2 [45]. La prévalence du DT2 varie d'un pays à l'autre et d'un continent à l'autre. En effet, la répartition de la maladie n'est pas homogène sur la planète. Actuellement, ce sont les pays industrialisés qui sont les plus touchés par la maladie. Cependant, d'après les prévisions, ce sont les pays en voie de développement qui connaîtront la croissance la plus importante de la maladie (Figure 1-6).

Au Canada, d'après *Diabetes Canada* [46], la prévalence du DT2 était de 3,4 millions de personnes en 2015, soit 9,3% de la population canadienne et devrait monter à 5 millions de malades, soit 12,1% de la population en 2025. L'augmentation de la prévalence du DT2 entraîne inévitablement une augmentation des coûts associés au traitement de cette maladie et de ses complications. Toujours d'après *Diabetes Canada*, ces coûts étaient de 14 milliards de \$CAN en 2015 et devraient grimper à 17,4 milliards de \$CAN d'ici 2025.

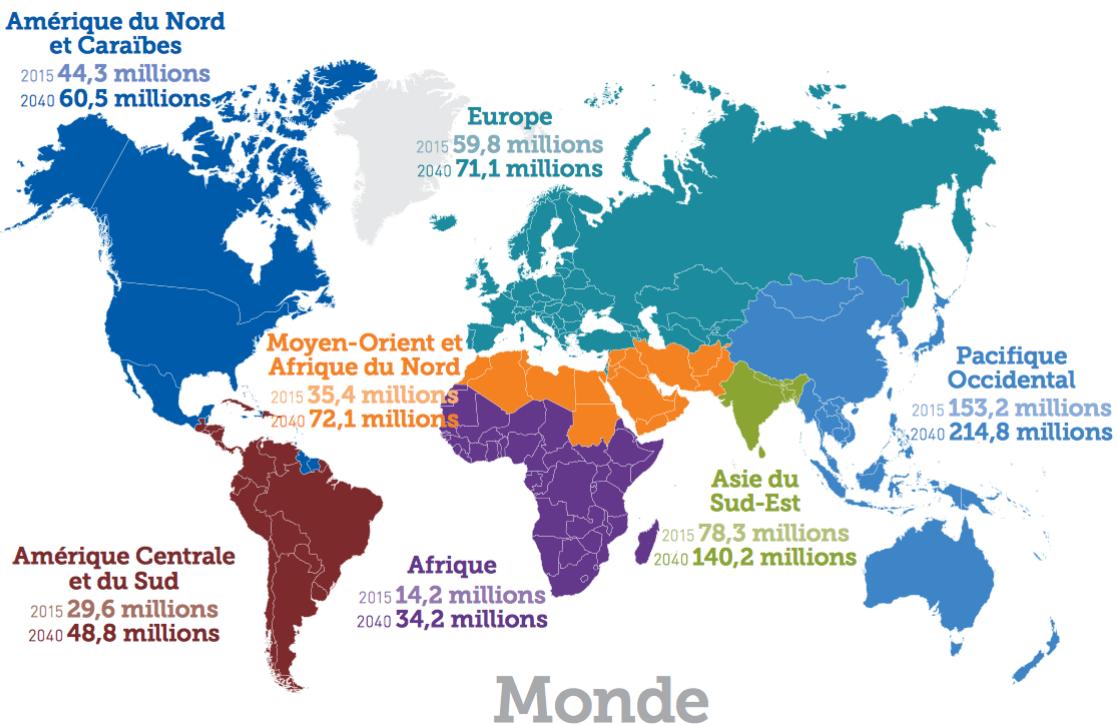


Figure .1-6 Nombre estimé de personnes atteintes de diabète à travers le monde et par région, en 2015 et 2040 (20-79 ans).

Tiré de L'Atlas du DIABETE de la FID Septième édition 2015 [45]

Selon Diabète Québec, le DT2 peut être diagnostiqué de quatre façons différentes chez l'homme. Par mesure de la glycémie à jeun ( $< 7$  mmol/L), par la mesure de la glycémie deux heures après avoir bu un liquide contenant 75 g de glucose ( $< 11,1$  mmol/L), par la mesure de la glycémie à tout moment de la journée ( $< 11,1$  mmol) et finalement par le taux d'hémoglobine glyquée ( $< 6,5\%$ ) [47].

### 1.2.2. La pathophysiologie du Diabète de Type 2.

Le développement du DT2, comme précédemment mentionné, est étroitement lié à nos habitudes de vie, mais il peut aussi être dû à des causes génétiques. Le DT2 est une maladie hétérogène et polygénique. L'hérédité est un facteur à risque important dans le développement du DT2, puisque le risque d'un individu de développer le DT2 est de 40%, si ce dernier possède un parent diabétique, et il s'élève à 70% si les deux parents sont diabétiques [48].

Le DT2 résulte d'un déséquilibre entre la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline. La première anomalie détectable dans le diabète de type 2 est une altération de la capacité du corps à répondre aux stimuli de l'insuline. Chez des personnes atteintes du DT2, les tissus périphériques, tels que le foie, les muscles ou encore le tissu adipeux deviennent résistants à l'insuline (insulinorésistance) [49]. Dans des conditions normales, les cellules  $\beta$  du pancréas, pallient cet état en augmentant leur sécrétion d'insuline, et ainsi maintiennent une tolérance normale au glucose. Le corps se retrouve alors dans un état d'hyper insulénémie compensatrice [50]. Chez les personnes présentant un risque élevé de développer le diabète, l'action compensatrice des cellules  $\beta$  diminue (généralement due à la mort des cellules) et conduit l'individu dans un état d'intolérance au glucose et éventuellement au DT2 [40,51]. En résumé, les patients atteints de DT2 sont caractérisés à la fois par une déficience dans l'action de l'insuline (sur le foie, les muscles et le tissu adipeux), mais aussi dans sa sécrétion (cellules  $\beta$ ).

### **1.2.3. L'obésité, l'inflammation et la résistance à l'insuline.**

#### **1.2.3.1. Le tissu adipeux**

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif principalement composé d'adipocytes. La principale fonction du TA est la mise en réserve d'énergie, sous forme de triglycérides par les adipocytes (lipogenèse) après un repas, ainsi que la libération d'énergie sous forme d'acides gras et de glycérol (lipolyse) lors d'un jeûne. En plus de contenir des adipocytes, le TA est un tissu bien vascularisé, innervé et contenant de nombreuses cellules immunitaires incluant les macrophages [52]. Il est bien connu maintenant que le TA secrète de nombreuses substances permettant de réguler l'homéostasie métabolique comme la leptine, les adiponectines, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 etc [53,54]. Ainsi, le TA est donc plus qu'un simple tissu de stockage, de par ses fonctions endocrines (action systémique), paracrines et autocrines (action locale), il permet notamment de moduler la dépense énergétique, l'appétit, la sensibilité à l'insuline. Cependant, une accumulation excessive de gras dans le TA, va engendrer une expansion de ce dernier et donc une obésité, pouvant entraîner des désordres métaboliques néfastes pour la santé [54].

### **1.2.3.2. L'obésité, un état pro-inflammatoire**

L'ingestion de certains nutriments (glucose et lipides) est associée avec une accumulation de lipide dans les adipocytes, responsable d'une hyperplasie (augmentation du nombre) et d'une hypertrophie (augmentation de la taille) des adipocytes, pouvant activer les voies de signalisation inflammatoires dans les cellules [55]. En effet, l'hypertrophie des adipocytes peut induire la production de cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 ainsi qu'une diminution de la sécrétion de l'adiponectine, qui stimule la sensibilité à l'insuline et régule le métabolisme énergétique à travers l'activation du « senseur » métabolique, l'*AMP-activated kinase* (AMPK) [55,56]. Le signal inflammatoire est renforcé par le « cross-talk » entre les adipocytes et les macrophages résidents, qui contribuent ensemble à la production de cytokines pro-inflammatoires et induisent un état de résistance à l'insuline locale et systémique [55]. Il est possible que l'accumulation de lipides dans les adipocytes initie le signal inflammatoire dans le tissu adipeux et que les macrophages résidents servent à amplifier le signal.

### **1.2.3.3. L'inflammation et la résistance à l'insuline.**

Le TA contient des macrophages dérivés de la moelle osseuse. La teneur en ces macrophages est proportionnelle au degré d'obésité [57]. Il a par exemple été rapporté qu'environ 40% du tissu adipeux était composé de macrophages chez des rongeurs et humains obèses, contre environ 10% chez des sujets sains [57]. Ces macrophages résidents chez les personnes saines sont de type M2, dits « alternatifs » gardant l'inflammation à un niveau bas, par la sécrétion de molécules anti-inflammatoires, par exemple l'interleukine-10 (IL-10) et l'arginase I.

Comme précédemment mentionnée, lorsqu'une obésité s'installe, les adipocytes deviennent hypertrophiés, et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires [58]. Dans ces conditions, il se produit un « cross-talk » entre les adipocytes hypertrophiés et les macrophages résidents [55], ce qui provoque un changement de polarité des macrophages M2 vers des macrophages de type M1, dits « classiques », sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, tels le TNF $\alpha$ , l'IL-6 et l'IL-12 (figure 1-7) [59]. L'infiltration de ces macrophages, provenant principalement de la moelle épinière, serait due à l'augmentation de la sécrétion de chimiokines, qui sont des

cytokines chimio-attractantes, par exemple la chimiotactique monocytaire-1 (MCP-1), favorisant la migration de molécules inflammatoires jusqu'au TA [53,57,60]. Une autre possibilité est que les macrophages seraient attirés dans le TA par la présence d'adipocytes nécrotiques, les macrophages remplirait donc leur principal rôle qui est de nettoyer les corps apoptotiques dans l'organisme [61]. Des études ont démontré qu'une inhibition du recrutement des macrophages améliore la sensibilité à l'insuline dans des modèles animaux [62,63]

Deux principales voies métaboliques ont été associées à l'effet pro-inflammatoire du TA et l'insulinorésistance, à savoir les voies de signalisation stimulant les kinases canoniques *Jun N-terminal kinase* (JNK) et *l'inhibitor of NF $\kappa$ B kinase*  $\beta$  (IKK $\beta$ ), aboutissant à l'activation de la voie inflammatoire NF $\kappa$ B et l'inhibition de la voie de l'insuline [55,59]. Ces voies de signalisation sont activées par plusieurs molécules pro-inflammatoires incluant les cytokines comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 et d'autres. Ces cytokines peuvent induire l'insulinorésistance au niveau d'autres tissus comme le foie et les muscles en favorisant la phosphorylation de IRS1 via la voie JNK1 et NF $\kappa$ B, toutes les deux impliqués dans l'insulinorésistance chronique [64]

Dans ce contexte de nombreux travaux et revues de la littérature montrent un lien entre l'inflammation du TA et la résistance à l'insuline [55–57,59,60].

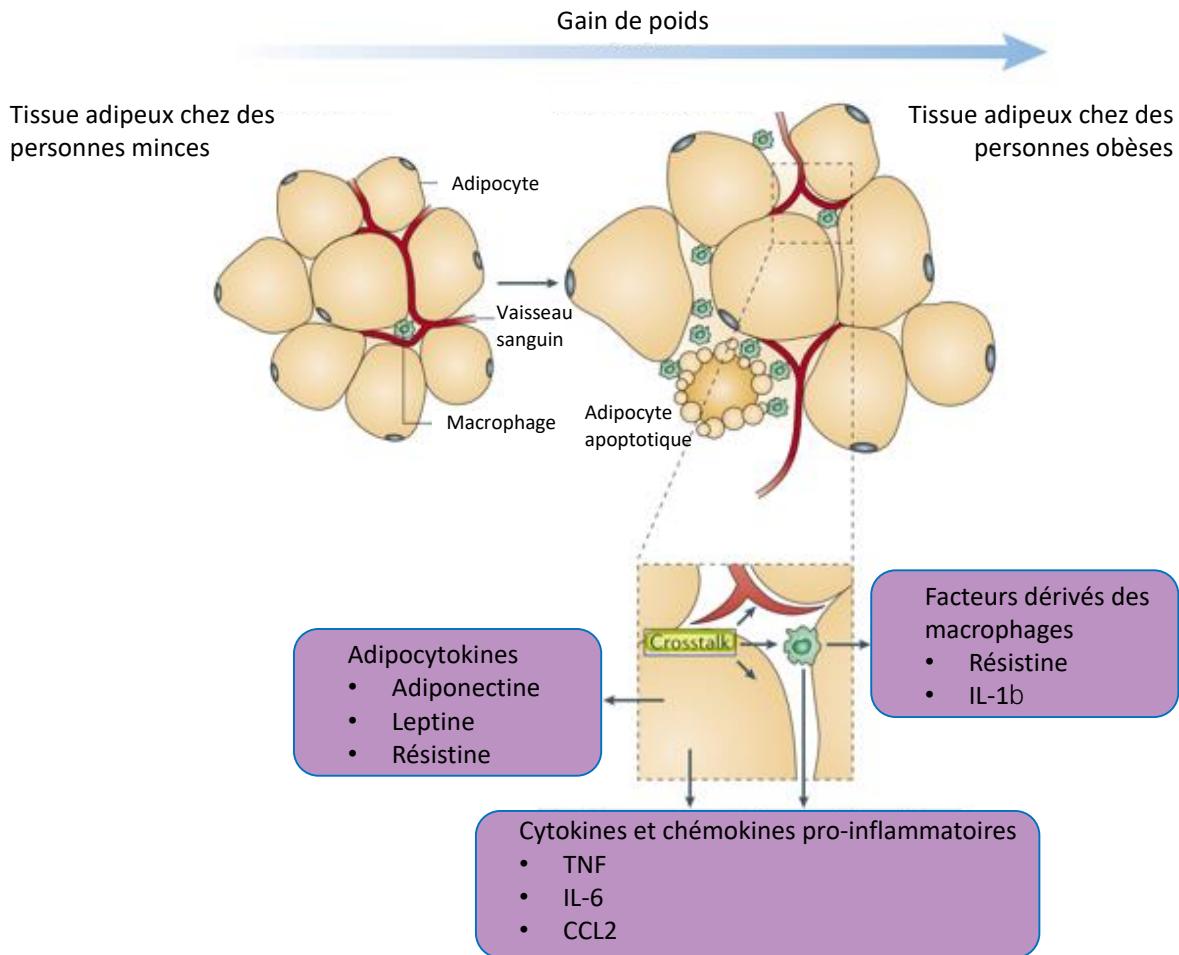


Figure 1-7 Expansion du tissu adipeux durant un gain de poids et les molécules synthétisées. Adapté de Tilg and Moschen (2006) [58] IL-1 $\beta$ : Interleukine 1- $\beta$ . CCL2 : CC-chemokine ligand 2.

#### 1.2.4. L'insulinorésistance au niveau du foie et des muscles squelettiques.

Le terme « insulinorésistance », réfère à une déficience de l'action de l'insuline, sur les tissus cibles tels que le muscle, le foie ou encore le tissu adipeux [65]. En effet, pour un taux sanguin d'insuline normal, les personnes atteintes d'insulinorésistance présentent des difficultés à maintenir une réponse hypoglycémiant normale, impliquant la suppression de la production de glucose endogène, la suppression de la lipolyse, la captation cellulaire du glucose plasmatique et la synthèse du glycogène. Petersen et Shulman ont très récemment répertorié tous les mécanismes pouvant être impliqués dans le développement de l'insulinorésistance (figure 1-8) [35]. Les auteurs ont conclu que l'élément fondamental qui relie tous les

mécanismes présumés de la résistance à l'insuline est un surplus de nutriments comme les sucres, lipides ou protéines (figure 1-8).

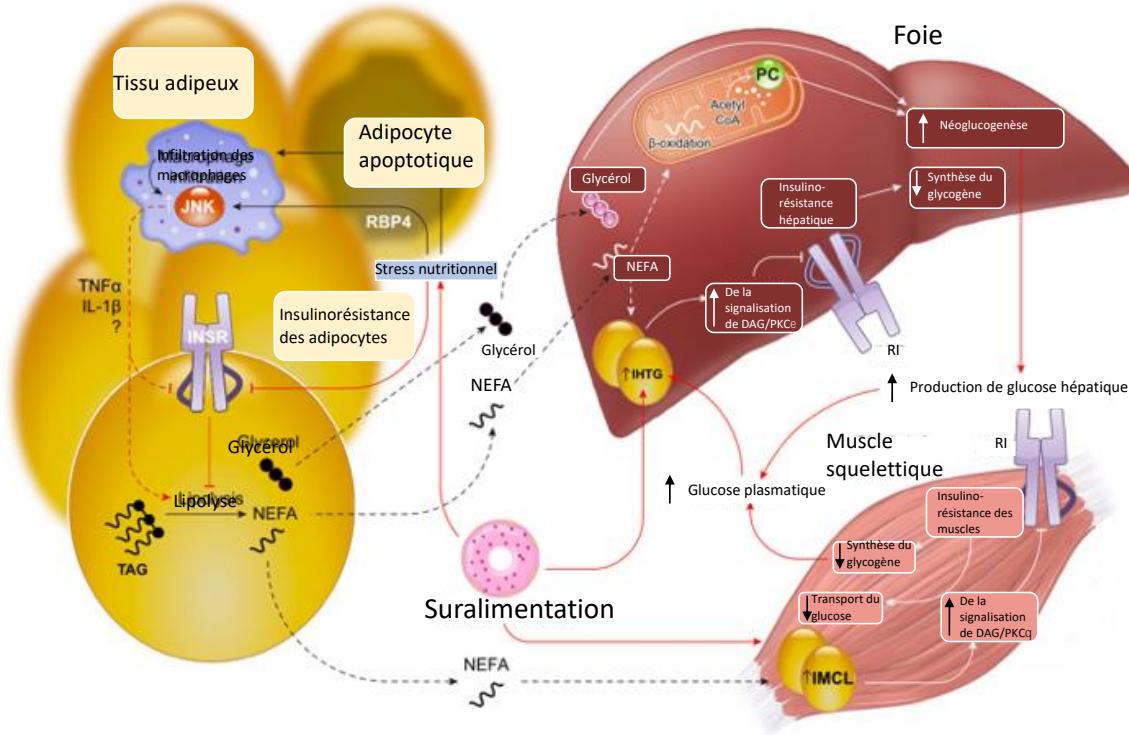


Figure 1-8 Mécanismes mettant en cause la surnutrition dans l'établissement de l'insulinorésistance des tissus cibles de l'insuline. Tirée de Petersen & Schulman, 2018 [35]

Ainsi, comme présenté dans la figure 1-8, l'apport excessif de nutriments dans le sang et particulièrement de sucres et lipides engendre, via trois principaux mécanismes, l'insulinorésistance des tissus périphériques.

Tout d'abord, cet apport important de glucose et de lipides peut être toxique pour la cellule ; on parle de glucotoxicité et de lipotoxicité. Cette toxicité engendre différents stress au niveau des tissus périphériques notamment le stress du réticulum endoplasmique [66] et le stress oxydatif mitochondrial. Ces deux types de stress peuvent altérer les voies de signalisation de l'insuline via la réponse UPR (de l'anglais, unfolded protein response) dans le premier cas ou l'accumulation de ROS dans le deuxième cas [35].

Ensuite, les nutriments comme les sucres, lipides ou encore protéine, une fois internalisés dans la cellule, vont subir une série de transformation, par exemple enzymatique et ainsi produire des métabolites primaires ou secondaires. À forte concentration, ces métabolites peuvent être toxiques pour la cellule. C'est par exemple le cas des dérivés lipidiques tels que les diacyglycérols, les céramides ou encore l'acylcarnitine qui ont un effet inhibiteur sur les voies de signalisation de l'insuline, diminuant ainsi la translocation de GLUT4 à la membrane des cellules des tissus périphériques et finalement l'absorption et l'utilisation du glucose [67–69]. D'autres études ont rapporté que les acides aminés et notamment les acides aminés à chaîne ramifiée (Leu, Ile et Val) pouvait activer la voie de signalisation mTORC1/S6K1 (mTOR qui est la cible de la rapamycine chez les mammifères et S6K1 est la protéine S6 Kinase 1). L'activation de cette voie métabolique par les acides aminés pourrait induire la résistance à l'insuline au niveau des muscles et du foie [70]. En effet, l'activation de la voie mTORC1/S6K1 résulte à la dégradation de IRS-1 menant à une perte de l'activité de la phosphoinositide 3-Kinase [4,70,71].

Aujourd'hui de nombreuses études s'intéressent au lien entre le microbiote intestinale (de plus en plus considéré comme un organe à part entière [72]) et l'insulinorésistance. En effet, des études ont démontré qu'une altération de la flore intestinale (dysbiose) et une inflammation intestinale peuvent fragiliser la barrière intestinale. Cette dernière devient alors perméable, notamment aux acides gras libres pouvant par la suite favoriser un état inflammatoire prédisposant l'apparition de l'insulinorésistance et du DT2.

Néanmoins, en réponse à ce défaut d'utilisation du glucose, les cellules  $\beta$  vont travailler à rétablir une glycémie normale.

### **1.2.5. Le dysfonctionnement des cellules $\beta$ dans la sécrétion d'insuline.**

Chez les personnes atteintes d'insulinorésistance, le développement du DT2 n'est pas systématique. En revanche, le dysfonctionnement dans la réponse sécrétrice de l'insuline des cellules  $\beta$  associée avec une insulinorésistance, résulte par le développement du DT2.

Lors de l'établissement de l'insulinorésistance, en réponse à un stimulus plus important du glucose, la productivité et la quantité des cellules  $\beta$  augmentent dans le pancréas [73]. Ainsi, la sécrétion plus importante d'insuline (4 à 5 fois plus importante que chez un individu sain) ainsi qu'une augmentation de la masse cellulaire  $\beta$  d'environ 50% permettent de rétablir une glycémie normale. Cependant, le DT2 est une maladie progressive et l'un des facteurs responsables du développement du DT2 est le manque d'efficacité des cellules  $\beta$  à contrôler la glycémie. Plusieurs mécanismes ont été proposés afin d'expliquer ce dysfonctionnement des cellules  $\beta$ . par exemple l'effet toxique du glucose (glucotoxicité), des acides gras libres (lipotoxicité), le stress du réticulum endoplasmique rugueux, la présence de dépôts d'amyloïdes ou encore le développement d'un processus inflammatoire [74].

Les deux états pathologiques (l'insulinorésistance et le dysfonctionnement des cellules  $\beta$ ) s'influencent mutuellement et induisent le diabète de manière synergique [75]. Ainsi, aujourd'hui les solutions médicamenteuses apportées pour traiter le diabète visent à potentialiser l'effet de l'insuline sur les tissus devenus résistant ou encore à stimuler la synthèse et la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$ .

#### **1.2.6. Traitement du diabète de type 2.**

Lors de la phase de pré-diabète ou d'insulinorésistance, des modifications des comportements permettent de prévenir le développement du DT2. En effet, de nombreuses études ont rapporté que la consommation régulière d'aliments nutritifs de faibles densités énergétiques ainsi qu'une activité physique régulière pouvaient réduire l'incidence du DT2. La plus grande étude de prévention du DT2 a été menée aux États-Unis sur 3819 personnes présentant un indice de masse corporelle d'au moins 24 et une intolérance au glucose [76]. Le programme de prévention du diabète a assigné au hasard les participants à l'un des quatre groupes suivants : intervention hygiénodiététique intensive, thérapie à la metformine avec intervention hygiénodiététique standard, placebo avec intervention hygiénodiététique standard, et un dernier groupe avec un traitement au troglitazone avec une intervention hygiénodiététique standard. Ce dernier groupe a été arrêté avant la fin de l'étude en raison de préoccupations liées aux effets secondaires du médicament notamment des effets toxiques

sur le foie. Finalement, l'incidence du diabète dans le groupe ayant subi une intervention hygiénodiététique intensive a été réduite de 58% par rapport au groupe témoin. De plus, ce même groupe a démontré une incidence du diabète inférieure par rapport au groupe traité avec la metformine [76]. D'autres études similaires ont été menées en Suède [77], Chine [78] et en Finlande [51], avec des résultats similaires, à savoir que les mesures hygiénodiététiques seraient efficaces pour réduire l'incidence du DT2 [79].

Cependant, une proportion élevée des personnes à risques ne suit pas ces recommandations, si bien que le DT2 continue de progresser [80]. De plus, Le DT2 est une maladie progressive caractérisée par une aggravation constante du contrôle de la glycémie [81,82]. Il est donc bien souvent nécessaire d'adopter une stratégie utilisant des médicaments afin de réduire sa progression une fois établie [81,82]. Actuellement, le traitement du diabète de type 2 repose principalement sur plusieurs approches visant à réduire l'hyperglycémie elle-même : l'utilisation des sulfonylurées (et les sécrétagogues de l'insuline associés), qui augmentent la libération d'insuline par les îlots pancréatiques; la metformine, qui agit pour réduire la production de glucose hépatique; les agonistes du récepteur- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activé par les proliférateurs des peroxysomes (thiazolidinediones), qui renforcent l'action de l'insuline; les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase, qui interfèrent avec l'absorption du glucose dans l'intestin; l'insuline elle-même, qui supprime la production de glucose et augmente son utilisation par les cellules musculaires notamment. Ces thérapies ont une efficacité et une tolérance limitée et induisent l'apparition d'effets secondaires significatifs (tableau 1-1). En effet, il a été rapporté que certains médicaments, comme les sulfonylurées, les thiazolidinediones ou encore les traitements avec de l'insuline pouvaient entraîner une augmentation du poids chez les patients [83–85]

Malgré les nombreuses stratégies mises en place, la prévalence du DT2 continue d'augmenter, engendrant inévitablement une augmentation des coûts associés au traitement de cette maladie et de ses complications. Au Canada, ces coûts étaient de 14 milliards de \$CAN en 2015 et devraient s'élever à 17.4 milliards de \$CAN en 2025 [46].

*Tableau 1-1 Différentes classes de médicaments utilisées dans le traitement du diabète de type 2, ainsi que le coût quotidien de l'utilisation de ces traitements. D'après David E. Moller (2001) [46,83].*

Classe de médicaments	Cible moléculaire	Sites d'ac-tion	Effets indési-rables	Coûts par jours*
Insuline ** sulfonylurées Biguanide : Metformine Acarbose thiazolidinediones Incrétines	Récepteurs de l'insu-line	Foie, muscles, tissu adi-peux	Hypoglycémie, gain de poids	Entre 2,54 et 4,68\$ ***
	SU récepteur / K <sup>+</sup> ATP channel	Cellules β du pancréas	Hypoglycémie, gain de poids	0,30 \$
	Activation de la voie AMPK (légère inhibi-tion du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale I)	Foie	Acidose lactique, troubles digestifs	0,29\$
	α-glucosidase	Intestin	Trouble digestif	
	PPAR $\gamma$	Foie, muscles, tissu adi-peux	Gain de poids, œdème, anémie	
	DPP-4	Cellules β du pancréas	Pharyngite, mal de tête.	2,85\$

\* Pour chaque médicament, une majoration de 10 % et de 8,83 \$ en frais de pharmacie a été ajoutée par période de 90 jours. Il a été supposé que les patients avaient utilisé la dose quotidienne moyenne déterminée (DDD) de l'Organisation mondiale de la santé pour chaque traitement.

\*\* Les coûts totaux quotidiens pour les différentes insulines reposent sur le poids supposé de 87 kg.

Dans ce contexte, les nutraceutiques, molécules naturelles possédant des propriétés bénéfiques sur la santé, offrent une alternative intéressante dans la prévention et le traitement du DT2. En effet, de plus en plus d'études démontrent des effets bénéfiques sur DT2 de ces

produits tels que les acides gras, les hydrolysats protéiques et les peptides bioactifs provenant de coproduit marins.

## **1.3. Les coproduits de poissons et leur valorisation.**

### **1.3.1. État des lieux**

La société humaine moderne fait face, aujourd’hui à l’un de ses plus grands défis : devoir nourrir une population toujours plus grandissante, tout en protégeant ses ressources naturelles qui s’appauvrisse d’année en année. Les océans n’échappent pas à cette réalité ; environ 91 millions de tonnes de poissons et de crustacés ont été pêchés en 2016 à travers le monde et un peu plus de 80 millions de tonnes ont été produites via l’aquaculture [86]. Sur ces 171 millions de tonnes de poisson produites annuellement, c’est environ 88% qui ont directement servi pour l’alimentation humaine, les 12% restant (environ 20 millions de tonnes) ont principalement servi à la production de farine et d’huile de poisson. Parmi les 88% de poissons ou crustacés utilisé pour l’alimentation humaine, 45% sont consommés sous la forme de poissons frais et 55% sont transformés industriellement, générant donc des déchets ou nouvellement appelés des coproduits [87].

### **1.3.2. Les coproduits de l’industrie de transformation du poisson.**

La proportion de coproduits, va être différente selon le poisson utilisé, le produit final souhaité et donc le procédé de transformation utilisé. Par exemple, pour un saumon vidé, 17% du poisson (principalement les viscères) est considéré comme un coproduit, alors que ce pourcentage peut atteindre 45% pour la production de filets de saumon et 70% pour la production de boîtes de thon [87]. Ces coproduits, peuvent être de différentes natures comme la tête, les viscères, les arrêtes, les restes de découpe, la peau ainsi que les poissons endommagés et donc impropre à la vente. Ils constituent, de par leur richesse en composés encore actifs, de nouvelles ressources à haut potentiel de valorisation [88].

En effet, des composés bioactifs tels que les oligosaccharides, les acides gras, les enzymes, les minéraux, les biopolymères ou encore les protéines et peptides bioactifs (PBs), peuvent prétendre à une seconde vie dans le domaine des biotechnologies, de la pharmacologie, de la

cosmétique ou encore des nutraceutiques [9]. Ainsi, dans le domaine des nutraceutiques, les coproduits marins sont principalement utilisés pour la production d'huile riche en  $\omega$ -3. Cependant, ils contiennent également de 10 à 20% de protéines du poisson qui ont démontré, sous leur forme native ou hydrolysée, des propriétés contre le DT2 lors d'études *in vivo* et *in vitro*. Pour la suite de cette revue de la littérature, une attention particulière sera mise aux peptides bioactifs.

### 1.3.3. Valorisation des protéines de poisson

#### 1.3.3.1. Composition protéique des muscles de poisson.

Les protéines et PBs se retrouvent plus particulièrement dans les muscles de poissons qui sont constitués à 98% d'eau, de protéines et de lipides. Les 2% restant se composent majoritairement de vitamines, minéraux et sucres. À titre d'exemple, les muscles du saumon d'Atlantique (*salmo salar*) sont composés de 66,3% d'eau ; 20% de protéines et 3,7% de lipides. Ces proportions restent relativement similaires parmi les différentes espèces, comme présentées dans le Tableau 1-2 [89].

Tableau 1-2 Composition des muscles de certains poissons. Adapté de Venugopal et Shahidi (1996) [89]

Espèces	Teneur en eau	Teneur en protéines (%)	Teneur en lipides (%)
	(%)		
<i>Morue de l'atlantique</i>	82,5	19,4	0,3
<i>Hareng de l'atlantique</i>	69	17.3	11.3
<i>Maquereau de l'atlantique</i>	74.1	22.8	11.4
<i>Saumon de l'atlantique</i>	66.3	20	3.7
<i>Truite arc-en-ciel</i>	66.3	21.5	11.4
<i>Thon rouge de l'atlantique</i>	71.2	20	10.5

Les protéines sont des macromolécules composées d'un enchaînement d'AAAs liés entre eux par des liaisons peptidiques. Un AA est formé d'un carbone auquel sont liés une fonction amine ( primaire NH<sub>2</sub>) et un acide carboxylique (COOH) ainsi qu'une chaîne latérale propre à chaque AA, appelée radical. Les protéines sont synthétisées naturellement à partir de 20 AA codés par le génome, mais il existe plus d'une centaine d'AAAs [90]. Parmi ces AAAs, 11 sont qualifiés de non essentiels pour l'humain, car ils peuvent être produits par l'organisme à partir d'autres protéines. Cependant, les 9 autres (His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Val, Thr) sont qualifiés d'essentiels, car ils ne peuvent pas être produits par l'organisme et doivent absolument provenir de l'alimentation. L'arginine, Arg, est également un dixième AA essentiel pour l'enfant seulement. Les protéines et peptides de muscles de poissons, présents par exemple dans les coproduits de filetage, peuvent représenter jusqu'à 20% des muscles. On peut classer ces protéines en trois grandes catégories : les protéines myofibrillaires, les protéines sarcoplasmiques et les protéines du stroma.

- Les protéines myofibrillaires, sont composées de protéines de structures, la myosine et l'actine, et de protéines régulatrices comme la tropomyosine, la troponine et l'actinine. La myosine représente entre 50 et 80% des protéines myofibrillaires et se compose de deux chaînes lourdes (200 et 240 kDa) associées à deux paires de chaînes légères (17 et 20 kDa). De plus, la myosine se caractérise par une forte teneur en acide glutamique et aspartique, ainsi qu'une faible teneur en lysine, histidine et arginine.
- Les protéines sarcoplasmiques, présentes dans le sarcoplasme, peuvent représenter 20 à 25% des protéines totales du poisson. Ce sont généralement des protéines de petits poids moléculaires, par exemple l'albumine, myoglobine, hémoglobine, des enzymes, des protéines fixant le calcium (calcium-binding proteins), par exemple la calmoduline et la parvalbumine. Ces protéines sont majoritairement solubles dans l'eau.
- Les protéines du stroma : le collagène, l'élastine et la gélatine sont les protéines les moins solubles dans l'eau.

Les protéines de poissons sont depuis longtemps reconnues pour leurs propriétés nutritives [91]. En effet, en raison de leur sensibilité à la protéolyse, elles sont hautement digestibles (>90 %)[92]. De plus, les protéines de poisson ont une teneur supérieure en AAs essentiels, particulièrement en méthionine et lysine, ou encore en histidine pour le maquereau et le thon, par rapport à d'autres sources protéiques, comme la viande, les végétaux ou la caséine [92,93]. En plus, de leurs qualités nutritives, de nombreuses études ont démontré les effets bénéfiques de protéines, d'hydrolysat protéiques et de peptides de poissons sur la santé humaine et notamment leurs bienfaits sur le syndrome métabolique[94], l'inflammation [13], le diabète de type 2 [11,12] et les maladies cardio-vasculaires [95].

### **1.3.3.2. Effets de protéines et hydrolysats protéiques de poissons contre le DT2**

Depuis plusieurs années, des études ont démontré les bienfaits de protéines de poisson sur le DT2 et ses facteurs de risques. En effet, une première étude en 2000 a démontré que les protéines de morues permettaient d'améliorer la sensibilité à l'insuline et notamment au niveau des muscles squelettiques encore une fois en comparaison avec la caséine [11]. De plus, la consommation de protéines de morues a permis de normaliser la voie PI3K/Akt améliorant ainsi la translocation de GLUT4 et donc le transport du glucose dans la cellule [96]. Finalement, l'effet bénéfique de la consommation de protéines de poissons contre le DT2 et ses facteurs de risques a été confirmé chez l'humain. En effet, la consommation de protéines de morue a permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline et une réduction de l'inflammation systémique chez des sujets en surpoids et insulinorésistants [97,98]. Une étude plus récente a démontré que d'autres protéines de poisson, et notamment de sardines, permettaient d'améliorer la tolérance au glucose et réduisait l'insulinorésistance avec notamment une réduction de marqueurs de l'inflammation le TNF- $\alpha$ , de la leptine, ainsi qu'une diminution du stress oxydatif dans le tissu adipeux, chez le rat et comparativement à la caséine [99].

D'autres études ont exploré les effets de la consommation d'hydrolysats de protéines de poisson sur le DT2 et ses facteurs à risques. En effet, la digestion des protéines pourrait libérer des peptides présentant des activités biologiques. L'une des études a comparé l'effet

d'hydrolysats de protéines de différents poissons, comme la bonite, le hareng, le maquereau et le saumon [13]. La consommation de ces hydrolysats a permis de réduire l'inflammation dans le tissu adipeux, avec une réduction des facteurs de l'inflammation comme le TNF- $\alpha$  et l'IL6, chez le rat [13]. Cependant, seul l'hydrolysat de protéines de saumon (SPH) permettait de limiter le gain de poids et de conserver la sensibilité à l'insuline et ainsi, d'améliorer le métabolisme du glucose chez le rat sous diète obésogène (diète riche en gras et en sucre) [13]. De plus, une étude publiée en 2010, a rapporté des effets positifs sur le DT2 d'oligopeptides issus de coproduits de saumon, obtenus après l'utilisation d'un mixte enzymatique et le retrait des protéines non hydrolysées [100]. En effet, ces oligopeptides ont permis de diminuer la glycémie à jeun. Les auteurs ont de plus observés que cet effet antidiabétique pouvait être dû à une diminution du stress oxydatif et de l'inflammation (diminution de l'expression de cytokines inflammatoires comme TNF- $\alpha$  et de l'interféron- $\gamma$ ), protégeant ainsi les cellules  $\beta$  de l'apoptose chez des rats diabétiques [100].

D'autres études ont confirmé l'effet anti-inflammatoire d'hydrolysats de saumon [4,13,100,101] en raison notamment de la diminution du recrutement des macrophages. De plus, les effets bénéfiques sur la tolérance au glucose [4,102] pourraient en partie résulter d'une meilleure sécrétion d'insuline via l'inhibition de la dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) [102,103]. Toutes ces études indiquent donc que les peptides de saumon peuvent avoir de nombreux bienfaits sur le DT2.

Finalement, en plus des protéines et peptides, les AAs peuvent aussi jouer un rôle positif contre le DT2. En effet, des études ont démontré que l'arginine pouvait améliorer la sensibilité à l'insuline chez le rat et la souris [104–108]. La taurine pouvait elle aussi améliorer la sensibilité à l'insuline *in vitro* [109–111], chez l'animal et chez l'humain. La glycine diminuerait l'inflammation via l'activation de la peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) [112]. A contrario, la leucine semble promouvoir l'insulinorésistance en activant la voie *mammalian target of rapacyn/ ribosomal S6 kinase* (mTOR/S6K1) qui diminuerait l'activation de la voie PI3K/IRS-1 [71].

### **1.3.3.3. Effets d'hydrolysats protéiques de saumons contre le DT2**

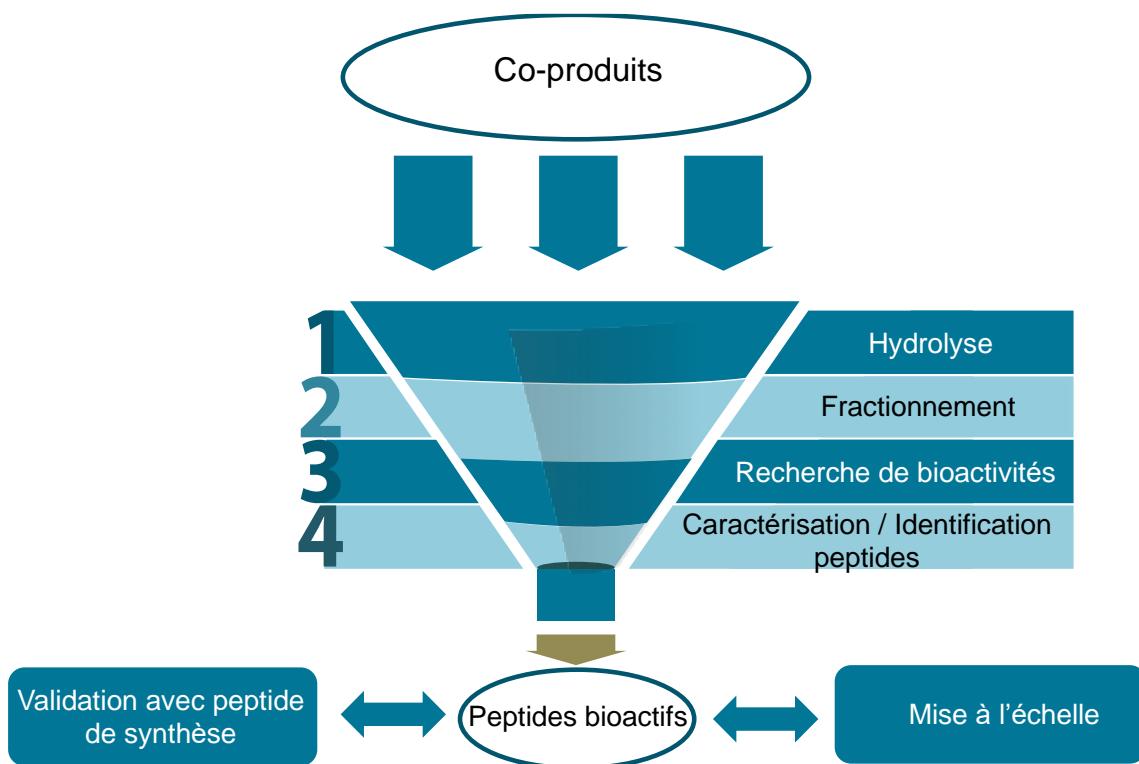
Lors de ce travail de doctorat, nous nous sommes donc intéressés aux peptides bioactifs, possédants des propriétés contre le DT2, présents dans un hydrolysat de coproduits de saumon. Cet hydrolysat de protéines de coproduits de saumon (SPH, pour Salmon Protein Hydrolysate) a été obtenu par la digestion successive d'enzymes gastro-intestinales, tel que la pepsine, trypsine et chymotrypsine. Puis ultrafiltrés à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 1 kDa, finalement le perméat obtenu à par la suite était testés sur différents modèles cellulaires. En effets, lors de précédentes études, effectuées par l'équipe du professeur André Marette ce SPH a démontré des propriétés glucorégulatrices et anti-inflammatoires *in vitro* [4]. En effet, le SPH a démontré sa capacité à réduire la production de glucose dans les hépatocytes FAO [4] et à augmenter le transport du glucose dans les myocytes L6 [4,113]. Il a de plus démontré la capacité de réduire la quantité de monoxyde d'azotes (NO) induite par le LPS (lipopolysaccharide) par rapport à la caséine hydrolysée [4], dans les macrophages J774 [4]. Le LPS est utilisé dans les tests *in vitro* comme témoin positif, car ce constituant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif est reconnu pour ses effets inflammatoires. Cette diminution de la production de NO démontre une réduction de l'activité de la forme inducible du monoxyde d'azote synthase (iNOS). L'iNOS est une enzyme qui catalyse la production de NO en réponse à un stimulus inflammatoire. Dans l'obésité, iNOS est activée de façon chronique, ce qui contribue à la résistance à l'insuline en inhibant la voie de signalisation de l'insuline [114].

Ces mêmes capacités ont été observé chez un modèle animal [4]. Dans une étude réalisée par Chevrier et al (2015) où 50% des protéines ont été remplacées par du SPH. Les auteurs ont de nouveau observé des effets gluco-régulatoires et anti-inflammatoires en améliorant la signalisation de l'insuline au niveau hépatique et en réduisant l'inflammation dans le tissu adipeux viscéral par rapport au groupe dont l'apport protéique était exclusivement issus de caséines [4]. Ces résultats indiquent donc que le SPH a des propriétés anti-inflammatoires et gluco-régulatrices [4]. En 2016, Roblet *et al* ont testé le SPH sur la captation du glucose dans des myocytes L6 [113]. Dans cette étude, le SPH n'a pas démontré une augmentation statistiquement significative de la captation du glucose, contrairement aux études antérieures. Ces différences entre les résultats pourraient être dû à des différence entre les SPH utilisés qui sont issus de deux productions différentes. Cependant, dans l'étude de Roblet *et al*, une

étape de séparation supplémentaire a permis de concentrer des peptides actifs dans des fractions démontrant une bioactivité. Ces résultats démontrent la complexité de travailler avec des hydrolysats protéiques. En effet, ces hydrolysats générés à partir de coproduits alimentaires peuvent contenir plus d'un millier de composés. Ainsi, la bioactivité de ces peptides peut être altérée par des interactions entre peptides, ou peut-être diluée dû à un trop grand nombre de peptides inactifs. C'est pourquoi il est essentiel de maîtriser le procédé de production des peptides bioactifs.

## 1.4. Production de peptides bioactifs

Les PBs sont des molécules de faibles poids moléculaires (généralement inférieurs à 6000 Da) [115] possédant un enchaînement d'acides aminés (AAs) bien défini (de 2 à 20 AAs) [14]. La production de peptides bioactifs nécessite donc une première étape d'hydrolyse, suivie d'une étape de fractionnement de l'hydrolysat pour finalement aboutir à l'étape d'identification des séquences peptidiques (Figure 1-9).



*Figure 1-9 Principales étapes pour l'identification de peptides bioactifs à partir d'un coproduit alimentaire.*

### **1.4.1. Production d'un hydrolysat protéique de coproduits alimentaires**

Les PBs sont encryptés dans la structure primaire des protéines, sous la forme d'une séquence d'acides aminés inactive. Ils peuvent être libérés par hydrolyse chimique, par la fermentation microbienne ou encore l'hydrolyse enzymatique des protéines [116].

#### **1.4.1.1. Hydrolyse chimique :**

L'hydrolyse chimique peut, soit faire intervenir des acides (HCL), on parlera alors d'hydrolyse acide, soit des bases (NaOH, KOH), on parlera alors d'hydrolyse alcaline. L'utilisation d'acides ou de bases comme agents catalyseurs de l'hydrolyse induit des effets non désirés sur les AAs. En effet, l'hydrolyse acide entraîne la transformation de l'asparagine et de la glutamine en acide aspartique et acide glutamique respectivement, la destruction du tryptophane, de la tyrosine ou encore l'hydrolyse partielle de la serine et du tryptophane (environ 10 et 5 % de perte, respectivement)[117]. L'utilisation d'agents alcalins, peut aussi avoir des effets non désirés sur les acides aminés, comme la destruction de la serine, thréonine, arginine ou encore cystéine ainsi que la racémisation des autres acides aminés; seul le tryptophane reste stable en condition alcaline [117]. Ce procédé était populaire pour sa rapidité et son faible coût. Cependant, l'hydrolyse non sélective et la perte d'AAs essentiels (Leu, Thr, Tyr, Phe, Val, Met, île) génèrent des hydrolysats de faible qualité, à la fois sur le plan nutritif, mais aussi fonctionnel. Ces hydrolysats générés, par un procédé d'hydrolyse chimique, ne sont pas utilisables pour la production de molécules à hautes valeurs ajoutées [118].

#### **1.4.1.2. Fermentation microbienne**

L'hydrolyse par fermentation microbienne implique de cultiver des bactéries ou des levures en présence d'une matrice protéique afin d'hydrolyser les protéines avec les enzymes produites par les microorganismes au cours de leur croissance [119]. Le système protéolytique des microorganismes est composés de peptidases liés à la paroi extracellulaire des microorganismes ou de peptidases intracellulaire pouvant être sécrétées comme des

endo-, amino-, tri- ou di-peptidases [120]. Les hydrolysats générés vont dépendre de la souche et des conditions de cultures utilisées et de la source protéique [119]. En effet, une étude réalisée par Ahn et al (2009) [121] sur l'hydrolyse par différentes espèces de *Lactobacillus* (*Lb*) a démontré que la souche utilisée pouvait impacter la bioactivité générée. Ainsi les auteurs ont observé que l'hydrolyse obtenu par *Lb. brevis* avait un pouvoir antioxydant supérieur que ceux générés par *Lb. acidophilus*, *Lb. bifementan*, *Lb. casei*, *Lb. helveticus*, *Lb. lactis*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* and *Lb. reuteri* [121]. Ce qui démontre que les hydrolysats générés et donc leur bioactivité varie selon la souche utilisée du fait que les microorganismes possèdent des systèmes protéolytiques différents [119,122]. Si de nombreuses recherches ont montré la possibilité de générer des peptides bioactifs à partir de produits laitiers, très peu d'études ont démontré l'utilisation de la fermentation par des microorganismes pour générer des hydrolysats bioactifs [116,123,124]. En effet, l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique est souvent préférée à la fermentation microbienne en raison du temps de réaction plus court, de la facilité de mise à l'échelle et de la prévisibilité et répétabilité des peptides formés [119].

#### **1.4.1.3. Hydrolyse enzymatique :**

La méthode la plus utilisée pour générer des PBs à partir des protéines natives est l'hydrolyse enzymatique. Les enzymes hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines afin de générer des molécules de plus faible poids moléculaire, sont appelées des protéases (figure 1-10) [115]. On retrouve des protéases de grade alimentaire, dérivées de micro-organismes (tels que l'Alcalase, Flavorzyme et Protamex), ainsi que des enzymes d'origine végétale (par exemple, papaïne) et de sources animales (par exemple, la pepsine et la trypsine).

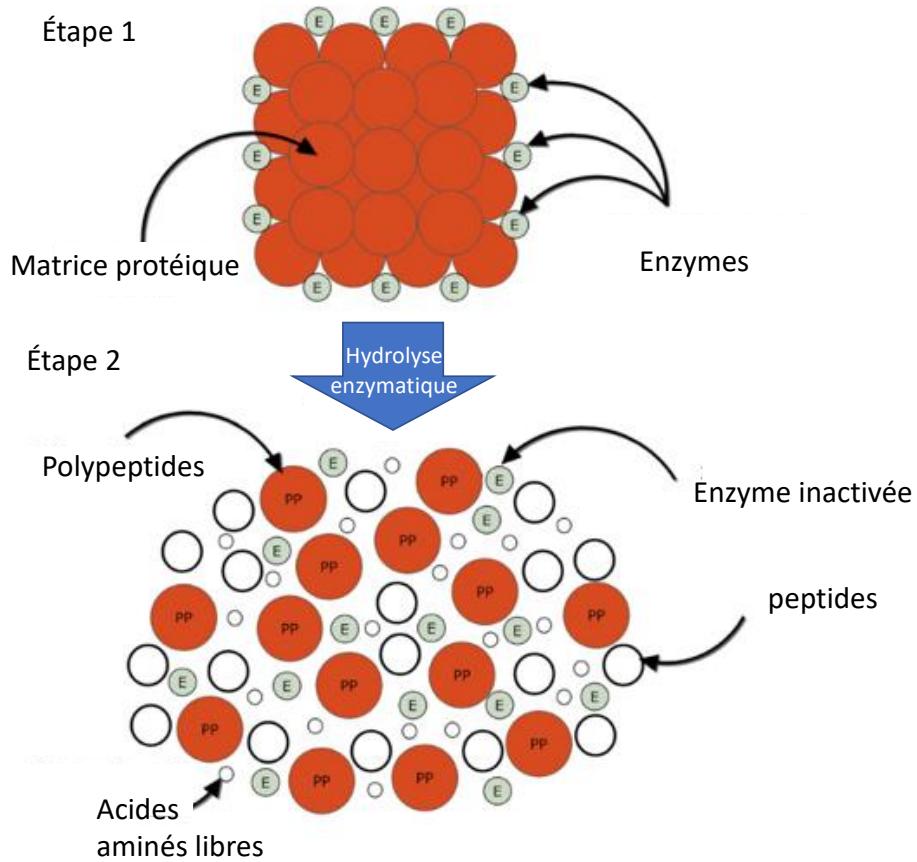


Figure 1-10 Schéma d'une protéine avant l'hydrolyse enzymatique (étape 1) et après l'action des enzymes (étape 2)[115]

Les protéases sont classées en deux familles, selon leurs modes d'action; on retrouve les endopeptidases (qui vont couper les liaisons peptidiques à l'intérieur de la molécule et ainsi libérer des peptides de différents PM) et les exopeptidases (qui vont couper les liaisons peptidiques à l'extérieur de la molécule et ainsi libérer des acides aminés) [115]. Parmi les exopeptidases, il faut distinguer les aminopeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques à partir de l'extrémité N-term des protéines des carboxylpeptidases qui hydrolysent les liaisons peptidiques à partir de l'extrémité C-term (figure. 1-11).

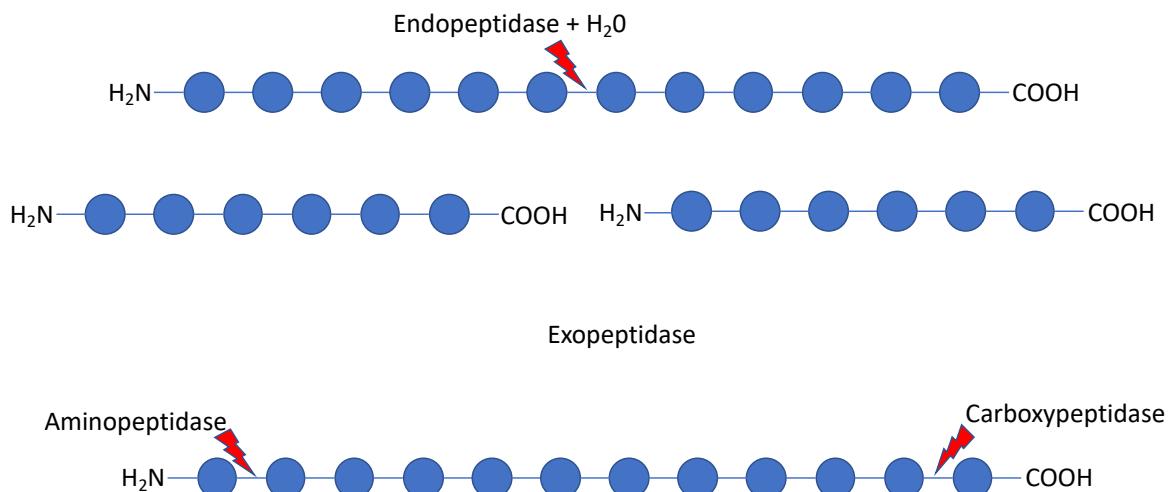


Figure 1-11 Différentes familles d'enzyme en fonction de leur mode d'action.

Les endopeptidases sont subdivisées en quatre familles, en fonction de leur mécanisme d'action et de la présence spécifique d'AAAs ou d'un atome métallique dans le site actif de ces enzymes.

- Protéases à sérine : elles possèdent une triade catalytique formée de trois AAAs (Ser-His-Asp), par exemple la trypsine et la chymotrypsine.
- Protéases à cystéine : elles possèdent une cystéine sur leur site actif, par exemple la papaïne.
- Protéases acides : elles possèdent un acide aspartique sur leur site actif, par exemple la pepsine.
- Les métalloprotéases : elles possèdent un cation métallique (en général du zinc) qui va activer la molécule d'eau nécessaire pour l'hydrolyse les protéines, par exemple thermolysine.

Le choix de l'enzyme dépend du substrat et des exigences du produit final. L'efficacité de l'hydrolyse enzymatique peut être affectée par plusieurs facteurs, tels que la spécificité

des sites de coupure de l'enzyme, la température, le pH, le temps de réaction, le rapport enzyme:substrat ou le degré d'hydrolyse (DH). Une fois que l'hydrolyse enzymatique est terminée (temps de réaction ou DH % fixé est atteint), l'enzyme doit être inactivée, soit par un traitement thermique (en général 10 minutes à 80-90°C est suffisant), en diminuant le pH ou encore par ultrafiltration en retenant l'enzyme dans le rétentat [125].

L'hydrolyse *in vitro* et spécialement par l'utilisation d'enzymes est privilégiée par l'industrie alimentaire et pharmaceutique pour la production de PBs, en raison de l'absence de résidus organiques ou de solvants/produits chimiques pouvant se retrouver dans les hydrolysats finaux et d'un meilleur contrôle des sites de coupures permettant une meilleure répétabilité [126]. Néanmoins, quel que soit la méthode appliquée pour hydrolyser des protéines venant de coproduits alimentaires, les hydrolysats en résultant sont des matrices complexes pouvant contenir plus d'un millier de composés. Identifier des peptides à partir de ces matrices, c'est comme « chercher une aiguille dans une botte de foin ». Il est donc nécessaire de fractionner les hydrolysats afin de diminuer la diversité peptidique et de concentrer les PBs.

#### **1.4.2. Le fractionnement de l'hydrolysat**

Cette étape de fractionnement, permettant l'extraction et/ou la concentration en peptides d'intérêt, est indispensable pour générer des bioactivités à partir d'hydrolysats inactifs et ainsi permettre la valorisation des coproduits [17,127]. Les principales techniques utilisées pour le fractionnement d'hydrolysats complexes sont des techniques chromatographiques ou membranaires. Ces techniques vont permettre la séparation des peptides en fonction d'un ou de plusieurs paramètres intrinsèques, comme le poids moléculaire, la charge, le degré d'hydrophobicité/hydrophilicité, mais aussi de l'encombrement stérique de ces peptides (Tableau 1-3)

Tableau 1-3 Principales techniques de séparation et leurs critères de sélection, d'après Przybylski (2016) [128].

<i>Procédé</i>	<i>Critère de sélectivité</i>	Poids moléculaire	Encombrement stérique	Charge	Hydrophobicité / hydrophilicité
<i>Extraction par solvants</i>	-	-	-	-	+
<i>Chromatographie par exclusion stérique</i>	+	+	-	-	-
<i>Chromatographie échangeuse d'ions</i>	-	-	-	+	-
<i>Chromatographie d'affinité</i>	-	+	-	-	-
<i>Chromatographie d'interaction hydrophile/hydrophobe</i>	-	-	-	-	+
<i>Procédés baromembranaire</i>	+	+	-	+	+
<i>Procédés électrobaromembra-naires</i>	+	+	-	+	+
<i>Procédés électromembranaires</i>	+	+	-	+	+

#### 1.4.2.1. Les procédés chromatographiques

Il existe différentes techniques de chromatographie en fonction de la propriété intrinsèque des peptides visés par la séparation.

- Les techniques chromatographiques permettant la séparation des peptides en fonction de leur charge : électrophorèse capillaire ; électrophorèse capillaire à focalisation isoélectrique ; chromatographie échangeuse d'ions... [115].
- Les techniques chromatographiques permettant la séparation des peptides en fonction du PM : chromatographie d'exclusion (gel filtration) [115].

- Les techniques chromatographiques permettant la séparation des peptides en fonction de leur polarité : chromatographie en phase liquide à haute performance (phase normale, phase inverse) [115].

Cependant, les techniques chromatographiques, des techniques très coûteuses, ne permettent de récupérer que de très faibles quantités de peptides et elles sont mal adaptées aux solutions visqueuses. En effet, les solutions visqueuses, comme certains hydrolysats protéiques, peuvent boucher les colonnes chromatographiques, ce qui nécessite l'utilisation de solvants (comme l'acétonitrile) et de grandes quantités d'eau, pour désorber les molécules d'intérêts et pose des problèmes environnementaux [129]. Ces aspects représentent de gros obstacles à leur utilisation à grande échelle. Néanmoins, elles permettent d'obtenir des fractions souvent très pures.

#### **1.4.2.2. Les procédés membranaires**

L'utilisation des procédés membranaires pour la concentration de PBs a été résumée par Bazinet et Firdaous (2013) [29]. Les procédés membranaires permettent la séparation de molécules d'intérêts depuis un hydrolysat, vers un compartiment de récupération, à travers une membrane. Le passage de ces molécules à travers la membrane va être réalisé grâce à l'application d'une force, qui peut être soit la pression, dans le cas des procédés baromembranaires, soit la pression et l'électricité dans le cas de l'électro-filtration membranaire ou seulement l'électricité dans les procédés électromembranaires [29].

##### **1.4.2.2.1. Séparation par les procédés baromembranaires**

Les procédés baromembranaires sont des technologies permettant la séparation des peptides en fonction de la taille à l'aide d'un gradient de pression. Il existe quatre procédés baromembranaires : La Microfiltration (MF), l'Ultrafiltration (UF), la Nanofiltration (NF) et l'Osmose inverse (OI) qui diffèrent selon le seuil de coupure des membranes et donc de la taille des espèces pouvant être séparées (figure 1-12).

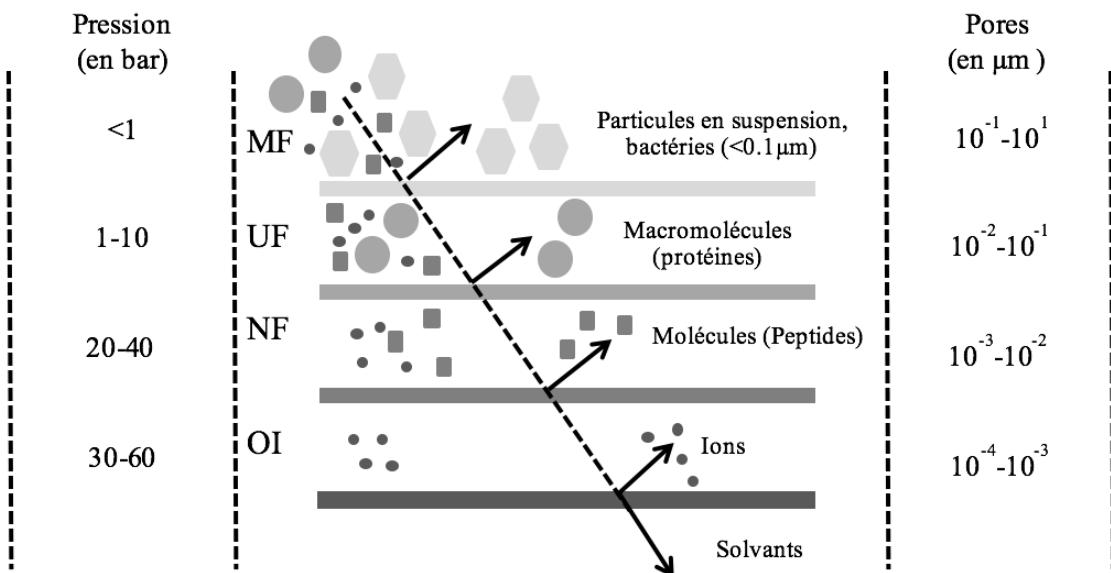
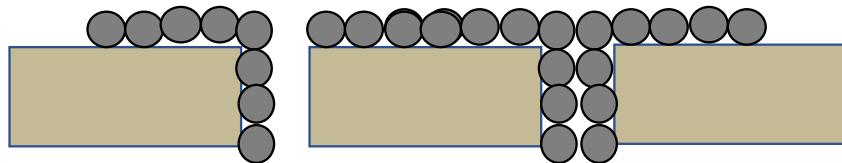


Figure 1-12 Schéma représentant les différents procédés baromembranaires, ainsi que les différentes tailles de molécules retenues par les membranes. Adapté de Suwal *et al.* (2015) [130]

Dans le cas du fractionnement d'hydrolysat protéique, les membranes d'UF et de NF seront surtout utilisées. Les procédés baromembranaires, contrairement aux procédés chromatographiques, sont des procédés peu coûteux. Ce sont des procédés dont la mise à l'échelle et l'intégration dans une chaîne de procédés sont faciles [129]. Néanmoins, les techniques baromembranaires sont basées sur l'application d'une pression, forçant le passage des molécules à travers la membrane. Cette force appliquée va favoriser l'apparition de colmatage ce qui va altérer la sélectivité au cours du temps, diminuant l'efficacité du procédé et ne permet la sélection qu'en fonction de la taille des molécules. Il est donc difficile de séparer des molécules possédant la même taille. Comme présenté dans la figure 1-13, ce colmatage peut-être dû par exemple à la formation d'une couche organique sur la membrane, ou à l'encombrement des pores [131].

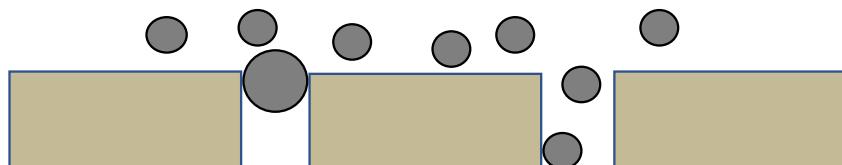
a) Rétrécissement des pores dû à l'absorption des molécules



b) Blocage des plus petits pores



c) Blocage des pores par de plus grosses molécules



d) Formation d'un gel organique à la surface des membranes

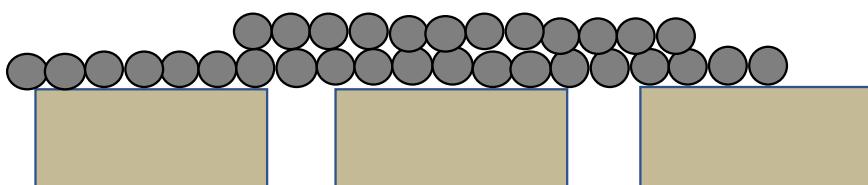


Figure 1-13 Schéma des différents mécanismes pouvant entraîner le colmatage des membranes de filtration, d'après Saxena et al., 2009 [131]

Afin de diminuer le colmatage, des membranes d'UF chargées ont été développées, permettant par répulsions électrostatiques la diminution du colmatage et par interactions électrostatiques d'augmenter la sélectivité du procédé.

Cependant, les techniques de UF et NF, basées seulement sur la pression comme force motrice, permettent la séparation des molécules uniquement en fonction de la différence de taille. Dans un mélange complexe, tel un hydrolysat protéique, il sera très difficile de séparer plusieurs peptides présentant des tailles similaires [132,133]. Ainsi, des techniques utilisant

une deuxième force motrice comme l'électricité ont été développées, par exemple l'électro-ultrafiltration ou l'électro-nanofiltration [131].

#### 1.4.2.2.2. Séparation par les procédés électro-baromembranaires

L'électro-filtration par membranes utilisant principalement des membranes d'ultrafiltration (électro-ultrafiltration) ou des membranes de nanofiltration (électro-nanofiltration) utilise comme forces motrices à la fois la pression et l'électricité. Ainsi, la migration des molécules d'intérêts peut se faire en fonction de la masse moléculaire, mais aussi de la charge ou du point isoélectrique des molécules (figure 1-14).

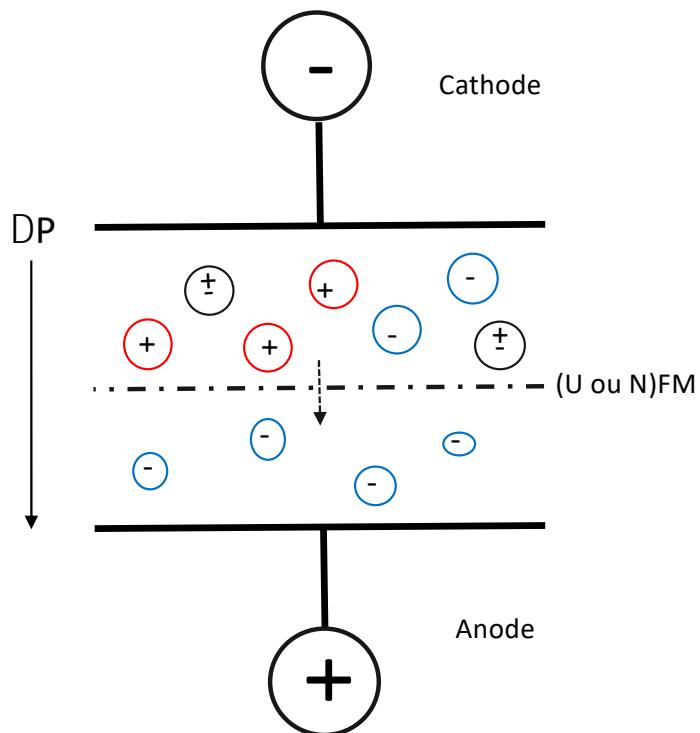


Figure 1-14 Principe de l'électro-filtration. D'après Saxena et al., 2009 [131]

Néanmoins, comme rapportés par Bazinet et Firdaous (2013) [29], deux principaux désavantages à l'utilisation de cette technique ont été mis en évidence. Le premier est l'accumulation de molécules à l'interface de la membrane, ce qui va venir modifier la sélectivité du procédé. Le second est occasionné par le fait que les compartiments

d'alimentation et de récupération sont directement au contact des électrodes. Ainsi, l'hydrolyse de l'eau aux électrodes va entraîner des variations de pH. Le pH va augmenter dans le compartiment de récupération (proche de l'anode), dû à la génération par l'hydrolyse de l'eau d'ions OH<sup>-</sup>, alors que le pH va diminuer dans le compartiment d'alimentation, proche de la cathode, dû à la présence d'ions H<sup>+</sup> (Figure 1-14). De plus, il est possible d'altérer les molécules d'intérêt dû aux réactions d'oxydoréduction pouvant intervenir à l'interface des électrodes. Afin de pallier ces phénomènes, Bargeman et al, (2002) ont rajouté des membranes échangeuses d'ions, entre les électrodes et les compartiments d'alimentation et de récupération permettant de diminuer les variations de pH et ainsi pallier à ces phénomènes [25–27]. De plus, les auteurs ont observés que la sélectivité du procédé était améliorée lorsque la pression transmembranaire était basse et que le taux de migration des molécules était amélioré lorsque la différence de potentiel entre les deux électrodes et la conductivité des solutions étaient plus importantes [26,27]. Cependant, peu de travaux ont été rapporté sur ce procédé depuis ceux de Bargeman.

Finalement, afin de diminuer les problèmes de colmatage et d'augmenter la sélectivité de séparation, un procédé électromembranaire, utilisant seulement l'électricité comme force motrice a été développé.

#### **1.4.2.2.3. Séparation par électrodialyse avec membrane de filtration**

##### **1.4.2.2.3.1. Principes de l'électrodialyse conventionnelle**

L'électrodialyse est un procédé utilisé depuis plus de 50 ans pour la production d'eau potable à partir d'eau saumâtre [134]. Il s'est développé, modernisé et trouve aujourd'hui des applications dans différents secteurs, comme les secteurs pharmaceutiques, chimiques ou agro-alimentaires [134–137].

L'électrodialyse est la combinaison de deux procédés : (1) la dialyse, qui est une méthode de séparation membranaire, dont la force motrice repose sur la différence de concentration en composés dissous de part et d'autre d'une membrane permettant la diffusion des molécules à travers cette membrane ; (2) l'électrolyse qui est l'application d'un courant électrique à une

solution contenant des espèces ioniques générant une différence de potentiel entre deux électrodes, permettant la migration des espèces ioniques en fonction de leurs charges.[138] L'électrodialyse conventionnelle (ÉDC) est un procédé de nature électrochimique, qui permet la séparation des composés ioniques en solution, suite à l'application d'un courant électrique dans l'électrodialyseur. Ce dernier se compose de deux électrodes (anode et cathode) et d'un empilement successif de membranes échangeuses d'ions (MEI) de permselectivités différentes. La mise en place de membranes échangeuses de cations (MECs), et de membranes échangeuses d'anions (MEAs), permselectives respectivement aux anions et aux cations, va permettre d'appauvrir ou d'enrichir les compartiments en espèces ioniques (figure 1-15).

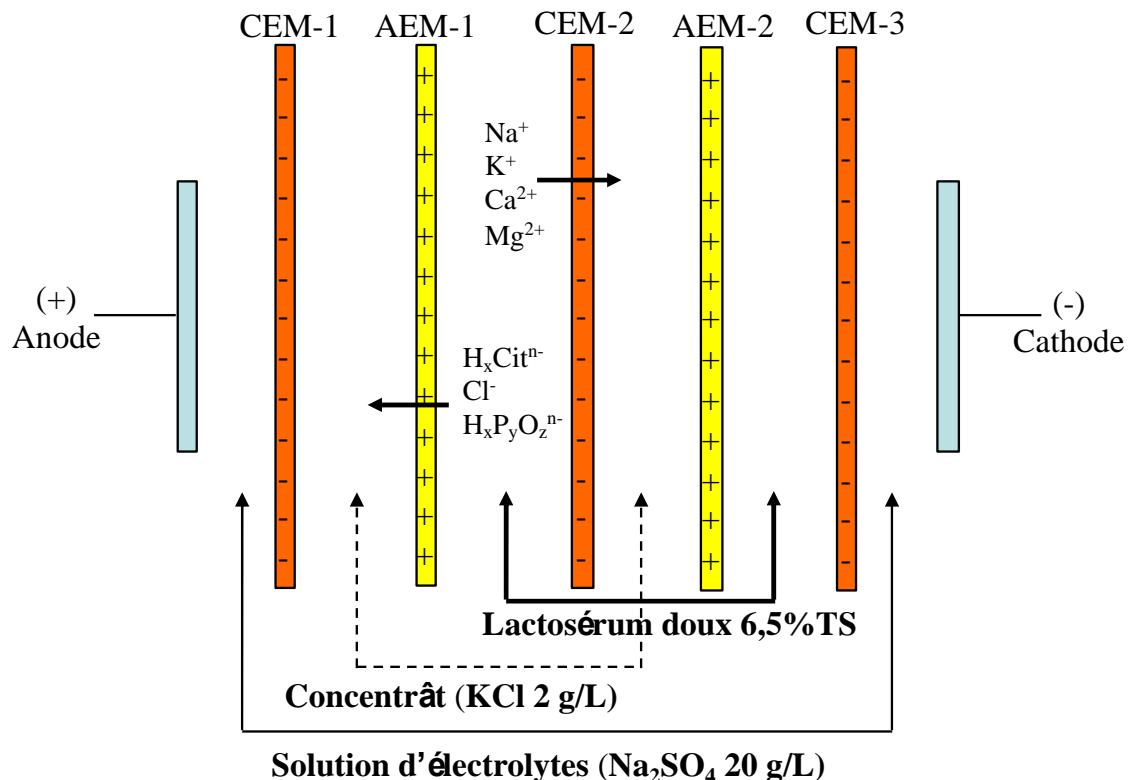


Figure 1-15 : Représentation schématique d'une cellule d'ÉDC permettant la déminéralisation du lactosérum doux. La cellule d'ÉDC se compose d'un empilement de membranes échangeuses d'anions et membranes échangeuses de cations, empilées entre deux électrodes. Tiré de Lemay et al (2018) [139].

#### 1.4.2.2.3.2. Principes de l'électrodialyse avec membranes de filtration (EDMF)

L'électrodialyse avec membrane de filtration (ÉDFM), qui devient EDUF lorsque la membrane utilisée est une membrane d'ultrafiltration, est un procédé de séparation de composés organiques chargés, qui a été développé et breveté par Bazinet *et al* en 2005 [140]. Un module d'ÉDUF est l'empilement d'une ou plusieurs membranes d'ultrafiltrations dans un module entourés de MEI pour protéger les solutions de récupérations et/ou d'alimentations des réaction chimiques (comme l'hydrolyse de l'eau) pouvant intervenir au niveau des électrodes. Ce procédé permet donc de séparer les composés, à la fois en fonction de leur charge, mais aussi en fonction de leur poids moléculaire, à l'aide de ces membranes d'ultrafiltration [133]. La séparation des peptides cationiques et anioniques peut se faire soit séparément (on aura une configuration permettant de récolter les peptides cationiques d'une part et une configuration permettant de récolter les peptides anioniques d'autre part, figure 1-16) soit simultanément (la récupération des peptides anioniques et cationiques se fait au sein de la même configuration (figure 1-17).

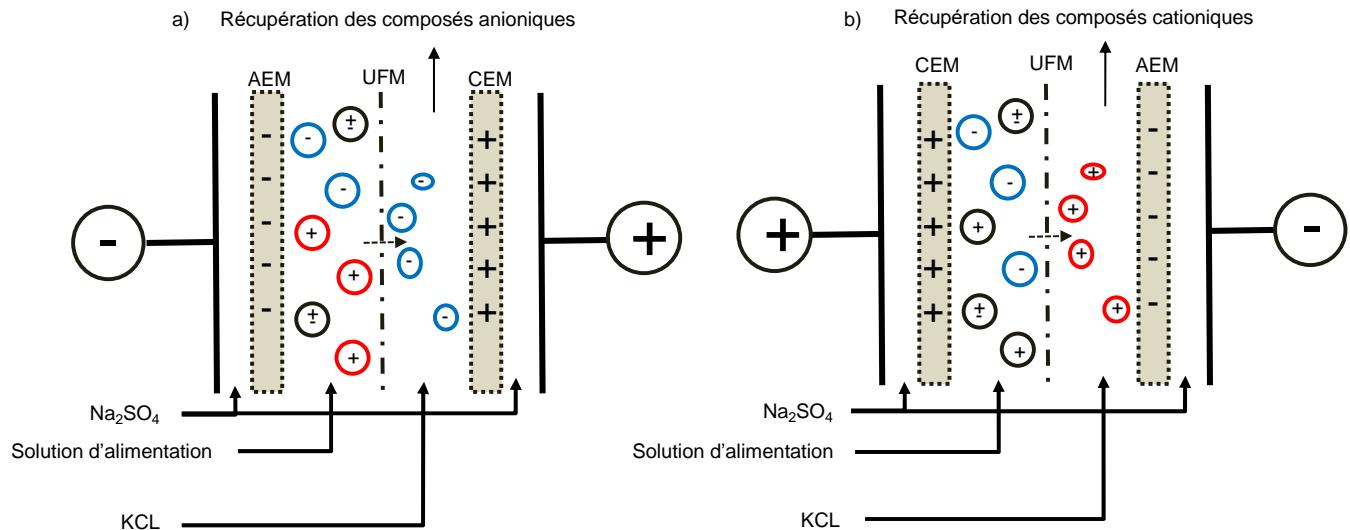


Figure 1-16 Schéma représentant la récupération spécifique des peptides cationiques (gauche) et des peptides anioniques (droite) par EDUF. Adaptée de Poulin et al. (2006)[141]

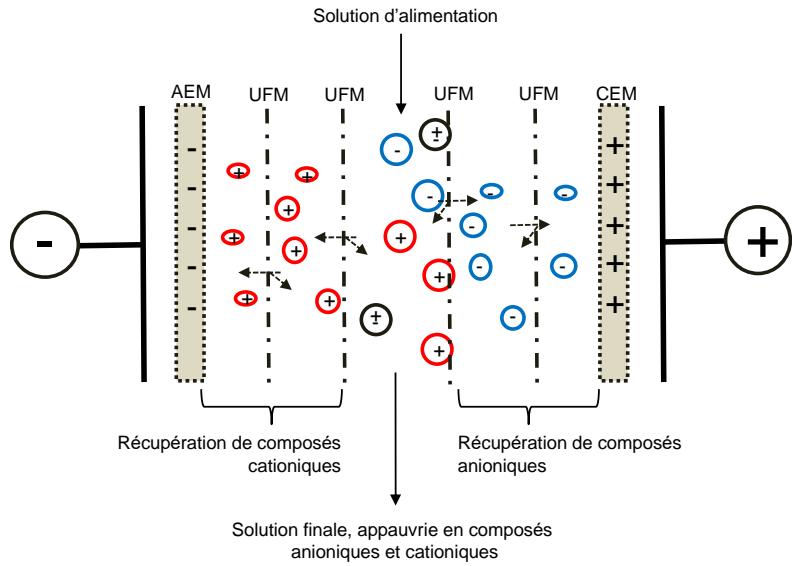


Figure 1-17 Schéma représentant la récupération simultanée des peptides cationiques et anioniques par ÉDUF. Adaptée de Durand et al., 2019 [90]

La flexibilité dans l'utilisation des membranes d'UF (nombres de membranes, seuils de coupures) permet d'augmenter la sélectivité du procédé et aussi le nombre de fractions de composition finale différente.

Il a été démontré récemment qu'avec une membrane de filtration dont le seuil de coupure était de 10 kDa, l'ÉDUF permettait de produire des fractions peptidiques bioactives de soja de manière plus sélective que l'UF. De plus, leur capacité à augmenter *in vitro*, l'absorption du glucose était également améliorée. En effet, les fractions peptidiques cationiques et anioniques produites par ÉDUF ont montré une capacité jusqu'à 22 % plus importante concernant la captation du glucose en présence d'insuline pour l'hydrolysat initial, et jusqu'à 33 % plus efficace que la fraction isolée par UF [6,142]. Dernièrement, dans le cadre d'une étude comparant les procédés membranaires utilisant la pression comme force motrice à ceux impliquant un champ électrique en vue de l'isolement des PBs d'un hydrolysat de protéines du soja, il a été démontré que la NF était plus efficace sur le plan des flux de masse que l'ÉDUF lorsque les paramètres de base étaient les mêmes (surface de la membrane, durée du processus). Par contre, l'ÉDUF permettait de récupérer des peptides de poids moléculaires plus diversifiés et une plus grande quantité d'acides aminés polaires possédant une activité antioxydante [143]. De plus, cette diversification, en termes de poids moléculaire, observée lors de la séparation par EDUF, pouvait être améliorée en fonction du pH utilisé pour le

fractionnement. En effet, les auteurs ont observé des profils différents pour des pHs de séparation de 3, 6 ou 9, alors que la séparation par NF n'était pas affectée par ce pH [143]. L'ÉDUF est donc plus sélective que la nanofiltration ou l'ultrafiltration en termes de spécificité et de charge des peptides.

Au cours des dernières années, plusieurs études ont démontré que l'ÉDUF est une technologie efficace qui permet d'isoler et de concentrer des PBs à partir de différentes matrices alimentaires, comme des produits laitiers [140,144–147], végétaux [6,143,148–153] ou encore marins [113,154–156] (tableau 1-4)

Tableau 1-4 : Fractions ou composés bioactifs concentrés par EDUF, à partir d'hydrolysats protéiques.

Source de l'hydrolysat protéique	Activité biologique	Séquence	Référence
Protéine de la luzerne blanche	Inhibiteur de l'ECA	VW	Firdaous <i>et al.</i> , 2009, 2010[148,149]
			Bazinet <i>et al.</i> , 2005.[140]
	Inhibiteur de l'ECA	ALPMHIR	Poulin <i>et al.</i> , 2007, 2008 [144,145]
			Doyen <i>et al.</i> , 2013 [147]
	Opioïdes	ALPHMIR	Bazinet <i>et al.</i> , 2005 [140]
β-Lactoglobuline		IDALNENK	Poulin <i>et al.</i> , 2006, 2008 [141,145]
	Antihypertensive	GLDIQK	Doyen <i>et al.</i> , 2013 [147]
		VAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLR	
	Antimicrobienne	VLVLDTDYKK	Bazinet <i>et al.</i> [140] Poulin <i>et al.</i> , 2006, 2007 [141,144]
			Doyen <i>et al.</i> , 2013 [147]
	Hypocholestérolémique	IIAEK	

		GLDIQK	Doyen et al., 2013 [147]
Lactoferrine bovine	Antimicrobienne	<u>FKCRRWRMKKLGAPSITCVRRAF</u> FKCRRWRMKKLGAPSITCVRRAFA	Ndiaye et al., 2010 [146]
	Antidiabétique	ND*	Doyen et al., 2014 [150]
Graines de lin			
	Antihypertensive	ND*	Doyen et al., 2014 [150]
			Langevin et al., 2012 [143]
Graines de soja	Antioxydante	ND*	Roblet et al., 2012 [152]
Graines de soja	Absorption du glucose	ND*	Roblet et al., 2013 [6]
Graines de colza	Antihypertensive	ND*	He et al., 2016 [153]
Sous-produits de Crabe des neiges	Anticancer	ND* (PM<600 Da)	Doyen et al., 2011 [157]
	Antimicrobienne	ND* (PM = 814 Da)	Doyen et al., 2012 [158]

Sous-produits de Saumon	Absorption du glucose	ND*	Roblet <i>et al.</i> , 2016 [113]
Laitance de Hareng	Absorption du glucose Antioxydant	ND*	Durand <i>et al.</i> , [154]

### **1.4.3. L'identification de peptides bioactifs**

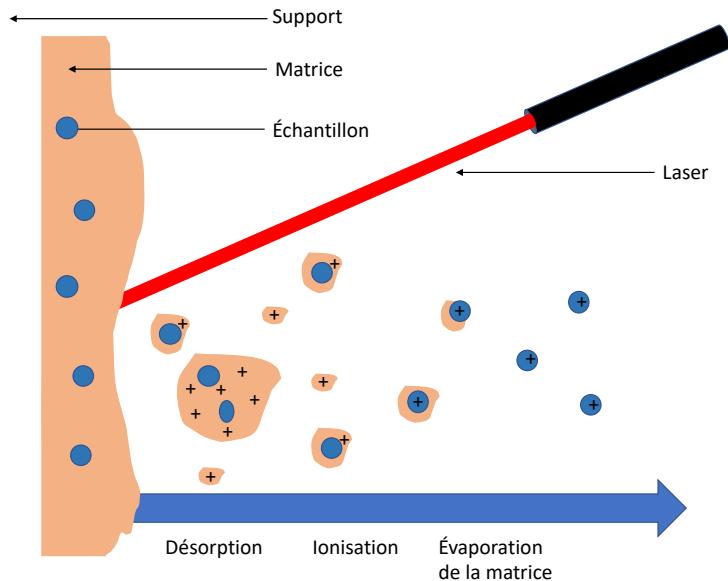
Il existe deux principales techniques permettant l'identification d'une séquence peptidique inconnue, la dégradation d'Edman et l'analyse par spectrométrie de masse. Cependant la première de ces deux techniques, qui permet l'identification d'une séquence en clivant un à un les AAs à partir de l'extrémité N-terminale, nécessite un échantillon extrêmement pur et n'est donc pas adaptée pour l'analyse de mélanges complexes comme les hydrolysats protéiques [159]. Dans cette section, nous allons ainsi nous concentrer sur la spectrométrie de masse, qui permet l'identification de séquences inconnues dans des hydrolysats complexes [159].

#### **1.4.3.1. La spectrométrie de masse.**

La spectrométrie de masse (MS) est une technologie qui permet la détermination de la masse moléculaire de composés inconnus ainsi que leur identification et quantification [160]. Un spectromètre de masse se compose de trois principaux constituants, à savoir une source d'ionisation qui permet d'ioniser les molécules, un ou plusieurs analyseurs de masse qui permet la séparation des ions en fonction de leur ratio masse/charge ( $m/z$ ) et un détecteur qui va permettre de convertir un signal ionique en signal électrique. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant le rapport  $m/z$  des ions détectés en abscisse et l'abondance relative (ar) des ions en ordonnées [161].

##### **1.4.3.1.1. La source d'ionisation**

Deux ioniseurs sont principalement utilisés pour l'analyse des protéines ou peptides en spectrométrie de masse, à savoir le MALDI (de l'anglais Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) et l'ESI (de l'anglais Electrospray Ionization). Dans le cas du MALDI (figure 1-18), l'échantillon à analyser est mélangé à une matrice adaptée, capable d'absorber les rayons ultraviolets (UV) [162]. Cette matrice est ajoutée en grande quantité afin d'éviter toutes interactions entre les composés à analyser. Sous l'effet des rayons UV, la matrice va se désorber et se vaporiser, libérant ainsi les molécules d'intérêts et va transmettre à ces molécules ses protons et donc former des ions [162] qui seront sous la forme  $[M+nH]^{n+}$ , avec  $n$  le plus souvent égale à un [163]



*Figure 1-18 Principe de l'ionisation par le MALDI. Adaptée de Przybylski (2016) [128]*

Concernant l'ESI, sous la pression d'un gaz de nébulisation, l'échantillon est vaporisé et soumis à un champ électrique important, pouvant correspondre à une différence de potentiel allant de 0,8 kV à 6 kV [164]. Ce champ électrique provoque une accumulation de charges à la surface du liquide. Sous l'effet du mouvement de ces charges, des gouttelettes (mesurant quelques micromètres) sont formées. Par l'application d'un courant d'air chaud, le solvant présent dans ces microgouttelettes s'évapore, ce qui permet la concentration les charges [164]. Ainsi, lorsque la densité de ces charges et les forces de répulsions coulombiennes surpassent les forces de tension de surface, ce qui entraîne une rupture des microgouttelettes, en gouttelettes de plus petites tailles, jusqu'à obtenir finalement des ions en phase gazeuse (figure 1-19) [164].

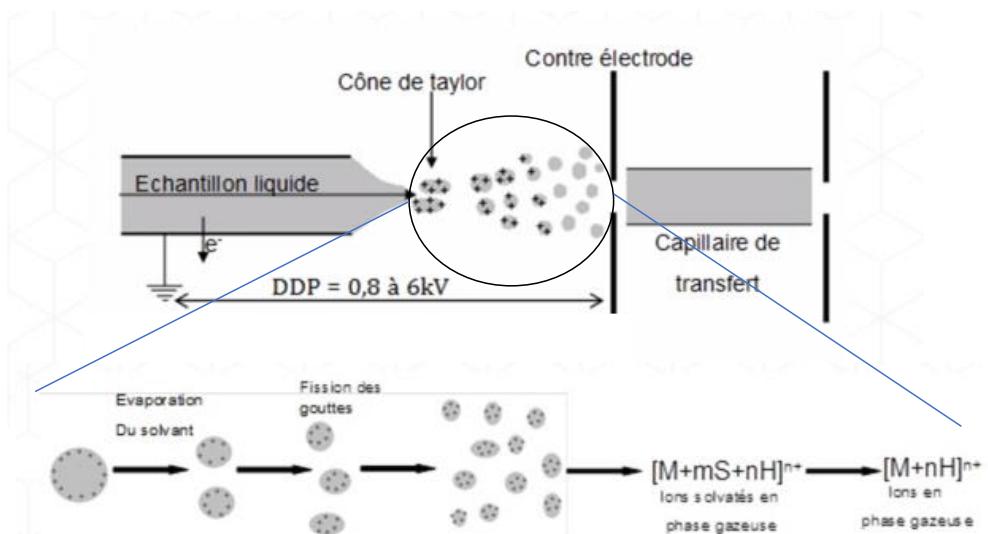


Figure 1-19 Principe de l'ionisation par ESI. Tirée de <http://mass-spectro.com/electrospray> [164]

Après avoir été ionisées, les molécules d'intérêts vont être envoyées vers les analyseurs de masse qui vont permettre la séparation des ions en fonction de leur ratio masse/charge ( $m/z$ )

#### 1.4.3.1.2. Les analyseurs de masse.

Dans cette section notre attention sera particulièrement portée sur deux types d'analyseurs, l'analyseur quadripolaires (figure 1-20) et l'analyseur TOF (figure 1-21) qui sont les deux types d'analyseurs utilisés durant ce projet de doctorat.

L'analyseur quadripolaires se compose de quatre électrodes. Les électrodes opposées sont soumises au même potentiel  $\pm\Phi_0$  et les deux autres électrodes à un potentiel opposé [165]. Ainsi, un champ électrostatique quadripolaire est créé entre ces quatre électrodes. La séparation des molécules est basée sur leur stabilité dans l'analyseur [160]. Les molécules possédant un  $m/z$  se situant dans intervalle fixé par l'analyseur, oscilleront entre les quatre électrodes jusqu'à atteindre le détecteur, alors que les molécules avec un  $m/z$  en dehors de l'intervalle fixé, seront déstabilisées et sortiront de l'analyseur et ne seront donc pas détectées [165].

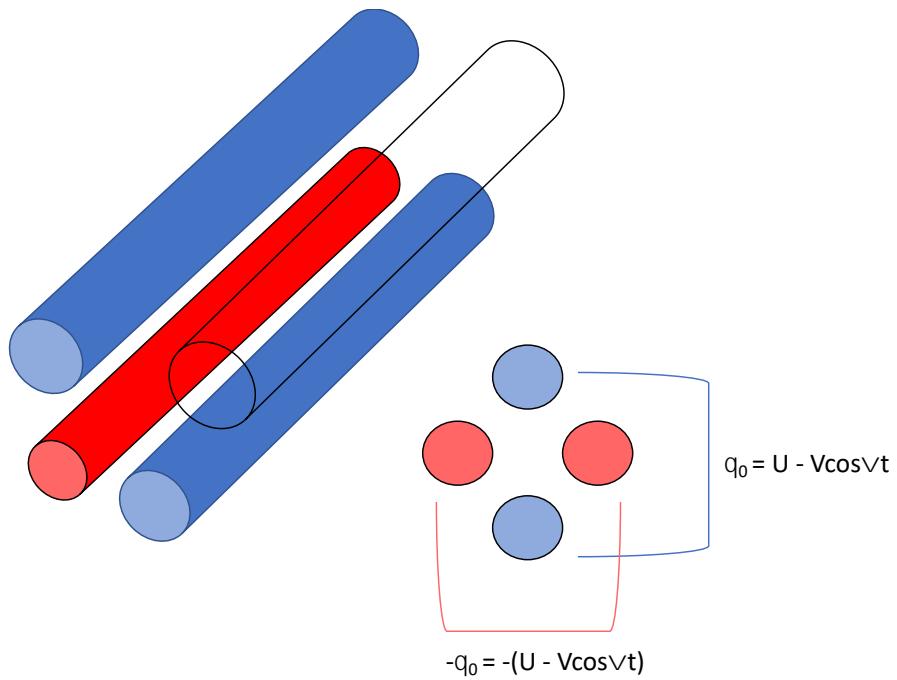


Figure 1-20 Principe de l'analyseur quadripolaire. Avec une distance entre les deux électrodes de même tension égale à deux fois le rayon  $r$ , les électrodes possèdent un potentiel  $\Phi_0$  qui est la somme d'un courant continu ( $U$ ) et d'un courant alternatif ( $V$ ) de haute fréquence ( $\omega$ ). Adaptée de <http://mass-spectro.com/quadrupole-mass-analyzer> [165]

L'analyseur TOF (Time-Of-Flight, figure 1-21) est basé sur le temps pris par les ions pour parcourir le tube de vol. Ainsi, les molécules reçoivent une même quantité d'énergie [166]. Le temps que met la molécule pour parcourir la distance entre la source et le détecteur est ensuite mesuré ceci permettra de déterminer le ratio  $m/z$  de chaque molécule. Les molécules avec un  $m/z$  plus petit arriveront les premières au détecteur [166]. Afin d'améliorer la séparation et donc la résolution, un réflectron peut être ajouté. En effet, plus la distance à parcourir est importante, plus la séparation et donc la résolution des molécules sera importante. Cependant, pour des raisons techniques, le tube de vol n'est pas extensible indéfiniment. Ainsi un réflectron, qui se compose de miroirs électrostatiques sur lesquels est appliqué un gradient de tension va permettre de ralentir les ions qui vont pénétrer dans le réflectron, de les arrêter, puis les renvoyer avec la même énergie et donc la même vitesse dans le sens opposé [167]. Les ions feront ainsi un aller-retour dans le tube de vol, et la distance parcourue sera ainsi doublée.

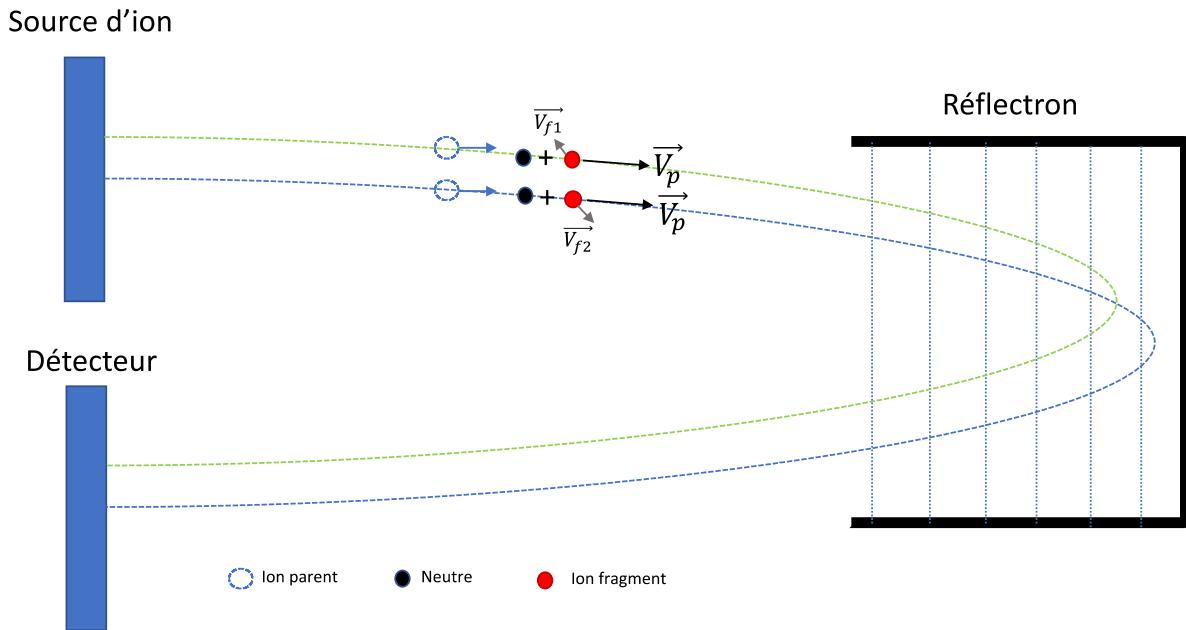


Figure 1-21 Principe de l'analyseur TOF. Adaptée de <http://mass-spectro.com/analyseur-temps-de-vol> [167]

Finalement, les ions atteignent le détecteur qui permet de convertir un signal ionique en signal électrique. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant le rapport  $m/z$  des ions détectés en abscisse et l'abondance relative des ions en ordonnées (figure 1-22a) [161].

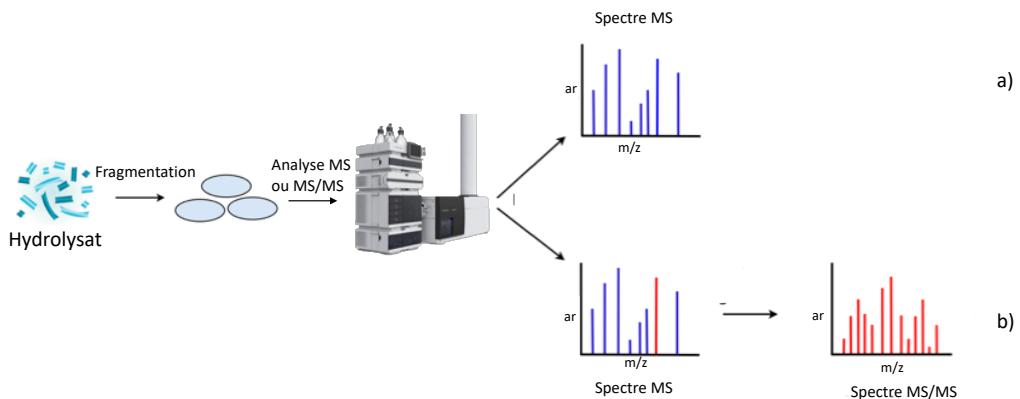


Figure 1-22 Spectre d'analyse MS (a) Spectre d'analyse MS/MS (b). Adaptée de Costa et al 2011 [161]

Les deux analyseurs (quadripôles et TOF) peuvent être combinés dans un même instrument permettant ainsi des analyses par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (figure 1-22b) qui

vont une étape plus loin, en fragmentant les ions par collision. À noter qu'il existe différentes combinaisons d'analyseurs possible en MS/MS. Cependant, l'identification des séquences peptidiques réalisées dans ce travail de doctorat a été réalisée par l'analyse des résultats obtenus après injection des échantillons dans un spectromètre de masse contenant un analyseur quadripolaire et un analyseur TOF.

#### **1.4.3.2. La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)**

La première étape de séparation (MS/MS) sert principalement comme un outil de préparation qui va permettre d'isoler un ion avec un rapport spécifique m/z pour ensuite le fragmenter et déterminer (MS/MS) le ration m/z des fragments générés. En peptidomique, le peptide fragmenté est appelé ion précurseur ou ion parent, alors que les produits de la fragmentation sont appelés ions fils ou ions produits [168].

#### **1.4.3.3. Fragmentation des ions**

Les ions précurseurs sont conduits dans une cellule de collision remplie d'un gaz inerte, par exemple l'argon. Les ions rentrent en collision avec le gaz et une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne. L'augmentation de l'énergie interne conduit l'ion à se fragmenter [168]. D'après les nomenclatures standards, les ions formés sont appelés a, b et c lorsqu'ils contiennent la partie N-terminale du peptide, alors que les ions formés sont appelés x, y et z lorsqu'ils contiennent la partie C-terminale (figure 1-23) [169]. La détection de chacun de ces ions se traduit par un pic dans le spectre MS/MS.

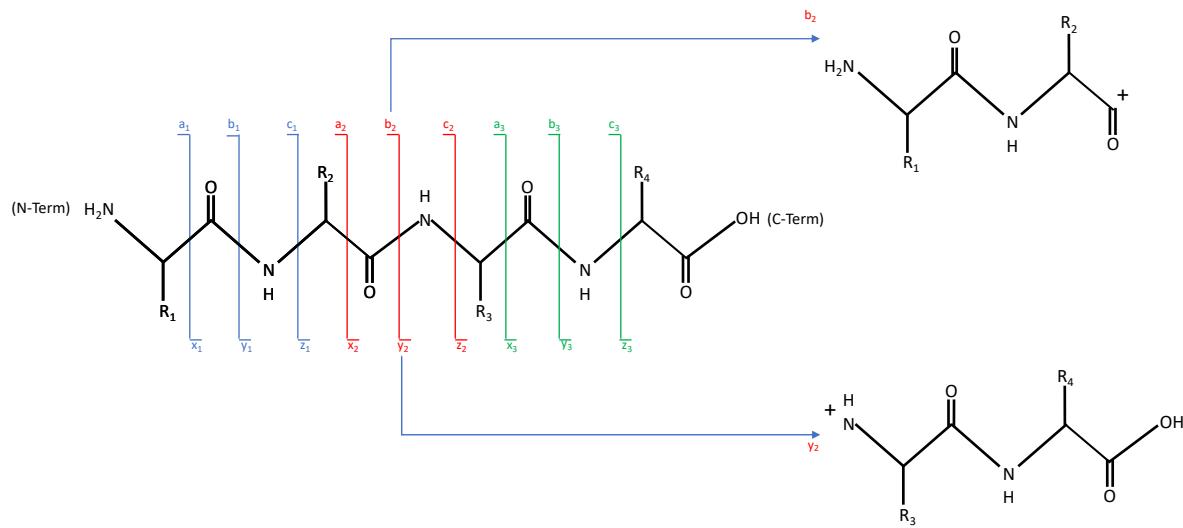


Figure 1-23 Nomenclature standard d'un spectre de fragmentation d'un peptide. Adaptée de Liu 2015 [169].

L'analyse des spectres MS/MS permet l'identification de la séquence peptidique initiale. Comme il s'agit d'une tâche laborieuse à effectuer manuellement, des méthodes informatiques sont utilisées pour faciliter l'identification des peptides. Il existe deux approches informatiques distinctes : la recherche dans des bases de données et le séquençage de *novo*

#### 1.4.3.4. La recherche dans des bases de données.

La recherche dans les bases de données repose sur la comparaison de spectres de fragmentations théoriques avec les spectres de fragmentations générés expérimentalement (figure 1-24) [161]. Ces spectres théoriques sont obtenus en imposant, ou non (on parlera alors de clivage non-spécifique) un clivage enzymatique aux protéines, ou à un protéome d'un organisme. Selon les algorithmes propres aux logiciels de comparaison des scores d'appariements vont être affectés, déterminant la similarité entre les spectres théoriques et expérimentaux [161]. Ainsi, les scores les plus hauts expriment des similitudes importantes entre les deux spectres. Généralement, ce score prend en compte l'intensité et le nombre de pics appariés, ainsi que l'erreur de masse, ou autrement dit, la différence entre la masse observée dans le spectre expérimentale et le spectre théorique de la séquence appariée [169].

Cependant, cette approche repose sur le fait que la séquence à identifier dérive d'une séquence présente dans la base de données utilisée. Si le peptide ne dérive pas d'une protéine présente dans

la base de données, alors l'identification ne peut pas se faire ou il y a un risque de mauvaise identification [161,169].

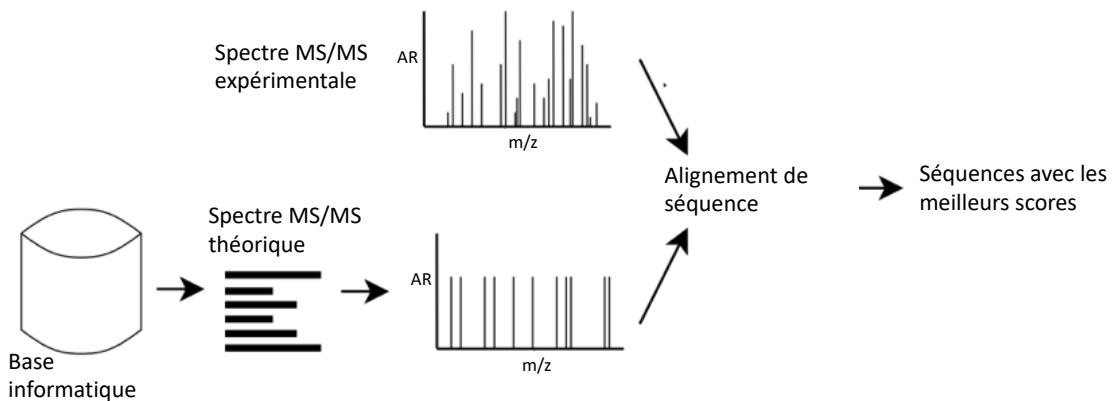


Figure 1-24 Schéma classique de l'identification de peptides via la recherche dans les bases de données. Adaptée de Costa et al (2011) [161]

#### 1.4.3.5. Le séquençage de *novo*

Le séquençage de *novo* utilise comme information seulement le spectre MS/MS obtenu expérimentalement. Pour rappel, un spectre MS/MS correspond à la fragmentation d'un peptide; ainsi chaque pic du spectre corresponds à une partie de la séquence de ce peptide. Il est possible de reconstituer la séquence du peptide en calculant la différence de masse entre les pics. En effet, comme présenté précédemment à la figure 1-23, lors de la fragmentation d'un peptide, la différence de masse entre l'ions  $y_1$  et l'ion  $y_2$ , correspond à la masse d'un acide aminé, répertorié dans le tableau 1-5.

Tableau 1-5 Masse des 20 acides aminés standards

Nom	Code à 3	Code à 1	Masse	Masse monoi-
	lettres	lettre	moyenne (Da)	sotopique (Da)
Alanine	Ala	A	71,08	71,03711
Arginine	Arg	R	156,2	156,10111
Asparagine	Asn	N	114,1	114,04293
Acide Aspartique	Asp	D	114,1	114,04293
Acide Glutamique	Glu	E	129,1	129,04259
Cystéine	Cys	C	103,1	103,00919
Glutamine	Gln	Q	128,1	128,05858
Glycine	Gly	G	57,05	57,02146
Histidine	His	H	137,1	137,05891
Isoleucine	Ile	I	113,2	113,08406
Leucine	Leu	L	113,2	113,08406
Lysine	Lys	K	128,2	128,09496
Méthionine	Met	M	131,2	131,04049
Phénylalanine	Phe	F	147,2	147,06841
Proline	Pro	P	97,12	97,05276
Serine	Ser	S	87,08	87,03203
Thréonine	Thr	T	101,1	101,04768
Tryptophane	Trp	W	186,2	186,07931
Tyrosine	Tyr	Y	163,2	163,06333
Valine	Val	V	99,13	99,06841

Afin d'illustrer ces propos, prenons l'exemple de la séquence YSEMPPGK identifiée à partir de l'hydrolyse enzymatique de *Mactra veneriformis*, par séquençage de novo (figure 1-25) [159]. Ainsi, la différence entre  $y_6$  (ayant un m/z de 658,32 Da) et  $y_7$  (ayant un m/z de 745,35 Da) est de 87,03 Da, correspondant bien, d'après le tableau 1-5 à une sérine [159]. De même, la différence

entre  $b_3$  (ayant un m/z de 380,15 Da) et  $b_4$  (ayant un m/z de 511,19 Da) est de 131,04 Da, correspondant bien à une Methionine [159].

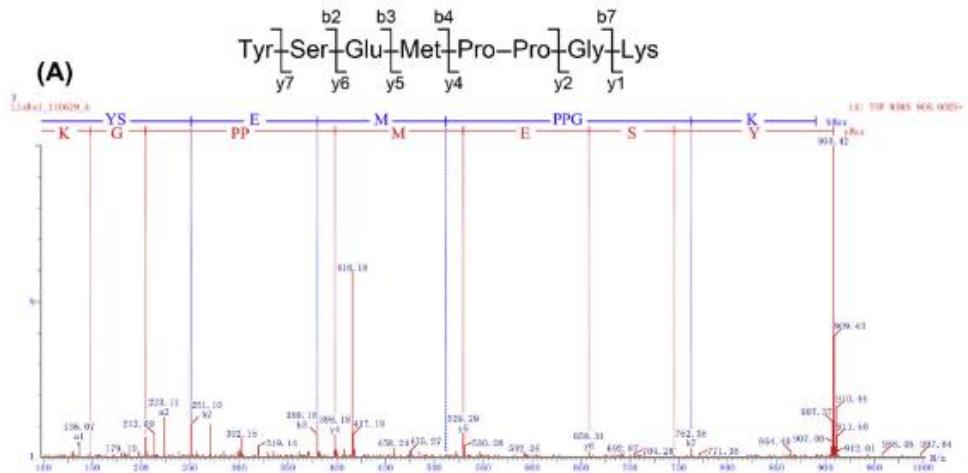


Figure 1-25 Exemple du spectre MS/MS du peptide YSEMPPGK, identifié par séquençage de novo. Tirée de Liu et al (2015) [159]

Cependant, l'identification par le séquençage de *novo* peut se faire uniquement si le spectre MS/MS est de haute qualité. Si l'équipement n'arrive pas à détecter tous les ions fils ou si le bruit de fond est trop important, cela va venir perturber l'interprétation.

Ainsi, en suivant le schéma de production de peptides bioactifs présenté dans la partie 2.4, une liste non exhaustive de peptides bioactifs ayant pour cible le DT2 est présentée dans le tableau 1-6.

Tableau 1-6 Liste non exhaustive de peptides bioactifs agissant contre le DT2, identifiés à partir de coproduits marins.

Source	Bioactivité	Séquence	Référence
Sardine	Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase	Val-Trp Trp-Tyr-Pro-Leu	[170]
Saumon d'Atlantique	Inhibiteurs de la DDP-IV	Gly-Pro-Ala-Glu Gly-Pro-Gly-Ala	[171]
Thon	Inhibiteurs de la DDP-IV	Pro-Gly-Val-Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Cys-Tyr-Glu Cys-Ala-Tyr-Gln-Trp-Gln-Arg-Pro-Val-Asp-Arg-Ile-Arg	[172]

		Pro-Ala-Cys-Gly-Gly-Phe-Tyr-Ile-Ser-Gly-Arg-Pro-Gly	
Aqueous Palma- ria palmata	Inhibiteurs de la DDP-IV	Ile-Leu-Ala-Pro Leu-Leu-Ala-Pro Met-Ala-Gly-Val-Asp-His-Leu	[173]
Peau de poisson	Inhibiteur de la DDP-IV	Gly-Pro-Hyp*	[174]
Saumon	Inhibition de la voie NO/iNOS and PGE <sub>2</sub> /COX-2 et de la production de cytokines pro- inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ )	Pro-Ala-Tyr	[175]

DDP-IV: dipeptidyl peptidase-4. NO : oxyde nitrique. iNOS : forme inducible de l'**oxyde nitrique synthase**. PGE<sub>2</sub> : la prostaglandine E2. COX-2 : cyclo-oxygénase-2

# **Chapitre 2**

## **Problématique, hypothèse et objectifs de recherche**

## **2. Problématique, hypothèse et objectifs de recherche**

### **2.1. Problématique**

La production de nutraceutiques à partir de coproduits de poisson vise à *réduire l'impact environnemental associé à la gestion des déchets, tout en étant économiquement profitable pour les industries de transformation.* En plus, cela permettrait de répondre aux nouvelles mesures provinciales sur l’interdiction de l’enfouissement de toutes matières organiques. Le développement de fractions permettant de rétablir le métabolisme du glucose ou de fractions anti-inflammatoires, qui représentent des facteurs à risque du développement du DT2, pourrait diminuer la prévalence de la maladie ainsi que les coûts de plus en plus importants assumés par le système de santé. De plus, les médicaments utilisés actuellement présentent plusieurs effets secondaires rapportés dans la littérature scientifique.

Cependant, le fractionnement des hydrolysats complexes de ces coproduits de la transformation du saumon est nécessaire afin de générer des fractions plus pures et plus bioactives et afin de faciliter l’identification des séquences des peptides bioactifs. La problématique essentielle est que les procédés matures actuellement disponibles à l’échelle industrielle, tels que les procédés membranaires présentent une efficacité limitée ou les procédés chromatographiques sont très couteux et leur impact environnemental reste élevé dû à l’utilisation de solvants. *Le développement d’une nouvelle approche pour le fractionnement de ces protéines est alors nécessaire.* Plusieurs études réalisées au sein de notre équipe de recherche ont démontré l’efficacité de l’EDUF afin de générer des fractions bioactives à partir de matrices complexes. Toutefois, *l’identification des peptides bioactifs et la démonstration de leurs bioactivités sont nécessaire pour la mise en marché de produits nutraceutiques et/ou pharmaceutiques aux bioactivités démontrées scientifiquement.*

Le but de ce projet est donc d’utiliser la séparation par EDUF afin de concentrer les peptides bioactifs dans des fractions anioniques ou cationique d’hydrolysats de protéines de coproduits de

saumon, facilitant la mise en évidence de fractions bioactives et l'identification des peptides présents dans ces fractions.

## 2.2. Hypothèse

L'hypothèse générale est que *l'empilement d'un nombre spécifique de membranes d'UF avec des seuils de coupure différents dans un module d'EDUF, permet de concentrer des peptides bioactifs, issus de l'hydrolyse enzymatique de coproduits de saumon, cationiques ou anioniques, et de générer des fractions bioactives contre le DT2, tout en facilitant l'identification des peptides, démontrant individuellement des propriétés biologiques contre le DT2 (absorption du glucose, production de glucose hépatique, inflammation).*

## 2.3. Objectifs de recherche

Pour répondre à cette hypothèse, quatre objectifs spécifiques ont été mis en place :

L'objectif 1 : Démontrer la sélectivité en termes de profils peptidiques, d'un empilement spécifique de membranes d'UFs dans un module d'ÉDUF, lors d'un fractionnement d'un hydrolysat complexe de protéines de saumon.

L'objectif 2 : Étudier les bioactivités (l'absorption du glucose musculaire, la production du glucose hépatique et finalement l'inflammation) des fractions générées par EDUF sur le diabète de type 2.

L'objectif 3 : Caractériser par LC-MS les fractions ayant démontrées un effet bioactif lors de l'objectif 2, afin d'identifier la séquence de potentiels peptides bioactifs.

L'objectif 4 : Synthétiser les peptides identifiés à l'objectif 3, et évaluer leurs bioactivités dans des études *in vitro* (la captation du glucose musculaire, la production du glucose hépatique et finalement l'inflammation).

# **Chapitre 3**

**How Triple Size-Selective Membrane  
Separation of Peptides from Salmon  
Protein Hydrolysate Orientate their Bi-  
ological Response on Glucose  
Uptake**

### **3. How Triple Size-Selective Membrane Separation of Peptides from Salmon Protein Hydrolysate Orientate their Biological Response on Glucose Uptake**

Les auteurs sont : Loïc Henaux (candidat au doctorat, planification et réalisation des expériences, analyses des résultats et rédaction de l'article), Jacinthe Thibodeau (professionnelle de recherche, supervision de l'étudiant pour les analyses LC-MS), Geneviève Pilon (Supervision de l'étudiant pour les études *in vitro*, correction et révision du manuscrit) Tom Gill (collaborateur scientifique du projet, correction et révision du manuscrit), André Marette (co-directeur de thèse, collaborateur scientifique du projet, supervision de l'étudiant pour les études *in vitro*, correction et révision du manuscrit) et Laurent Bazinet (directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction et révision du manuscrit).

Ce chapitre à fait l'objet d'un article intitulé :

**« How Triple Size-Selective Membrane Separation of Peptides from Salmon Protein Hydrolysate Orientate their Biological Response on Glucose Uptake »** publié dans « International Journal of Molecular Sciences » en avril 2019.

## **Transition contextuelle**

Dans de récentes études réalisées conjointement par les équipes du Pr. André Marette et du Pr Laurent Bazinet, l'effet glucorégulateur, notamment la capacité d'augmenter la captation du glucose, d'hydrolysats protéiques de coproduits de saumon a été démontrée *in vitro* dans des cellules musculaires L6. Ces effets sont causés par la présence de petits peptides bioactifs ayant un poids moléculaire inférieur à 1 kDa. Cependant, si dans une première étude, l'hydrolysat initial a permis d'augmenter la captation du glucose *in vitro*, dans une seconde étude, l'hydrolysat initial n'a pas démontré une amélioration statistiquement différente par rapport au contrôle concernant la captation du glucose par les cellules musculaires. Cependant, dans les deux études, une séparation subséquente par électrodialyse avec membrane d'ultrafiltration (EDUF) a permis de concentrer des peptides bioactifs dans les compartiments de récupération et/ou dans le compartiment d'alimentation. Les hydrolysats protéiques, sont des matrices complexes, pouvant contenir plus d'un millier de composés et affecter l'expression de la bioactivités. C'est pourquoi, la caractérisation et/ou l'identification des peptides à l'origine de ces propriétés, permettrait de s'assurer de la répétabilité du procédé d'hydrolyse en identifiant ces composés par spectrométrie de masse dans l'hydrolysat et de proposer un procédé de séparation optimisé pour concentrer ces peptides bioactifs. L'objectif de cette présente étude était d'étudier l'impact d'un fractionnement par EDUF sur un hydrolysat protéique 1) en termes de migration peptidique et d'étudier 2) comment le fractionnement par EDUF pouvait orienter la captation du glucose des fractions générées. De plus, 3) la caractérisation des fractions bioactives a fourni un premier élément de réponse sur la masse des peptides potentiellement bioactifs.

### **3.1. Résumé**

La valorisation des coproduits organiques d'origine naturelle devient une priorité pour les industriels, afin de répondre aux enjeux économiques et environnementaux. Dans ce contexte, l'électrodialyse avec membranes de filtration (EDFM), un procédé sélectif et écoresponsable, a été utilisé pour la séparation de peptides à partir d'un hydrolysat de coproduits de saumon. Trois membranes d'ultrafiltrations ont été placées dans un même système (50, 20 et 5 kDa MWCO). Ce montage unique a permis de générer spécifiquement des fractions cationiques et anioniques avec des profils de poids moléculaires et des bioactivités différentes. Des différences significatives sur les taux de migrations, les rendements et ainsi que sur la diversité peptidique ont été observées, selon la capacité des peptides à traverser une, deux ou trois membranes d'ultrafiltration. De plus, la fraction cationique obtenue dans le premier compartiment de récupération ( $C_{RC1}$ ) a démontré la plus haute augmentation (42%) de la captation du glucose dans des cellules musculaires L6 *in vitro*. Deux fractions anioniques, les fractions issues du deuxième ( $A_{RC2}$ ) et du troisième compartiment de récupération ont démontré une augmentation de la captation du glucose en condition basale similaire à l'effet de l'insuline seule. Finalement l'analyse par LC-MS des fractions bioactives a permis d'identifier 17 composés cationiques communs présents dans les fractions bioactives cationiques (la fraction finale issue du compartiment d'alimentation ( $C_{FFC}$ ) et les fractions issues du premier ( $C_{RC1}$ ) et du deuxième ( $C_{RC2}$ ) compartiments de récupération), Ainsi que 21 composés communs aux trois fractions de récupération de peptides anioniques ( $A_{RC1}$ ,  $A_{RC2}$  et  $A_{RC3}$ ) pouvant potentiellement être responsables de cette augmentation de l'absorption du glucose

### **3.2. Abstract**

The valorization of by-products from natural organic sources is becoming an industrial priority to respond to the environmental and economic challenges. In this context, electrodialysis with filtration membrane (EDFM), a green and ultra-selective process, was used to separate peptides from salmon frame protein hydrolysate. For the first time, the simultaneous separation of peptides by three ultrafiltration membranes (50, 20 and 5 kDa MWCO) stacked in an electrodialysis system, allowed the generation of specific cationic and anionic fractions with different molecular weight profiles and bioactivity responses. Significant decreases in peptide recovery, yield and MW range were observed in the recovery compartments depending that peptides had to cross one, two or three ultrafiltration membranes. Moreover, Cationic Recovery Compartment 1 fraction demonstrated the highest increase (42%) in glucose uptake on L6 muscle cells. While, in the anionic configuration, both Anionic Recovery Compartment 2 and Anionic Recovery Compartment 3 fractions presented a glucose uptake response in basal condition similar to the insulin control. Furthermore, Cationic Recovery Compartment 3 was found to contain inhibitory peptides. Finally, LC-MS analyses of the bioassay-guided bioactive fractions allowed to identify 11 peptides from salmon by-products that are potentially responsible for the glucose uptake improvement.

Keywords: electrodialysis with filtration membrane (EDFM), Triple size-selective separation, glucose uptake, bioassay-guided validation, bioactive peptide

### 3.3. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a complex multifactorial disorder resulting from insulin resistance in peripheral tissues such as skeletal muscle, and pancreatic  $\beta$  cells dysfunction [3]. This disease is growing at an alarming rate and is predicted to account for more than 350 million cases reached by 2030 [176]. Skeletal muscle is the major site of glucose uptake in the postprandial state and the development of insulin resistance in this tissue is considered a cornerstone in the pathogenesis of T2D. Interestingly, increased fish consumption has been suggested to protect against metabolic syndrome (MetS), type 2 diabetes and cardiovascular disease (CVD) in obese subjects [94,177]. Our group previously showed that fish protein is an important contributor to these beneficial effects. Indeed, Pilon *et al.*(2011) showed that salmon protein hydrolysate reduced inflammation in visceral adipose tissue and improved insulin sensitivity in an animal model of diet induced obesity [13]. Furthermore it was recently reported that in a mouse model of obesity, a low molecular weight peptide fraction (<1kDa) from the proteolytic digestion of salmon filleting waste improved glucose tolerance, and lipid homeostasis [4]. Interestingly, other fish protein sources than salmon have been reported for their metabolic properties in animal models but also in humans [11,12,96–98,178,179]. Therefore, proteins from marine by-products definitively represent a high potential for the development of functional foods and nutraceutical products [11,12,96–98,178,179]. On the other hand, the value-added aspects of organic by-products have become a priority in order to respond to the sustainability, environmental, economic and regulatory challenges [180,181].

Consequently, production, separation and characterization of bioactive peptide (BPs) by-products are important issues for the food and biopharmaceutical industries and we are now aware that BPs activity depends on specific molecular and chemical properties [17]. For example, the surface charge of peptides has been shown to be an important factor for the expression of their bioactivity and they have to be selectively recovered to maximize their activity [18]. However, since enzymatic hydrolysis used to liberate BPs from the protein matrix [115], generate a complex peptide mixtures, a sustainable technic allowing the selective purification and concentration of these bioactive peptides or peptide fractions from complex mixtures is needed. Also, it was demonstrated that BPs may have low molecular weight depending on the conditions of digestion

and the types of proteolytic enzymes used [15,16]. Amongst the available technologies for peptide separation, pressure-driven processes such as ultrafiltration, nanofiltration [21,23,24] and chromatographic methods [19,20] are perhaps most frequently used. However, pressure driven techniques sometimes fail to separate molecules of similar size and are susceptible to membrane fouling [132]. Chromatography is too costly, slow, not applicable for the fractionation of large sample volumes and sometimes use organic solvents [25]. Isoelectric focusing is perhaps a more biocompatible separation technology most often used on laboratory scale and, more recently at larger scale. But as mentioned by Hashimoto *et al.* (2005, 2006) [182,183], the limiting volume (50L), the degradation of agarose gels after prolonged time (8 h) of peptide fractionation and at high voltages (500-600V) led researchers toward alternative methods for an optimal separation and purification. More recently, electrodialysis with filtration membrane (EDFM), a “green” and ultra-selective process was developed for separation/concentration of bioactive ingredients. EDFM is based on the size exclusion capabilities of porous membranes with the charge selectivity of electrodialysis. In comparison with other common technologies used for biomolecule separation, EDFM has many unique advantages: it is environmentally-friendly using no organic solvents or dangerous chemicals; it is highly selective for targeted molecules; it operates at low pressure and therefore reduces membrane fouling; it allows simultaneous molecular separation and concentration as well as preservation of the feed solution’s commercial value. Recently, Roblet *et al.* (2016) used the EDFM process to fractionate a low molecular weight (<1 kDa) salmon protein hydrolysate and demonstrated that the basal glucose uptake as well as insulin-stimulated glucose uptake were enhanced by 40% and 31%, respectively, at pH 6 in the final feed compartment [113]. However, in this work, only one molecular weight cut-off of 20 kDa was used for the ultrafiltration membrane and consequently no discrimination according to the peptide size between recovery fractions and their glucose uptake response were possible.

Hence, in a context of eco-efficiency and to create value-added products, the objectives of the present study were 1) to simultaneously separate specific peptide fractions, according to their charges as well as molecular weights, from a salmon protein hydrolysate by EDFM by stacking three ultrafiltration membranes of different molecular weight exclusion limits (50; 20 and 5 kDa), 2) to characterize the peptide fractions obtained after separation in terms of molecular weight profiles and sequences and 3) to measure *in vitro* the level of glucose uptake response of these

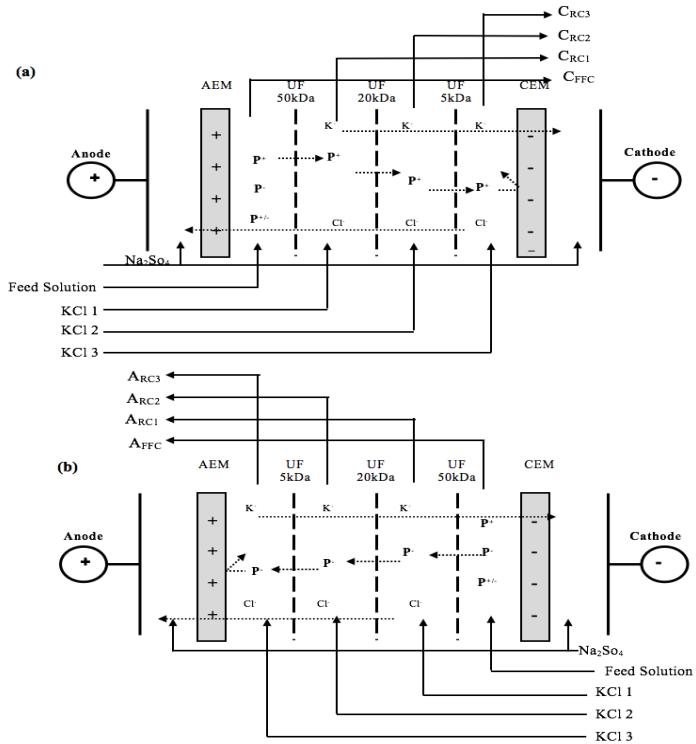
fractions in the presence or absence of insulin stimulation in L6 skeletal muscle cells, following this charge and size separation.

## 3.4. Experimental section

### 3.4.1. Materials and electrodialysis cell

#### 3.4.1.1. Electrodialysis configurations

The electrodialysis cell used for the experiment was an MP type cell manufactured by ElectroCell Systems AB Company (Täby, Sweden). The cell had an effective surface area of 100 cm<sup>2</sup>, and was composed by one anion-exchange membrane (AEM), one cation-exchange membranes (CEM), and three ultrafiltration membranes (UFMs) with MWCO of 50, 20 and 5 kDa as illustrated in Fig.3-1. The electrodes used were a dimensionally-stable anode (DSA) and a 316 stainless steel cathode. The electrical potential for the electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF instead of EDFM since the filtration membrane was an UF membrane) was supplied by a variable 0–100 V power source. Two different cell configurations allowing the separation of cationic or anionic charged peptides from salmon protein hydrolysate were tested in this study:



*Figure .3-1 Schematic layout showing EDUF membranes configurations (a) cationic and (b) anionic, for the fractionation of salmon protein hydrolysate (SPH). AEM: anion-exchange membrane, CEM: cation exchange membrane, UFM: ultrafiltration membrane, P<sup>+</sup>: cationic peptides; P<sup>-</sup>: anionic peptides, P<sup>+/−</sup>: neutral peptides, A<sub>rc</sub>: anionic recovery compartments and C<sub>rc</sub>: cationic recovery compartments.*

For both configurations, the cell was composed by five closed loops; three of them contained 1.5 L of a KCl solution (2 g/L) for the recovery compartments, one loop contained the feed compartment and the last one contained the electrode rinsing solution (20 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 L), and was split in half between the anode and the cathode compartments. The solutions were circulated using five centrifugal pumps and the flow rates were set at 2 L/min using flow meters (the electrode rinsing solution was maintained at 4 L/min and split in half between the anode and the cathode compartments) (Blue-White Industries Ltd, Huntington Beach, CA, USA).

**Cationic configuration—** The first EDUF cell configuration, shown in Fig. 3-1a, was for the separation of cationic peptides. The UF membranes were placed in the cell according to their exclusion limits starting from the anode side to allow the migration of cationic peptides on the basis of their size and charge. The compartment containing a KCl solution circulating between the UF-50 kDa and UF-20 kDa was named the “cationic recovery compartment 1” (CRC1). The cationic

recovery compartment 2 ( $C_{RC2}$ ) was located between the UF-20 kDa and UF-5 kDa, and the cationic recovery compartment 3 ( $C_{RC3}$ ) between the UF-5kDa and CEM. The feed solution consisting of salmon protein hydrolysate (SPH, 1.5 L, 0.7% w/v) was circulated in the compartment between the UF-50 kDa and AEM.

**Anionic configuration**— In this second configuration (Fig 3-1b), the UF membranes were arranged according to their MWCOs starting from the anode side to allow the migration of anionic peptides on the basis of their size and charge. The compartment containing a KCl solution circulating between the UF-50 kDa and UF-20 kDa membranes was called the “anionic recovery compartment 1” ( $A_{RC1}$ ), anionic recovery compartment 2 ( $A_{RC2}$ ) was located between the UF-20 kDa and UF-5 kDa membranes and finally the anionic recovery compartment 3 ( $A_{RC3}$ ) between the UF-5 kDa and AEM. The feed solution (SPH) was circulated in the compartment between the UF-50 kDa and CEM.

### 3.4.1.2. Electroseparation protocol

The EDUF separations were performed according the previous study of Roblet et al (2016) [113]. Briefly, the EDUF separation were performed in batches for both cell configurations using a constant electrical field strength of 6 V/cm (corresponding to a current density varying between 0.005 and 0.008 A/cm<sup>2</sup> during the treatment), for 6h, at controlled temperature (~16 °C) [184]. The SPH was diluted with demineralized water to obtain a final protein concentration of 0.7% (w/v). Following the results obtained by Roblet et al., 2016, the pH of SPH and recovery (KCl) solutions were adjusted to pH 6 before each run with 0.1 N NaOH and/or 0.1N HCl and maintained constant thereafter. For each treatment 5 mL of SPH and recovery solutions were collected every hour for further analysis. The electrical conductivity of the feed solution and recovery solutions was maintained at a constant level by adding KCl, following the recommendations of Suwal *et al.* (2015) [184]. 3 replicates of each condition were performed. Finally, a CIP (cleaning-in-place) was performed at the end of each replicate according to the membrane manufacturer’s instructions.

### **3.4.2. Materials and methods**

#### **3.4.2.1. Hydrolysate preparation**

Salmon protein hydrolysate (SPH) was produced according to the procedure described previously by Chevrier et al., 2015 [4] and Roblet et al., (2016) [113]. Briefly, salmon frames were offered by Cooke Aquaculture. They were thawed, mechanically deboned and homogenized in a 1.0 M NaOH solution. The proteins were isoelectrically precipitated at a pH of 4.5. Then, the proteins were first hydrolyzed with pepsin, and then by a mix of trypsin/chymotrypsin. Once hydrolysis was complete, the supernatant was filtered through a 5 µm pore size paper filter to remove insoluble molecules. Finally, the filtrate was ultrafiltered using a Prep/Scale Tangential Flow Filtration (TFF) 2.5 ft<sup>2</sup> cartridge with a molecular weight cut off of 1 kDa (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Permeates were collected, demineralized by conventional electrodialysis and finally freeze-dried.

#### **3.4.2.2. Membranes**

Three UF membranes made of polyether sulfone (PES) with molecular weight exclusion limits or molecular weight cut-off (MWCO) of 50, 20, and 5k Da were purchased from Synder filtration (Vacaville, CA, USA). Unlike in classical filtration processes where higher pressure is applied, previous papers published on EDMF demonstrated that the MWCO of UF membranes should be about ten times higher than the size of proteins or peptides to be successfully migrated due to steric hindrance from the hydration layer [27]. Indeed, in an electro-ultrafiltration module, Bargeman et al. (2002) observed that the migration of  $\alpha_{S2}$  casein f(183–207) was strongly reduced when a membrane with a MWCO of 20 kDa (six-times higher than the molecular weight of the peptide) was used due to the friction of peptides in the membrane pores [41]. This was also confirmed for EDUF by previous works by our team on peptides and chitosan oligomers [42]. While food-grade Neosepta CMX-SB cationic membranes and Neosepta AMX-SB anionic membranes were obtained from Tokuyama Soda Ltd. (Tokyo, Japan).

### **3.4.3. Analyses**

#### **3.4.3.1. pH**

The pH of all solutions was measured and kept constant throughout the experiments using a pH-meter model SP20 (Thermo Orion, West Chester, PA, USA) equipped with a VWR Symphony epoxy gel combination pH electrode (VWR Montreal, QC, Canada).

#### **3.4.3.2. Relative energy consumption of the EDUF process**

The energy consumption during EDUF process was calculated using Eq. (1):

$$EC = \int_{t=0h}^{t=6h} I * U dt \quad (1)$$

Where,  $EC$  is the energy (Wh),  $I$  the current intensity (A) and  $U$  the voltage (V). The relative energy consumption during EDUF treatment was then calculated by dividing the total energy by total grams of peptides obtained at the end of the treatment.

#### **3.4.3.3. Peptide concentration and Nitrogen concentration determination**

To follow the peptide migration during the EDUF separation, the peptide concentrations in all the solutions, were determined using micro bicinchoninic acid ( $\mu$ BCA) protein assay reagents (Pierce, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin (BSA) as standard protein. The microplate was incubated with a mix of 150  $\mu$ L of the sample and 150  $\mu$ L of the working reagent, at 37° C during 2 h. Then, the microplate has been cooled to room temperature and the absorbance was read at 562 nm on a microplate reader (Thermomax, Molecular devices, Sunnyvale, CA).

Nitrogen concentrations were analysed in final lyophilized fractions using a LECO Model 601-500 FP 528 apparatus (LECO corporation, St. Joseph, MI, USA). Samples of 0.150 g were analyzed in duplicate. The protein content was determined using the protein factor of 6.25 (% Nitrogen  $\times$  6.25). The instrument was previously calibrated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

#### **3.4.3.4. Final peptide migration rates.**

Final migration rates of peptides (MR) in recovery compartments were calculated using Eq. (2):

$$MR = \frac{F \times L}{t \times S} \quad (2)$$

Where, F is the concentration at t time in g/mL, L the volume of the final solution in mL, t the duration for reaching F concentration in hour and S the total UF membrane area in m<sup>2</sup>.

### 3.4.3.5. RP-UPLC and mass spectrometry analyses

The RP-UPLC analyses were done according to the previous study from Durand et al., (2018) [154]. Briefly, a 1290 Infinity II UPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to separate samples before entering in the mass spectrometer. The EDUF fractions were diluted to 0.5 mg/mL, then filtered through 0.22μm PVDF filter into a glass vial. 5 μL of each sample were loaded onto an Acquity UPLC CSH 130 1.7μm C18 column (2.1mm i.d.×150mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) at a flow rate of 400μL/min and a temperature of 45°C. A linear gradient from 2% to 25% over 50 minutes, and ramping to 90% until 57 minutes was used. The gradient consisted of a solvent A, which was LC-MS grade water with 0.1% formic acid, and a solvent B, which was LC-MS grade ACN with 0.1% formic acid. Each sample was run in triplicate for statistical evaluation of technical reproducibility.

A hybrid ion mobility quadrupole TOF mass spectrometer (6560 high definition mass spectrometry (IM-Q-TOF), Agilent, Santa Clara, USA) was used to identify the composition of each EDUF fractions. All LC-MS/MS experiments were acquired using Q-TOF. Signals were recorded in positive mode at Extended Dynamic Range, 2Ghz, 3200m/z with a scan range between 100–2000m/z. Nitrogen was used as the drying gas at 13.0 L/min and 150°C, and as nebulizer gas at 30 psig. The capillary voltage was set at 3500 V, the nozzle voltage at 300 V and the fragmentor at 400 V. Data analysis were done using the Agilent Mass Hunter Software package (LC/MS Data Acquisition, Version B.07.00 and Qualitative Analysis for IM-MS, Version B.07.00 with BioConfirm Software). Additional search was done using the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev B.05.00.180. The Salmonidae protein database was used to search and identified potential peptides

### **3.4.3.6. Glucose uptake experiments**

Glucose uptake experiments were conducted as previously described by Roblet et al., 2013. L6 skeletal muscle cells were grown in an  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM) containing 2% (v/v) fetal bovine serum (GBS) in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C [71]. Cells were plated at 600,000 cells/plate in 24-well plates to obtain about 25.000 cells/mL. The cells were incubated 7 days, to reach their complete differentiation to myotubes (7 days post-plating). L6 myotubes were deprived of GBS for 3h, with a  $\alpha$ -MEM containing 0% of GBS. Then, the cells were incubated for 75 minutes, with 10  $\mu$ l of EDUF fractions at a concentration of 1  $\mu$ g/mL and 1 ng/mL. Finally, insulin was added (10  $\mu$ l at 1.10<sup>-5</sup>M) for 45 min. Experiments were repeated 9 times, and each repetition was run in triplicate. After experimental treatments, cells were rinsed once with 37 °C HEPES-buffered solution (20 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) and were subsequently incubated in HEPES-buffered solution containing 10  $\mu$ M 2-deoxyglucose and 0.3  $\mu$ Ci/mL 2-deoxy-[<sup>3</sup>H] glucose for 8 minutes. Then, the cells were rinsed three times with 0.9% NaCl solution at 4°C and then frozen. The next day, the cells were disrupted by adding 500  $\mu$ l of a 50 mM NaOH solution. The radioactivity was determined by scintillation counting. Protein concentrations were determined by the BCA method, and results of glucose uptake were expressed in pmol/min.mg of protein.

### **3.4.4. Statistical analyses**

Peptide concentration, relative abundance, membrane conductivity and thickness, glucose-transport array value between different peptide fractions were subjected to a one-way analysis of variance (Anova) using SAS software version 9.1 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) with a significant P values of 0.05 for acceptance.

The relative energy consumption was compared by student's t-test (P<0.05 as probability level for acceptance)

## 3.5. Results and discussion

### 3.5.1. Evolution of peptide concentration and final migration rates

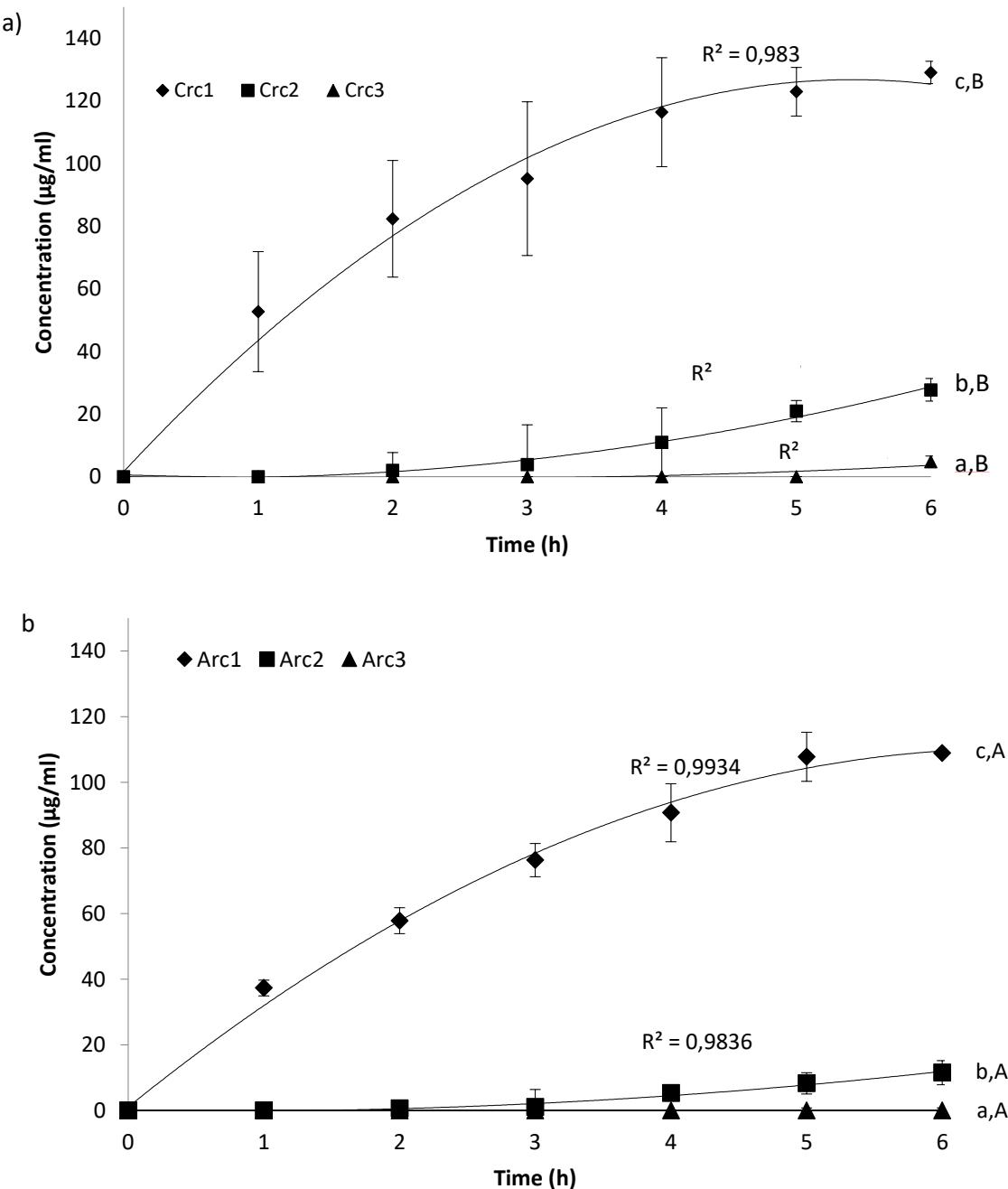


Figure 3-2: Evolution of peptide concentration in (a) cationic (Cationic Recovered Compartment 1, Cationic Recovered Compartment 2, Cationic Recovered Compartment 3, respectively, CRC1, CRC2, and CRC3) and (b) anionic (Anionic Recovered Compartment 1, Anionic Recovered Compartment 2, Anionic Recovered Compartment 3, respectively ARC1, ARC2, and ARC3) compartments during 6 h of the electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) process. Lowercase letters are used to compare the three recovered compartments of the same configuration where capital letters are used to compare the recovered compartments between anionic and cationic configurations. Values followed by different letters were statistically different.

The pattern of peptide separation and concentration as a function of time in recovery compartments of both cationic and anionic configurations measured by micro-BCA method is represented in Fig. 3-2. As expected, significant differences ( $P<0.05$ ) were obtained concerning the peptide concentrations in the recovery compartments in the order of  $C_{RC1}>C_{RC2}>C_{RC3}$  for cationic configuration and  $A_{RC1}>A_{RC2}>A_{RC3}$  for anionic configuration. Indeed, final concentrations obtained for cationic fractions were  $129.10 \pm 3.57$ ;  $27.74 \pm 3.61$  and  $4.78 \pm 1.80 \mu\text{g/mL}$  corresponding to peptide migration rates (shown in Table 5) ranging from 0.13 to  $3.9 \text{ g/m}^2\cdot\text{h}$ . At the same time, the final concentration recovered in the anionic configuration were  $108.91 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$  and  $11.51 \pm 3.66 \mu\text{g/mL}$ , corresponding to peptide migration rates from 0.24 to  $2.24 \text{ g/m}^2\cdot\text{h}$  (shown in Table 3-1). No significant peptide migration ( $P>0.05$ ) was observed in the  $A_{RC3}$  compartment after 6 h of EDUF treatment. However, in this particular sample, nitrogen content analysis by LECO results (Tab. 3-1) showed the presence of very low concentrations of peptide (0.15%) (p/p) in the final powder, after lyophilisation of the recovery compartments).

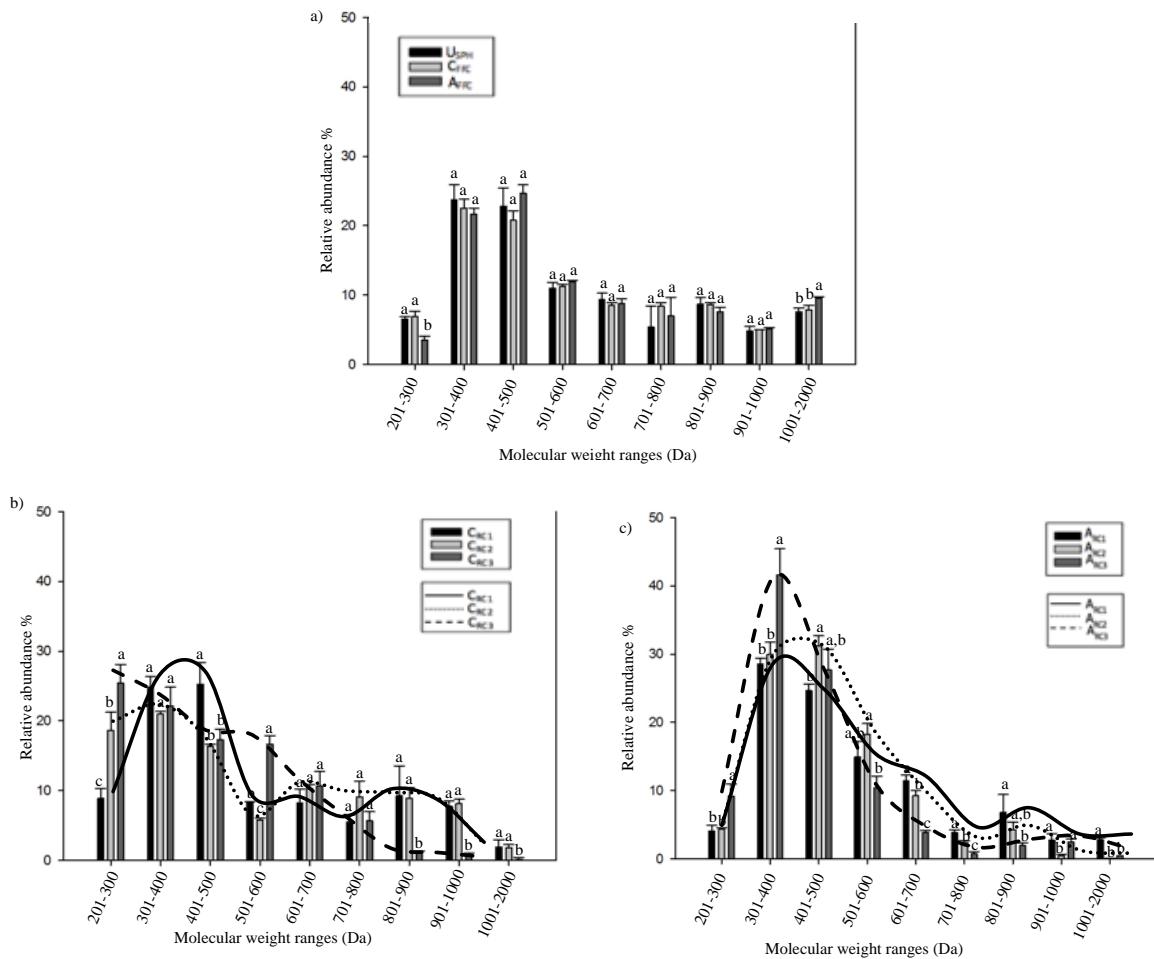
*Tableau 3-1 The relative energy consumption, peptide migration rate, and peptide concentration in cationic and anionic configuration compartments. lowercase letters are used to compare the three recovered compartments of the same configuration, means with different lowercase letters are significantly different ( $p < 0.05$ ). Whereas capital letters are used to compare the recovered compartments between anionic and cationic configuration, means with different capital letters are significantly different ( $p < 0.05$ )*

EDUF fractions	Peptide (%)	Peptide migration rate ( $\text{g/m}^2\cdot\text{h}$ )	Relative energy	
			Consumption (Wh/g)	—
USPH	80.83	—	—	—
Cationic	—	—	$512.56 \pm 95.59^b$	—
$C_{FFC}$	67.16	—	—	—
$C_{RC1}$	9.20	$3.19 \pm 0.14^{a,A}$	—	—
$C_{RC2}$	1.79	$0.73 \pm 0.06^{b,A}$	—	—
$C_{RC3}$	0.33	$0.13 \pm 0.06^{c,A}$	—	—
Anionic	—	—	$849.71 \pm 80.18^a$	—
$A_{FFC}$	71.88	—	—	—
$A_{RC1}$	6.67	$2.24 \pm 0.21^{a,B}$	—	—
$A_{RC2}$	0.37	$0.21 \pm 0.06^{b,B}$	—	—
$A_{RC3}$	0.15	$0.01 \pm 0.04^{c,B}$	—	—

Peptides have to migrate further from the inlet feed solution to reach compartment 2 and even more to reach compartment 3 as compared to compartment 1. So, only low molecular weight peptides and/or larger peptides with high charge density could reach compartments 2 and 3 and migrate through the UF-20 and UF-5 kDa membranes. This is confirmed by previous studies carried out on flaxseed cationic peptides [150] and snow crab anionic peptides [155] for a configuration composed of two UF membranes with different MWCOs. Differences observed between the cationic configuration and the anionic configuration could be due to the higher cationic peptide concentrations generated by the successive digestion with pepsin and trypsin/chymotrypsin. These results were in accordance with works of Udenigwe et al., 2012 on flaxseed hydrolysate protein, where a higher peptide concentration was observed in the cationic compartment after the EDUF separation. Moreover, in the present study, for the CRC<sub>1</sub> and ARC<sub>1</sub> compartments, results showed a linear increase of the migration rate during the first four hours of EDUF treatment, and then a slowdown appeared in migration rates during the last two hours. These results could be due to an alteration of the membrane (UFMs and ion-exchange membranes (IEMs)) integrity or to a membrane fouling.

### **3.5.2. Characterization of Peptide profile by RP-UPLC-MS**

Peptides of low molecular weight (MW) in 301 - 500 Da range were the most prevalent in the unfractionated SPH (U<sub>SPH</sub>) (46.6% of total abundance) (Fig 3-3a).



**Figure 3-3** Profiles of peptide molecular weight in (a) USPH, CFFC, and AFFC, (b) cationic compartments (CRC<sub>1</sub>, CRC<sub>2</sub>, and CRC<sub>3</sub>) and (c) anionic compartment (ARC<sub>1</sub>, ARC<sub>2</sub>, and ARC<sub>3</sub>) generated after 6 h of the EDUF process. Means with different lowercase letters within a molecular weight range are significantly different ( $p < 0.05$ ).

These results were in accordance with previous results obtained by Roblet et al., 2016 [113]. Indeed, similar relative abundances were found for molecular weight ranging from 301 to 500 Da. After 360 min of EDUF treatment, a significant decrease ( $P < 0.005$ ) was observed for levels of peptides ranging from 201–300 Da in the cationic configuration (C<sub>FFC</sub>) and a significant increase ( $P < 0.05$ ) for levels of peptides from 1001 – 2000 in the anionic collection compartments (A<sub>FFC</sub>). No difference ( $P > 0.05$ ) was observed between amounts of peptides accumulated in C<sub>FFC</sub> and A<sub>FFC</sub> compartments for the peptides from other size ranges (Fig. 3-3a).

Fig. 3-3b compares the abundance of the different peptides in terms of MW after 6 h of EDUF separation among the C<sub>R<sub>1</sub></sub>, C<sub>R<sub>2</sub></sub> and C<sub>R<sub>3</sub></sub> compartments. It appeared that the peptide abundances followed a normal distribution that was shifted toward the low molecular weight peptides

(LMWPs) as the migration progressed. Indeed, maximal accumulation of peptides for the  $C_{RC1}$  ( $25.26 \pm 3.08\%$ ) was observed for MW ranging from 401 to 500 Da. Concerning  $C_{RC2}$  maximal abundance of  $20.96 \pm 0.38\%$  was observed for MWs ranging from 301-400 while for  $C_{RC3}$  highest peptide accumulations ( $25.40 \pm 2.69\%$ ) was observed for MWs ranging from 201 to 300 Da.

The peptide abundances obtained from the anionic configuration are shown in Fig. 3-3c. Concerning anionic recovery compartments, the majority of peptides ranged in size from 301 to 500 Da. The results also demonstrated that  $A_{RC3}$  contained highest peptide accumulations for MWs ranging from 201 to 300 and 301 to 400 Da ( $9.19 \pm 1.82$  and  $41.64 \pm 3.79\%$  of the total accumulation, respectively) comparatively to  $A_{RC2}$  and  $A_{RC1}$ . Indeed, due to their highest charge and/or lower MWs, peptides ranging from 201 to 400 Da were more able to cross all UFM and reached the last compartment. While peptides with MWs between 401 to 500 and 501 to 600 Da were significantly higher in the  $A_{RC2}$  comparatively to the  $A_{RC1}$  and  $A_{RC3}$ , respectively. Finally, level of high molecular weight peptides (HMWPs) (over 601 Da) was higher in the  $A_{RC1}$  ( $27.69 \pm 1.85\%$ ) comparatively to the  $A_{RC2}$  and  $A_{RC3}$  ( $16.33 \pm 1.58$  and  $9.40 \pm 0.51\%$ ).

As expected, a decrease in the average size of peptides was observed as follows:  $C_{FFC} > C_{RC1} > C_{RC2} > C_{RC3}$  for the cationic configuration and  $A_{FFC} > A_{RC1} > A_{RC2} > A_{RC3}$  for the anionic configuration, which confirmed the high selectivity of the EDUF process.

### 3.5.3. Relative Energy Consumption

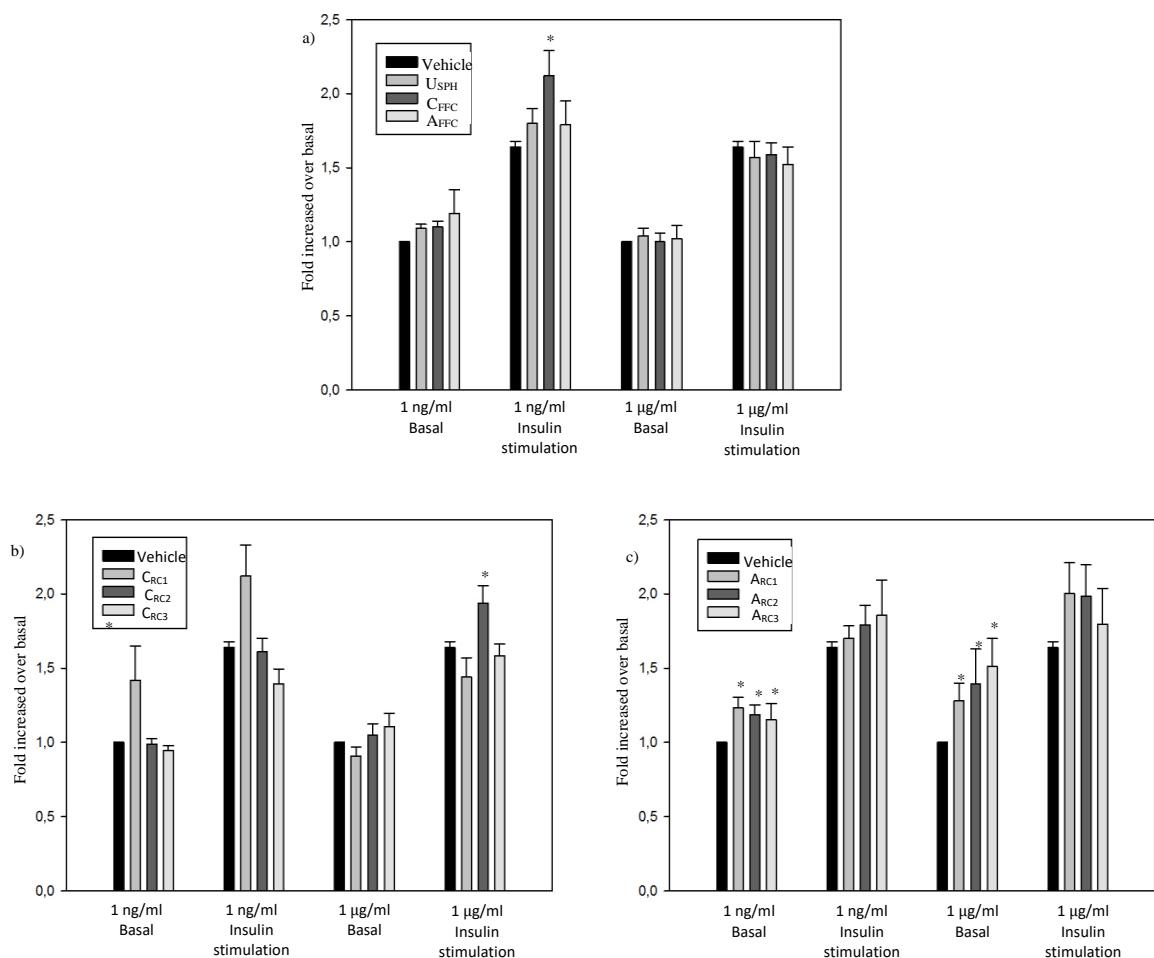
The relative amount of energy consumed is a measure of the energy used for the migration of one gram of peptides and was reported in table 3-1. The results were found to be 512 and 849 Wh/g for cationic and anionic configurations, respectively. The lowest energy consumption was observed for the cationic configuration due to its higher global migration rate. Indeed, as previously demonstrated by Koumfig Noudou et al., 2016, the increase of the inlet peptide concentration resulted in a decrease of the relative energy consumption [186]. The relative energy consumption varied depending on the cell configuration, the voltage applied and the peptide migration rate, as demonstrated in previous works, with values ranging from 3.53 to 631 Wh/g [155,186].

### 3.5.4. Glucose Uptake Experiments

The effect of salmon peptide (recovered, initial and post treatment) fractions on *in vitro* glucose uptake on L6 skeletal muscle cells using two different peptide concentrations (1ng /mL and 1  $\mu$ g/mL) were measured in basal and insulin-stimulated conditions. Results presented in Fig. 3-

4a show a significant enhancement ( $P<0.05$ ) of insulin-stimulated glucose uptake for the C<sub>FFC</sub> at 1 ng/mL (29%) but not for the USPH and A<sub>FFC</sub> (in absence or presence of insulin stimulation). However, glucose uptake was not affected by any of the fractions used (USPH, C<sub>FFC</sub> or A<sub>FFC</sub>) at 1  $\mu$ g/mL in the presence or absence of insulin. These results are in accordance with previous works of Roblet *et al* (2016), where a limited effect of the initial salmon protein hydrolysate was observed at 1 ng/mL and 1  $\mu$ g/mL. While the final solution recovered in the feed compartment showed a significant enhancement of the glucose uptake at pH 6 [113].

As shown in Fig. 3-4b, after 6 h of EDUF separation in the cationic configuration, only C<sub>Rc1</sub> showed a significant bioactivity ( $P<0.05$ ) at 1 ng/mL on both basal (42%) and insulin-stimulated glucose uptake (29%) but not at 1  $\mu$ g/mL. Conversely, C<sub>Rc2</sub> significantly enhanced glucose uptake (18%) in the presence of insulin at 1  $\mu$ g/mL but not at the lower concentration (Fig. 3-4b).



*Figure 3-4 Glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells in absence or presence of insulin stimulation by (a) USPH, CFFC, and AFFC, (b) cationic compartments ( $C_{RC1}$ ,  $C_{RC2}$ , and  $C_{RC3}$ ) and (c) anionic compartments ( $A_{RC1}$ ,  $A_{RC2}$ , and  $A_{RC3}$ ) generated after 6 h of the EDUF process. Data represent mean  $\pm$  SEM, n = 9. One asterisk indicate that mean values are significantly different ( $p < 0.05$ ) than the mean value for the control.*

Interestingly,  $C_{RC3}$  was found to significantly decrease (15%) insulin-induced glucose uptake ( $P < 0.05$ ) at 1 ng/mL but had no effect at the higher concentration or on basal glucose uptake. According to these results, it appeared that  $C_{RC3}$  fraction have no anti-diabetic potential suggesting that the  $C_{RC3}$  may contain some inhibitory peptides. The CFFC fraction, obtained from the USPH at the end of the EDUF process, and thus depleted in cationic peptides, was found to have higher glucose uptake activity than USPH in the presence of insulin. In addition,  $C_{RC1}$  presented a similar or higher glucose uptake response as CFFC independent of the condition. It is also important to note that, in the basal state, the  $C_{RC1}$  at 1 ng/mL was able to stimulate glucose uptake to the same extent than insulin alone. Additionally, at 1 µg/mL since no significant increase in glucose uptake for

both C<sub>FFC</sub> and C<sub>RC1</sub> was reported in the presence or absence of insulin stimulation, let us conclude that their glucose uptake response was not dose-dependent, suggesting that some neutral peptides in the fractions may have masked the bioactivity of the positive ones. Concerning the glucose uptake stimulation in basal condition, these results were in accordance with previous works obtained by Roblet *et al* (2016). Authors demonstrated a significant enhancement of the glucose uptake in absence of insulin stimulation for the cationic fraction at pH 6 as the C<sub>RC1</sub> [113]. While, for the bioactivity in presence of insulin stimulation differences appeared. Indeed, in previous works, the glucose uptake was not affected by the cationic fraction while C<sub>RC1</sub> and C<sub>RC2</sub> showed a significant enhancement of the glucose uptake with insulin stimulation. These differences could be due to the EDUF configuration (three UFM with MWCOs of 50, 20 and 5 kDa vs one UFM with a MWCO of 20 kDa) and separation parameters (duration : 6 hours vs 1 hour ; electric field strength of 6 V/cm vs 14 V/cm ; initial peptide concentration of 0.7% vs 2% [113] ) which allowed to recovered a higher peptide concentration and a higher diversity of peptides causing such differences. Moreover, amongst all cationic peptides separated in the different fractions, using Mass Profiler Professional software, MWs and retention time (Tab. 3-2) of seventeen peptides were found to be simultaneously and specifically present in all three bioactive fractions (C<sub>FFC</sub>, C<sub>RC1</sub> and C<sub>RC2</sub>).

Concerning anionic fractions, all recovered fractions (A<sub>RC1</sub>, A<sub>RC2</sub> and A<sub>RC3</sub>) demonstrated a significant enhancement of the bioactivity ( $P<0.05$ ) for both concentrations (1 ng/mL and 1  $\mu$ g/mL) at the basal level (Fig 3-4c) and a tendency (not statistically significant,  $P>0.05$ ) to be increased in insulin stimulated conditions. Moreover, very interestingly, both A<sub>RC2</sub> and A<sub>RC3</sub> showed the same increased in glucose uptake ( $P=0.31$  and  $P=0.55$ , respectively) than insulin, while A<sub>RC1</sub> was not able to reach the same level of bioactivity ( $P = 0.01$ ). That could be explained by the selectivity of the process leading to the concentration of bioactive peptides in the second and last compartments. Nevertheless, the A<sub>FFC</sub> fraction depleted in anionic peptides did not show any improvement of glucose uptake. Roblet *et al* (2016) also observed a significant effect of anionic fractions recovered at both pH 3 and pH 9 on glucose uptake modulation in the absence of insulin stimulation, while a limited effect was observed for the anionic fraction obtained at pH 6 [113]. The greater effect obtained on glucose uptake modulation by the three A<sub>RC</sub> (A<sub>RC1</sub>, A<sub>RC2</sub> and A<sub>RC3</sub>) fractions comparatively to the anionic fraction obtained in previous work could be explained, as for the cationic fractions, by differences concerning the EDFM configuration and separation

parameters [155,187]. Using the same method as for cationic peptides, the MWs of twenty-one anionic peptides present in all bioactive anionic recovered fractions (ARC1, ARC2 and ARC3) were identified (Tab. 3-2).

*Tableau 3-2 Cationic and anionic peptides simultaneously present in each cationic (Cffc, Crc1 and Crc2) and anionic (Arc1, ARC2 and Arc3) bioactive fractions*

Cationic peptides				Anionic peptides			
#	Rt	MW	Frequency	#	Rt	MW	Frequency
<b>1</b>	6.655	627.3711	8	<b>1</b>	9.878	416.2344	8
<b>2</b>	8.844	671.3281	8	<b>2</b>	10.172	456.2654	8
<b>3</b>	12.663	794.4654	9	<b>3</b>	14.991	531.2895	9
<b>4</b>	13.862	507.2681	9	<b>4</b>	15.240	409.1843	9
<b>5</b>	13.910	843.4589	9	<b>5</b>	15.271	503.2657	8
<b>6</b>	13.910	719.4219	9	<b>6</b>	15.750	502.2628	9
<b>7</b>	13.915	956.5451	9	<b>7</b>	16.536	444.2577	9
<b>8</b>	14.035	1085.6240	8	<b>8</b>	18.710	869.5485	9
<b>9</b>	14.141	801.4025	8	<b>10</b>	19.019	502.2713	8
<b>10</b>	16.378	805.4078	9	<b>11</b>	19.783	407.2053	9
<b>11</b>	16.491	372.2368	8	<b>12</b>	20.905	515.3020	8
<b>12</b>	18.962	473.3213	9	<b>13</b>	21.399	407.2056	9
<b>13</b>	18.963	643.4267	9	<b>14</b>	22.346	458.2737	9
<b>14</b>	21.274	634.3794	9	<b>15</b>	23.048	494.2369	9
<b>15</b>	25.261	409.2029	9	<b>16</b>	23.091	542.2369	9
<b>16</b>	27.316	434.2523	9	<b>17</b>	24.073	431.2728	9
<b>17</b>	30.407	1014.5737	9	<b>18</b>	24.089	592.2850	9
				<b>19</b>	26.698	829.3969	9
				<b>20</b>	26.855	458.2721	9
				<b>21</b>	29.435	660.3509	8

Finally, anionic peptides increased specifically glucose uptake in the absence of insulin stimulation, while cationic peptides increased it in the presence of insulin stimulation. In skeletal

muscle cells, glucose uptake can be modulated by at least two different signaling pathways, the IRS-1/PI3K/Akt (insulin dependent) and 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) (insulin independent) [188]. As previously explained, anionic peptide seems to stimulate the glucose uptake in absence of insulin stimulation while for cationic peptide, a better response was obtained in insulin stimulation condition. Therefore, it is possible that these anionic and cationic peptides reported in table 2 stimulate different pathways involved in glucose uptake. These two pathways are well known for their critical role for glucose transporter translocation to the muscle cell surface in presence or absence of insulin. Moreover, these pathways were identified as therapeutic target of anti-diabetic drugs as metformin and TZD, the activation of these pathways by EDUF isolated salmon bioactive peptide could represent a therapeutic or preventive potential of T2D [42]. To verify this hypothesis, further investigation should be carried out to confirm if these fractions are potential activators of the IRS-1/PI3K/AKT and/or AMPK pathways.

### **3.6. Conclusions**

The simultaneous separation of peptides by three UFM<sub>s</sub> (50, 20 and 5 kDa MWCO) stacked in an electrodialysis system allowed the generation of specific cationic and anionic fractions with different MW profiles and levels of glucose uptake response. As expected, significant decreases were observed concerning the peptide concentrations, in the recovery compartments in the order of C<sub>FFC</sub>>C<sub>RCl</sub>>C<sub>RC2</sub>>C<sub>RC3</sub> and A<sub>FFC</sub>>A<sub>RCl</sub>>A<sub>RC2</sub>>A<sub>RC3</sub> for the cationic and anionic configurations, respectively. Moreover, the peptide profiles in terms of MWs followed the same tendency than the peptide concentrations with HMWPs concentrated in the feed compartment while LMWPs were able to cross the three UFM<sub>s</sub> stacked in the electrodialysis and some reached the last compartment. For the first time, a triple size-separation by EDUF allowed to concentrate, by one step, bioactive peptides in the C<sub>RCl</sub> and inhibitor peptides in C<sub>RC3</sub>. Coupling the EDMF-based separation of peptides with bioassay-guided validation of their metabolic activity with LC-MS identification allowed the identification of potential antidiabetic peptides from a complex salmon frame protein hydrolysate containing more than 1000 different peptides. Hence a pre-separation by EDUF appeared as a new powerful tool and key step for accelerating peptide identification. Nevertheless, further mass spectrometry analysis is needed to identify and determine the distribution of each peptide in the fractions and if the bioactivity is linked to one or more peptides in these fractions. These peptides were recently synthesised and their bioactivity measurements during *in vitro* tests, alone or in combination, are currently under way to confirm the anti-diabetic activity of these peptides.

### **3.7. Acknowledgements**

The authors are thankful to Bruno Marcotte for his technical assistance and, Cooke Aquaculture for providing the salmon frames. This work was also supported by the “Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada” (CRSNG), the Consortium de

Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels au Québec (CRIBIQ), the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). Authors would also thanks Mitacs for their financial supports by a Cluster grant program: Salmon peptides identification and purification and their insulin modulation. Special gratitude goes to Shyam Suwal and Muhammad Javeed Akthar for EDUF separation experiments.

# **Chapitre 4**

**Simultaneous Glucoregulatory and  
Anti-Inflammatory activities of  
Peptides fractions from Salmon  
Protein Hydrolysate obtained  
following their separation by  
electrodialysis with ultrafiltration mem-  
brane, and peptide identification: a nat-  
ural product approach against type 2  
diabetes**

#### **4. Simultaneous Glucoregulatory and Anti-Inflammatory activities of Peptides fractions from Salmon Protein Hydrolysate obtained following their separation by electrodialysis with ultrafiltration membrane, and peptide identification: a natural product approach against type 2 diabetes**

Les auteurs sont : Loïc Henaux (candidat au doctorat, planification et réalisation des expériences, analyses des résultats et rédaction de l'article), Jacinthe Thibodeau (professionnelle de recherche, supervision de l'étudiant pour les analyses LC-MS), Geneviève Pilon (Supervision de l'étudiant pour les études *in vitro*, correction et révision du manuscrit) Tom Gill (collaborateur scientifique du projet, correction et révision du manuscrit), André Marette (Supervision de l'étudiant pour les études *in vitro*, co-directeur de thèse, correction et révision du manuscrit) et Laurent Bazinet (directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction et révision du manuscrit).

La soumission de cet article est en attente d'une décision concernant la prise d'un brevet.

## **Transition contextuelle**

Dans le chapitre précédent, les conditions spécifiques de fractionnement ont permis de générer des fractions anioniques ayant toutes démontré la capacité d'augmenter la captation du glucose. Le(s) peptide(s) à l'origine de cette bioactivité possédaient donc une mobilité électrophorétique suffisante pour atteindre le dernier compartiment (des peptides de petits poids moléculaires et/ou possédant plusieurs charges). De plus, il a été possible de séparer en une seule étape des peptides cationiques stimulants l'absorption du glucose et des peptides inhibiteurs de cette bioactivité. Néanmoins, le DT2 est une maladie affectant plusieurs tissus régulateurs du glucose, comme les muscles squelettiques en diminuant la captation du glucose sanguin mais aussi le foie en altérant les voies de stockage du glucose et favorisant sa production, aboutissant à une hyperglycémie chronique. De plus, l'inflammation du tissu adipeux contribue au développement de l'insulinorésistance.

Les objectifs de cette présente étude étaient en premier lieu de réaliser une seconde étape d'EDUF sur les fractions finales ( $A_{FFC}$  et  $C_{FFC}$ ) obtenues dans le chapitre précédent, et 1) d'étudier la capacité des fractions générées par cette seconde séparation à stimuler l'absorption du glucose par les cellules musculaires, 2) à également la production de glucose par les cellules hépatiques, et finalement, 3) à diminuer la réponse inflammatoire chez des macrophages. Dans un deuxième temps, de caractériser et identifier la séquence de peptides pouvant être à l'origine de ces bioactivités.

## **4.1. Résumé**

Le diabète de type 2 (T2D) est un trouble métabolique complexe incluant de nombreux facteurs de risque, tels que l'intolérance au glucose, l'insensibilité à l'insuline et l'inflammation chronique. Les peptides bioactifs sont des candidats appropriés pour une nouvelle ère de produits pharmaceutiques, en particulier avec les préoccupations accrues des effets secondaires des médicaments. L'objectif de cette étude était de concentrer par EDUF des peptides glucorégulateurs et anti-inflammatoires d'hydrolysats de protéines de saumon. Ainsi, deux configurations (1 et 2) d'EDUF ont été utilisé afin de retirer des fractions d'alimentations,  $A_{FFC}$  et  $C_{FFC}$ , les peptides cationiques et anioniques, respectivement. Après, 4 heures de séparation par EDUF, deux fractions ont démontré des propriétés très intéressantes. En effet, les fractions  $A_{FFC}$  (la fraction d'alimentation utilisée pour la configuration 1) et  $C_{FFC2}$  (la fraction finale obtenue dans le compartiment d'alimentation de la configuration 2) ont toutes les deux démontré des activités biologiques en 1) augmentant l'absorption du glucose dans des cellules L6, en présence d'insuline et à une concentration de 1ng/mL, de 12 and 21% (comparativement à l'insuline seule), respectivement. De plus 2), ces fractions ont permis de diminuer la sécrétion du glucose par les cellules hépatiques en condition basale (sans insuline) de 17% et 16%, mais aussi en présence d'insuline de 25% et 34%, respectivement. Finalement 3), ces fractions ont aussi permis de réduire la production de nitrite par des macrophages, suite à une réponse inflammatoire induite par la présence de LPS, de 45% et 30%, respectivement. L'analyse par LC-MS/MS de ces fractions bioactives, a permis d'identifier la séquence de 24 peptides, issus de coproduits de saumon et potentiellement antidiabétiques. Pour la première fois, que des fractions bioactives obtenues par EDUF, ont démontré leurs efficacités sur trois bioactivités différentes, et pouvant représenter des fractions naturelles très prometteuses pour la lutte contre le diabète de type 2.

## **4.2. Abstract**

Type 2 diabetes (T2D) is a complex metabolic disorder including numerous risk factors, such as glucose intolerance, insulin insensitivity and chronic inflammation. Bioactive peptides are suitable candidates for a new era of pharmaceutical products, especially with the heightened concerns of

side effects of small molecule drugs. The aim of this study was to concentrate gluco-regulatory and anti-inflammatory peptides by EDUF. Two EDUF configurations (1 and 2) were used to concentrate anionic and cationic peptides in recovery compartments ( $K_{CL^-}$  and  $K_{CL^+}$ ). After 4 hours of EDUF separation, two fractions demonstrated very interesting properties. Indeed,  $A_{FFC}$  (the initial fraction of the EDUF configuration 1) and  $C_{FFC2}$  (the final fraction of the EDUF configuration 2) have both shown the biological activities to 1) increase the glucose uptake in L6 muscle cells in insulin condition at 1 ng/mL (by 12 and 21%, respectively), 2) decrease the hepatic glucose production in hepatic cells at 1 ng/mL in basal (17 and 16%, respectively) and insulin (25 and 34%, respectively) conditions and 3) decrease the LPS-induced inflammation in macrophages at 1 g/mL (45 and 30%, respectively). Finally, LC-MS/MS analyses of the bioassay-guided bioactive fractions were used to find sequences matching the identification of twenty-four candidate peptides from salmon by-products that are potentially responsible for the metabolic activities of the fractions, and may therefore represent novel antidiabetic peptides. To the best of our knowledge, it was the first time that bioactive fractions efficient on three bioactivities were obtained after separation by EDUF and consequently represent very promising natural fractions to fight type 2 diabetes.

### **4.3. Introduction**

Type 2 diabetes mellitus (T2D) is a complex metabolic disorder and progressive disease [37]. T2D is associated with environmental causes and behavioural changes as overeating, smoking, physical inactivity, excessive alcohol and junk food consumption [191]. According to the World Health Organization (WHO), noncommunicable diseases (including T2D) are the world's biggest killers. Indeed, more than 36 million people die annually from NCDs (63% of global deaths) [192]. Moreover, according to a recent report from the International Diabetes Federation, in 2000, 151 millions of people aged between 18 to 99 years had the TD2, and the disease has continued to develop since then, and in 2017, 425 millions of people were suffering from T2D [2]. Nevertheless, in order to prevent NCDs and T2D, promoting healthy diet and physical activity are an integral part of the WHO's "Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013–2020" [192]. However, a high proportion of people at risk do not follow these recommendations, and the T2D continues to progress [80].

During the past decade numerous scientific studies highlighted the role of natural products derived from fish byproducts demonstrating their therapeutic and preventive potential against T2D. Indeed, Pillon et al (2011) compared the effects of various fish protein hydrolysates (bonito, herring, mackerel or salmon) on the development of obesity and T2D. Authors observed that all hydrolysates reduce inflammation in adipose tissue. However, only salmon protein hydrolyzate (SPH) preserved insulin sensitivity and limited weight gain, especially visceral fat [13]. SPHs have also demonstrated beneficial effects on the glucose tolerance [4,102] and a reduction of the inflammation by the reduction of macrophages recruitment in *in vivo* studies [4,13,100,101]. The effect of SPH on the DT2 have also been tested in *in vitro* studies. SPHs have decreased the inflammation by reducing the activity of iNOS, involved in the development of the insulin resistance. Moreover, the SPH have also demonstrated its capacity to increase the glucose uptake [4,113] and to decrease the hepatic production [4]. These bioactivities were demonstrated to be to the presence of low molecular (<1kDa) bioactive peptides in the SPHs [4,113]. Nevertheless, the identification of these bioactive peptides have never been done.

BPs are suitable candidates for a new era of pharmaceutical products, especially with the heightened concerns of side effects of small molecule drugs [127]. Nevertheless, BPs are fragments that are encrypted in the primary sequences of proteins, conferring functions beyond

basic nutritional benefit [193]. Because these peptides are generated by protein hydrolysis, they can represent only minor constituents in a highly complex matrix, further separation steps are needed to concentrate these peptides and optimize their bioactive effects [194].

Hence, very recently, the efficiency of EDUF to generate bioactive fractions from a complex hydrolysate such as a salmon-by-product hydrolysate, was demonstrated [195]. Indeed, in our previous study we observed that anionic peptides concentrated in all three anionics recovery compartments ( $A_{RC1}$ ,  $A_{RC2}$  and  $A_{RC3}$ ) could increase the glucose uptake in basal condition. Moreover, it was also observed that the initial hydrolysate, when depleted in cationic peptides, also showed an increase of the glucose uptake, as well as, the fraction in basal condition was able to mimic the insulin action and demonstrated the same efficiency to increase the glucose uptake than insulin control. Nevertheless, in the previous chapter (chapter 4), the bioactive properties were focused on the glucose uptake, whereas DT2 is the result of various abnormalities such as hepatic insulin resistance, an impaired of the muscle glucose uptake and a chronic inflammatory state [64]. In this context, the aim of the study was to generate bioactive fractions against T2D and to identify potential peptide sequences. Hence, three bioactivities were studied, such as glucose uptake, hepatic glucose production and anti-inflammatory properties.

## 4.4. Materials and Methods

### 4.4.1. Materials and electrodialysis cell

#### 4.4.1.1. Hydrolysate preparation

The salmon protein hydrolysate (SPH) was produced according to the procedure described previously by Chevrier et al. (2015). Briefly, Salmon frames were thawed, mechanically deboned and homogenized in a 1.0 M NaOH solution. Then, fish proteins were isoelectrically precipitated, recovered and a sequential hydrolysis was carried out with pepsin, then trypsin and chymotrypsin. Once hydrolysis was completed, the supernatant was filtered through a 5  $\mu$ m pore size paper filter to remove any insoluble fat or protein. Finally, the filtrate was subsequently ultrafiltered using a Prep/Scale Tangential Flow Filtration (TFF) 2.5 ft<sup>2</sup> cartridge with 1 kDa exclusion limit (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). The permeates containing peptides with molecular weights <1 kDa were collected, demineralized by electrodialysis and freeze-dried.

#### **4.4.1.2. Chemicals**

KCl was obtained from ACP Inc (Montreal, QC, Canada). Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> from Laboratoire MAT (Quebec City, QC, Canada), acetonitrile optima® LC/MS, 1.0 M HCl and 1.0 M NaOH solutions from Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada), and trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Nylon filters were purchased from Mandel Scientific (Guelph, ON, Canada). Alpha-Minimal Essential Medium ( $\alpha$ -MEM). Fetal Bovine Serum (FBS) and trypsin (0, 25% solution) were obtained from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). 2-déoxy-D-glucose (nonradioactive), CaCl<sub>2</sub>, Hepes-Na and MgSO<sub>4</sub> were obtained from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). NaCl from VWR international (Montreal, QC, Canada). D-2-deoxy-[<sup>3</sup>H] glucose (radioactive) from Perkin Elmer (Woodbridge, ON, Canada). Pierce® BCA Protein Assay Kit BCA, from Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA).

#### **4.4.1.3. Membranes**

One ultrafiltration membrane made of polyether sulfone (PES) with a molecular weight cut-off of 50 kDa was purchased from Synder filtration (Vacaville, CA, USA). Food grade Neosepta CMX-SB cationic membranes and Neosepta AMX-SB anionic membranes were obtained from Astom (Tokyo, Japan).

#### **4.4.1.4. Electrodialysis Configurations**

The electrodialysis cell used for the experiment was an MP type cell with an effective surface area of 100 cm<sup>2</sup>, manufactured by ElectroCell Systems AB Company (Täby, Sweden). The cell was composed of one anion-exchange membrane (AEM), one cation-exchange membranes (CEM), one ultrafiltration membrane (UFMs) with MWCO 50 kDa as illustrated in Fig. 4-1. The electrodes used were a dimensionally stable anode (DSA) and a 316 stainless steel cathode. The electrical potential for the electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) was supplied by a variable 0–100 V power source. Two different cell configurations allowing the separation of cationic or anionic charged peptides from salmon protein hydrolysate were used in the present study. In both configurations, the solutions were circulated using three centrifugal pumps and the flow rates set at 2 L/min using flow

meters (the electrode rinsing solution was maintained at 4 L/min and split in half between the anode and the cathode compartments) (Blue-White Industries Ltd. Huntington Beach, CA, USA).

**First configuration**— Configuration 1, shown in Fig. 4-1a. was arranged for the separation of anionic peptides. The cell was divided into three closed loops; one contained 1.5 L of a KCl solution (2 g/L) for the recovery and concentration of anionic peptides ( $K_{Cl^-}$ ). The feed solution consisting of the C<sub>anionic</sub> Final Feed Compartment (C<sub>FFC</sub>) generated from a previous EDUF separation (see chapter 4) was circulated in the compartment between the UFM and AEM. The recovery solution from the feed compartment was called C<sub>FFC2</sub>. The last loop contains the electrode rinsing solution (20 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 L), splitted into two streams circulating into both electrolyte compartments.

**Second configuration**— Configuration 2 (Fig 4-1b), the compartment containing a KCl solution circulating between the UFM and AEM allowed the recuperation of cationic peptides ( $K_{Cl^+}$ ). The feed solution was circulated in the compartment between the UFM and CEM. The feed solution consisting of the A<sub>cationic</sub> Final Feed Compartment (A<sub>FFC</sub>) generated from a previous EDUF separation (see chapter 4), and the final solution recovered in this compartment was called A<sub>FFC2</sub>. The rinsing electrode solution was circulated into both electrode compartments as for the anionic configuration.

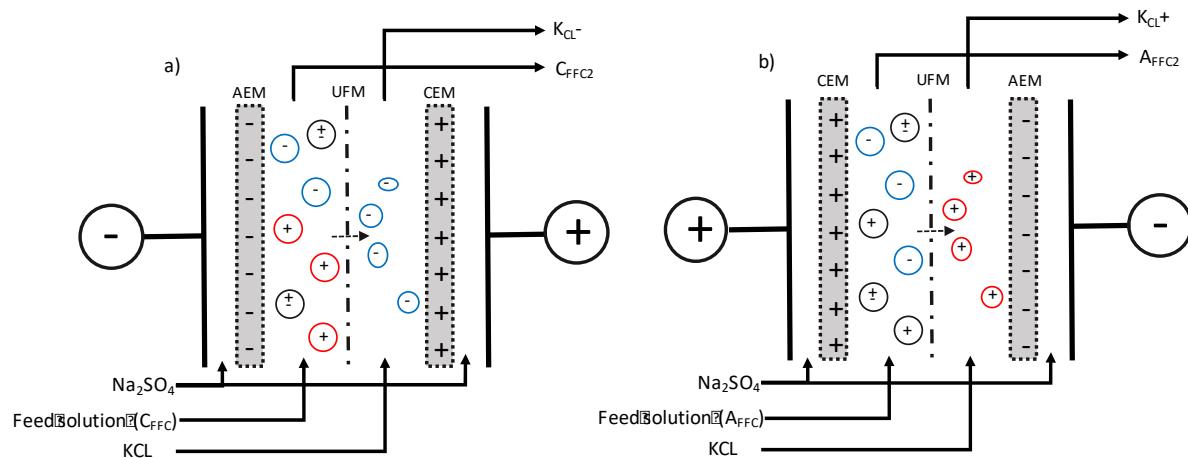


Figure 4-1 Schematic EDUF cell a) configuration n°1 for the fractionation of C<sub>FFC</sub> (Cationic final feed compartment) and b) configuration n°2 for and the fractionation of A<sub>FFC</sub> (Anionic final feed compartment), generated from a previous work [195].

#### 4.4.1.5. Electroseparation protocol

The spray dried SPH was diluted with demineralized water at a final protein concentration of 0.7% (w/v) and the EDUF fractionation was performed for 4 h. EDUF experiments were performed in

batches for both cell configurations using constant electrical field strength of 6 V/cm (corresponding to a current density varying between 0.005 and 0.008 A/cm<sup>2</sup> during the treatment). The system was run at controlled temperature (~16 °C) to prevent growth of microorganisms [184]. The EDUF separations were done at pH 6, the same pH used in our previous study. Indeed, in this study, the final solution recovered in the feed compartment enhanced the glucose uptake at 1 ng and 1 µg/mL in both conditions (basal and stimulated by insulin), and the cationic peptides recovered in the CPC stimulated the bioactivity in basal condition at both 1 ng and 1 µg/m [113]. From these results, the pH of SPH and recovery (KCl) solutions were adjusted to pH 6 before each run with 0.1 N NaOH and/or 0.1 N HCl and maintained constant thereafter [113]. For each treatment 10 mL sample of SPH and recovery solutions were collected every hour before applying voltage and during the treatment to determine the peptide migration rate and their kinetics of migration. The electrical conductivity of the SPH feedstock and recovery solutions was maintained at a constant level by adding KCl, following the recommendations of Suwal *et al*, (2015) [184]. The current intensity, electrical potential differences of the AEM, CEM and UFM were recorded every 30 min during EDUF treatment for both configurations. Finally, 3 replicates of each condition was performed. At the end of each replicate, a cleaning-in-place was performed according to the membrane manufacturer's instructions and the cell was dismantled before being reassembled.

#### 4.4.2. Analyses

##### 4.4.2.1. Glucose Uptake Experiments

Glucose uptake experiments were conducted as previously described by Roblet et al (2013) [6]. L6 skeletal muscle cells were grown in an α-minimum essential medium (α-MEM) containing 2% (v/v) fetal bovine serum (GBS) in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C [71]. Cells were plated at 600,000 cells/plate in 24-well plates to obtain about 25.000 cells/mL. The cells were incubated 7 days, to reach their complete differentiation to myotubes (7 days post-plating). L6 myotubes were deprived of GBS for 3h, with a α-MEM containing 0% of GBS. Then, the cells were incubated for 75 minutes, with 10 µl of EDUF fractions at a concentration of 1 µg/mL and 1 ng/mL. Finally, insulin was added (10 µl at 1.10<sup>-5</sup>M) for 45 min. After experimental treatments, cells were rinsed once with 37 °C HEPES-buffered solution (20 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl,

2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) and were subsequently incubated in HEPES-buffered solution containing 10 µM 2-deoxyglucose and 0.3 µCi/mL 2-deoxy-[<sup>3</sup>H] glucose for 8 minutes. Then, the cells were rinsed three times with 0.9% NaCl solution at 4°C and then frozen. The next day, the cells were disrupted by adding 500 µl of a 50 mM NaOH solution. The radioactivity was determined by scintillation counting. Protein concentrations were determined by the BCA method, and results of glucose uptake were expressed in pmol/min.mg of protein. Experiments were repeated 7 times, and each repetition was run in triplicate

#### **4.4.2.2. Hepatic Glucose Production Experiments**

Hepatic glucose production experiments were conducted as described by Chevrier *et al*, (2015). Briefly, FAO rat hepatocytes were grown and maintained in monolayer culture in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) containing 10% FBS in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were plated at 4.10<sup>6</sup> cells/plate. FAO cells were deprived with 1 mL/well of RPMI without FBS, and the EDUF's fractions were added at 10 µl/well with or without insulin at 1 nmol. Cells were washed three times with PBS, then incubated for 5h (in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C) with EDUF fractions at a concentration of 1 µg/mL and 1 ng/mL, in the presence or absence of insulin at 1 nmol in a hepatic glucose production medium (glucose-free DMEM containing sodium bicarbonate at 3.7 g/L, 2 mmol sodium pyruvate, and 20 mmol sodium L-lactate. Glucose production was measured in the medium by using the Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay kit (Invitrogen). Experiments were repeated 6 times, and each repetition was run in triplicate

#### **4.4.2.3. Anti-inflammatory Experiments**

Anti-inflammatory experiments were conducted as described by Chevrier *et al*, (2015). Briefly, J774 mouse macrophages were grown and maintained in monolayer culture in DMEM high-glucose (25 mmol) medium supplemented with 10% FBS, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were plated at 4.10<sup>6</sup> cells/plate for 24h before the experiment, macrophages were stimulated with 2.5 ng/mL of lipopolysaccharide (LPS) in the presence of EDUF fractions at a concentration of 1 µg/mL and 1 ng/mL for 16h, and the accumulation of nitrite was used as an index of inducible NO synthase. Nitrite was measured by using the Griess method. Then, cells were lysed in 50 mmol NaOH, and protein content was determined by using BCA protein Assay kit. Experiments were repeated 6 times, and each repetition was run in triplicate

#### **4.4.2.4. RP-UPLC and mass spectrometry analyses**

The RP-UPLC analyses were done according to the previous study from Durand et al., (2018) [154]. Briefly, a 1290 Infinity II UPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to separate samples before entering in the mass spectrometer. The EDUF fractions were diluted to 0.5 mg/mL, then filtered through 0.22 $\mu$ m PVDF filter into a glass vial. 5  $\mu$ L of each sample were loaded onto an Acquity UPLC CSH 130 1.7 $\mu$ m C18 column (2.1mm i.d. $\times$ 150mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) at a flow rate of 400 $\mu$ L/min and a temperature of 45°C. A linear gradient from 2% to 25% over 50 minutes, and ramping to 90% until 57 minutes was used. The gradient consisted of a solvent A, which was LC-MS grade water with 0.1% formic acid, and a solvent B, which was LC-MS grade ACN with 0.1% formic acid. Each sample was run in triplicate for statistical evaluation of technical reproducibility.

A hybrid ion mobility quadrupole TOF mass spectrometer (6560 high definition mass spectrometry (IM-Q-TOF), Agilent, Santa Clara, USA) was used to identify the composition of each EDUF fractions. All LC-MS/MS experiments were acquired using Q-TOF. Signals were recorded in positive mode at Extended Dynamic Range, 2Ghz, 3200m/z with a scan range between 100–2000m/z. Nitrogen was used as the drying gas at 13.0 L/min and 150°C, and as nebulizer gas at 30 psig. The capillary voltage was set at 3500 V, the nozzle voltage at 300 V and the fragmentor at 400 V. Data analysis were done using the Agilent Mass Hunter Software package (LC/MS Data Acquisition, Version B.07.00 and Qualitative Analysis for IM-MS, Version B.07.00 with BioConfirm Software). Additional search was done using the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev B.05.00.180. The Salmonidae protein database was used to search and identified potential peptides

#### **4.4.2.5. Statistical Analyses**

Evolutions of peptide concentration and relative abundance were subjected to a one way analysis of variance (Anova) using SAS software version 9.1 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) with Tukey's post hoc tests at a significant P values of 0.05 for acceptance. *In vitro* bioactivity assays (Glucose uptake, hepatic glucose production and anti-inflammatory experiments) were subjected to a one way analysis of variance (Anova) using SAS software version 9.1 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) with Dunnett's post hoc test at a significant P values of 0.05 for acceptance.

## **4.5. Results and discussion**

### **4.5.1. Effect of EDUF fractions on glucose uptake.**

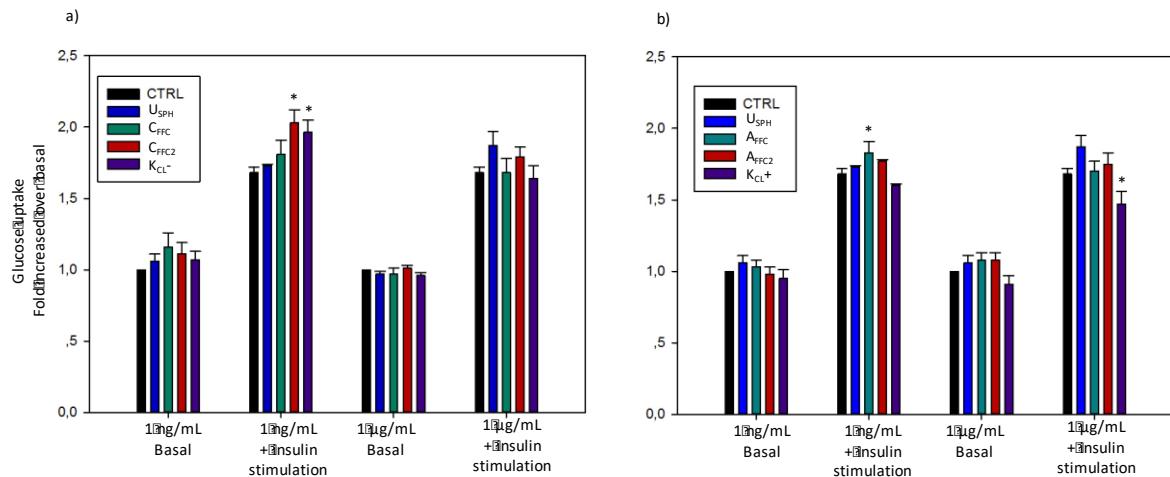
Glucose intolerance has been identified as a major metabolic abnormality involved in the metabolic syndrome, and includes the deficiency of insulin to mediate glucose uptake [196]. *In-vitro* experiments on L6 myocytes were performed to investigate the glucoregulatory effect of EDUF fractions. As presented in Fig 4-2, in basal condition, no effect was observed and that whatever the fraction. Moreover, the initial hydrolysate USPH, demonstrated no effect whatever the concentration or the condition used (basal or insulin condition). However, some EDUF fractions were able to promote the insulin activity on the glucose uptake. Indeed, as shown in figure 4-2a, both C<sub>FFC2</sub> and K<sub>CL-</sub> have significantly increased the glucose uptake in presence of insulin stimulation at 1 ng/mL of 21% and 15%, respectively, while the initial fraction, C<sub>FFC</sub>, showed no effect on the bioactivity. Concerning the EDUF configuration 2 only the initial fraction (A<sub>FFC</sub>) have demonstrated an enhancement (12%) of the glucose uptake in presence of insulin stimulation. The final fraction (A<sub>FFC2</sub>) showed no effect, and the recovered fraction, K<sub>CL+</sub>, concentrated in cationic peptides had significantly decreased the glucose uptake at 1 µg/mL in presence of insulin stimulation. Thus, these results suggested a potential synergistic effect between peptides which was canceled when peptides were separated into K<sub>CL+</sub> and A<sub>FFC2</sub> fractions.

Nevertheless, because bioactive peptides are generated by protein hydrolysis, they can represent only minor constituents in a highly complex matrix, and the bioactivity could be altered due to inhibition or interaction among peptides [197]. The use of subsequent separation steps are needed to enrich active peptide fractions from the hydrolysates [14]. For example, Roblet et al (2016) managed to generate bioactive anionic and cationic fractions, from a non-bioactive hydrolysate, depending on the pH used for the separation (3, 6 or 9). Nevertheless, at pH 6 (pH used in this study) they obtained a cationic fraction able to increase the glucose uptake, while our cationic fraction K<sub>CL+</sub> decreased it. These different results can be explained by the different UFM MWCO

used for the separation (20 kDa instead of 50 kDa in our study), generating fractions of different composition in terms of size and sequences.

In addition, it was demonstrated in our previous study, that the anionic peptides from a salmon by-product hydrolysate were responsible for the improvement of the glucose uptake in L6 muscle cells, while cationic peptides maybe inhibitors of this bioactivity [195]. Indeed, from our first simultaneous EDUF separation it was concluded that anionic peptide may be involved in the glucose uptake response as anionic peptides recovered in  $A_{RC1}$  (Anionic Recovered Compartment 1),  $A_{RC2}$  (Anionic Recovered Compartment 2) and  $A_{RC3}$  (Anionic Recovered Compartment 3) demonstrated a significant increase in the glucose uptake at both 1 ng/mL and 1  $\mu$ g/mL in basal condition. In the opposite way,  $C_{\text{cationic Recovered Compartment 3}}$  ( $C_{RC3}$ ) from our previous study had decreased the bioactivity [195].

In addition to peptides, cationic free amino acids could have reached the  $K_{CL+}$  and also decreased the bioactivity. It was previously demonstrated that cationic free amino acids, generated by the enzymatic hydrolysis of various marine by-products, as for example snow crab by-products [155] or herring milt [154] could be concentrated in recovery compartments. Moreover, some of these cationic amino acids, such as histidine, cysteine and tyrosine have been identified as inhibitors of the glucose uptake in presence of insulin stimulation [71]. Authors concluded that these amino acids may potentiate the activation of the mTOR/p70S6k pathway, that negatively modulates the ability of insulin to transmit signals to PI 3- kinase via IRS-1 and leading to an insulin resistance [71].



*Figure 4-2 Glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells with or without insulin stimulation by a) the recovery compartments from EDUF configuration 1 and b) the recovery compartments from EDUF configuration 2. Data represent mean  $\pm$  SEM, n = 9. An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value.*

#### 4.5.2. Effect of EDUF Fractions on Hepatic Glucose Production

The capacity of the EDUF fractions to modulate the neoglucogenesis by decreasing the hepatic glucose production (HGP) in FAO cells were investigated and results are presented in Fig 4-3. Once more, no effect was observed concerning the USPH. Nevertheless, as presented in Fig 4-3a, KCL- fraction decreased the HGP in basal condition of 17 and 9% at 1 ng/mL and 1 μg/mL, respectively. These anionic peptides have also improved the insulin effect on the HGP by 35% at 1 ng/mL comparatively to the insulin control. Finally, both fractions recovered in the feed compartments (CFFC and CFFC2) were bioactive at both concentrations : CFFC decreased the HGP at the highest concentration tested (1 μg/mL) in basal (11%) and insulin (14%) conditions, whereas CFFC2 decreased HGP at the lowest concentration tested (1 ng/mL), also in basal (16%) and insulin (34%) conditions. Concerning the EDUF configuration n°2 (Fig. 4-3b), cationic peptides recovered in the KCL+ demonstrated the highest bioactivity in basal (28%) and insulin (36%) conditions at 1 ng/mL, comparatively to control conditions. Moreover, A<sub>FFC</sub> also demonstrated a decrease in HGP (17 and 25%) at 1 ng/mL (without and with insulin stimulation, respectively). Finally, A<sub>FFC2</sub> decreased the HGP by 25% at 1 ng/mL comparatively to the insulin control. For the first time, EDUF fractions demonstrated the capacity to decrease the HGP in *in vitro* models. Indeed, the use of subsequent separation steps increased the concentration of bioactive peptides in fractions and generate bioactive fractions. Interestingly, both fractions of recovery

compartments,  $K_{CL^-}$  and  $K_{CL^+}$ , have shown the highest inhibition of the HGP comparatively to fractions from the feed compartment ( $C_{FFC}$  and  $C_{FFC2}$ ;  $A_{FFC}$  and  $A_{FFC2}$ , respectively). Thus, charged peptides able to cross the UFM were involved in the reduction of the hepatic glucose production. As the migration is not total, and as presented in table 1, peptides concentrated in the recovery compartments might still be present in the feed compartments, a single peptide or a group of peptides in common to all fractions could induce this HGP decrease.

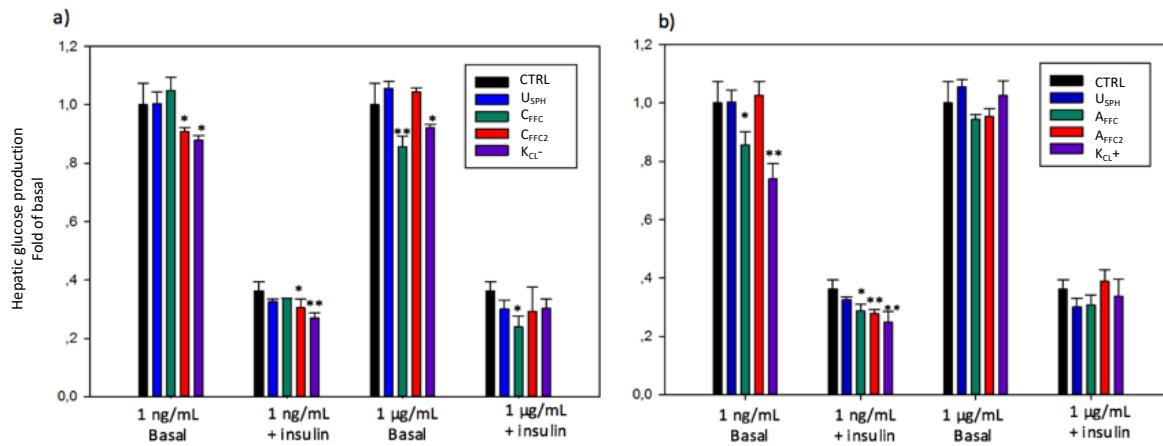
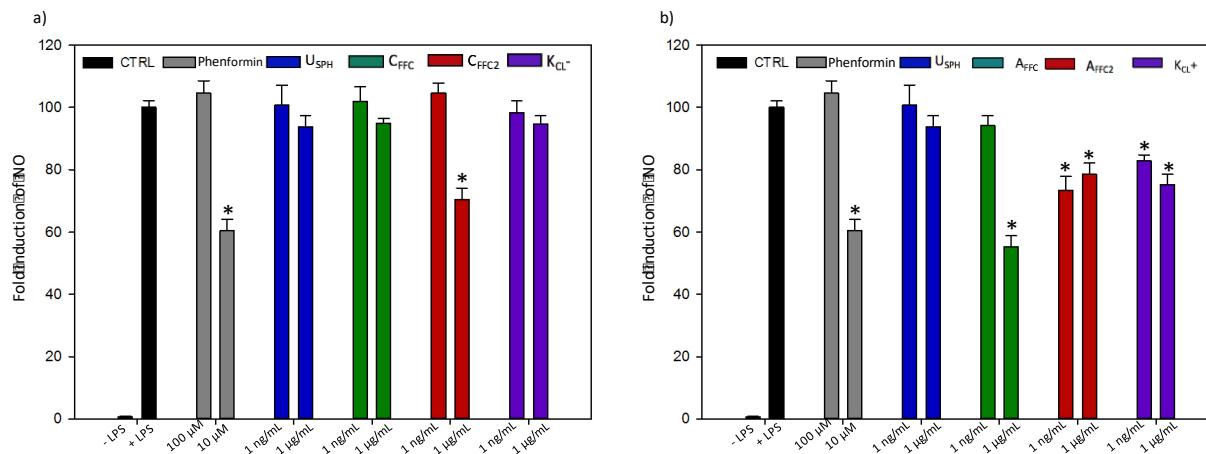


Figure 4-3. *In-vitro* hepatic production from FAO cells with or without insulin inhibition, by a) the recovery compartments from EDUF configuration 1 and b) the recovery compartments from EDUF configuration 2. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value

#### 4.5.3. Effect of EDUF fractions on inflammation.

*In-vitro* anti-inflammatory effects of EDUF fractions were investigated and results are presented in Fig. 4-4. All fractions were tested in the presence of LPS, to observe a possible reduction of the LPS-induced inflammatory effect. Moreover, Phenformin which is an antidiabetic drug used for the treatment of type 2 diabetes, was used to compare the effect of EDUF fractions. As for previous bioactivities tested, the USPH did not show any effects on the inflammation (Fig 4-4). However,  $C_{FFC2}$ , from EDUF configuration n°1 decreased LPS-induced iNOS activation in macrophages by 30% at 1  $\mu$ g/mL (Fig 4-4a). Nevertheless, its effect was lower than Phenformin at 10  $\mu$ M ( $P = 0.04$ ) which decreased the inflammation by 40%. Concerning configuration n°2 (Fig 4-4b),  $A_{FFC}$  decreased the inflammation at 1  $\mu$ g/mL, while  $A_{FFC2}$  (22 and 27%) and  $K_{CL^+}$  (25 and 18%) have demonstrated a very significant decrease in LPS-induced anti-inflammatory state for both concentration (1 ng/mL and 1  $\mu$ g/mL, respectively). More impressive,  $A_{FFC}$  (45% of reduction)

showed the same effect as the Phenformin at 10  $\mu$ M (40%) ( $P = 0.558$ ). These results allowed to conclude on the positive effect of cationic peptides on NO induction. The removal of some cationic peptides from the initial feed ( $A_{FFC}$ ) decreased the anti-inflammatory effect. Indeed, a decrease of the inflammation was observed in  $A_{FFC2}$  comparatively to  $A_{FFC}$ . However, as the experiments were carried out at the same concentrations (1 ng and 1  $\mu$ g/mL of peptides), the relative concentration of cationic peptides in  $K_{CL+}$  was higher compared to  $A_{FFC}$  and  $A_{FFC2}$ . Nevertheless, as previously explained,  $A_{FFC}$  had a better activity than the  $K_{CL+}$ . So, a synergistic effect might exist between cationic peptides and other peptides in  $A_{FFC}$ , resulting in a stronger anti-inflammatory effect than they the one obtained for the isolated  $K_{CL+}$  fraction.



**Figure 4-4. Inflammatory activity on J774 macrophages in absence or presence of LPS stimulation by a) the recovery compartments from EDUF configuration 1 and b) the recovery compartments from EDUF configuration 2. Data represent mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's (+LPS) mean value**

#### 4.5.4. Evolution of Peptide Profile During the EDUF Separation and identification of potential bioactive peptides.

Figure 4-5 represents the UV spectra of the EDUF fractions after 4h of EDUF separation. The chromatograms of  $A_{FFC}$ ,  $A_{FFC2}$  and  $K_{CL+}$  were presented in fig 4-5a and separated in two parts (parts I and II) while the chromatograms of  $C_{FFC}$ ,  $C_{FFC2}$  and  $K_{CL-}$  were presented in fig 4-5b and separated in three parts (parts I, II and III). In table 4-1, all the peaks which demonstrated a significant increase or decrease in their area under the curve for the final solutions ( $C_{FFC2}$  and  $K_{CL-}$  or  $A_{FFC2}$  and  $K_{CL+}$ ) in comparison with their respective initial solution ( $C_{FFC}$  or  $A_{FFC}$ , respectively)

were listed. Moreover, MS analysis allowed the identification of the composition of each peak, and the MW of each compound was indexed in table 4-1.

After separation by configuration n°1 (Fig 4-5a), no significant differences were observed between C<sub>FFC</sub> and C<sub>FFC2</sub>. Nevertheless, significant differences ( $P < 0.05$ ) in the absorbance were observed between K<sub>CL-</sub> and both C<sub>FFC</sub> and C<sub>FFC2</sub>. Indeed, on fifteen peaks listed in table 4-1, nine have demonstrated an increase of their absorbance in K<sub>CL-</sub> (peak 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 and 13), while six have shown a decrease (peaks 6, 8, 10, 12, 14 and 15), comparatively to C<sub>FFC</sub> and C<sub>FFC2</sub>. Concerning configuration n°2, significant differences were observed after EDUF separation, between initial and final solutions. Indeed, as listed in table 4-1, most of the peaks (9 peaks) decreased in the A<sub>FFC2</sub> and the K<sub>CL+</sub> comparatively to the A<sub>FFC</sub>, and only two peaks (peaks 5 and 6) demonstrated a significant abundance increased in the K<sub>CL+</sub> comparatively to the A<sub>FFC</sub>.

The differences in abundance observed between both compartments (feed and recovery compartments) were principally due to the selectivity of the EDUF process. These results were in accordance with Doyen *et al.* (2014), who demonstrated the selectivity of the EDUF process for the separation of flaxseed protein hydrolysate. Authors demonstrated significant differences in terms of abundances and total peaks between the feed and recovery compartments after 360 minutes of EDUF separation. Moreover, as presented in table 4-1, a number of compounds were not able to cross the ultrafiltration membrane (those marked with one asterisk), while, some compounds were concentrated in the recovery compartments (those marked with two asterisks). Indeed, for configuration n°1, forty compounds (listed in table 4-1) were detected only in K<sub>CL-</sub>, while twenty-one compounds were not able to cross the UF membrane and were found only in the feed compartment (C<sub>FFC</sub> and C<sub>FFC2</sub>). Concerning the EDUF configuration n°2, according to the MS results (table 4-1) three compounds were recovered in peak 5 and thirteen in peak 6, among which two compounds (743.36 and 724.36 Da) were observed only in K<sub>CL+</sub>. For peak 5, three compounds were identified (598.37, 587.32 and 491.24 Da) and were present in all three fractions (A<sub>FFC</sub>; A<sub>FFC2</sub>; K<sub>CL+</sub>). Nevertheless, one compound (587.32 Da) was found only in the feed compartment (in both A<sub>FFC</sub> and A<sub>FFC2</sub> fractions). Therefore, the increase in peak 5 area for K<sub>CL+</sub> was due to the concentration by EDUF of compounds having molecular mass of 598.37 and/or 491.24 Da.

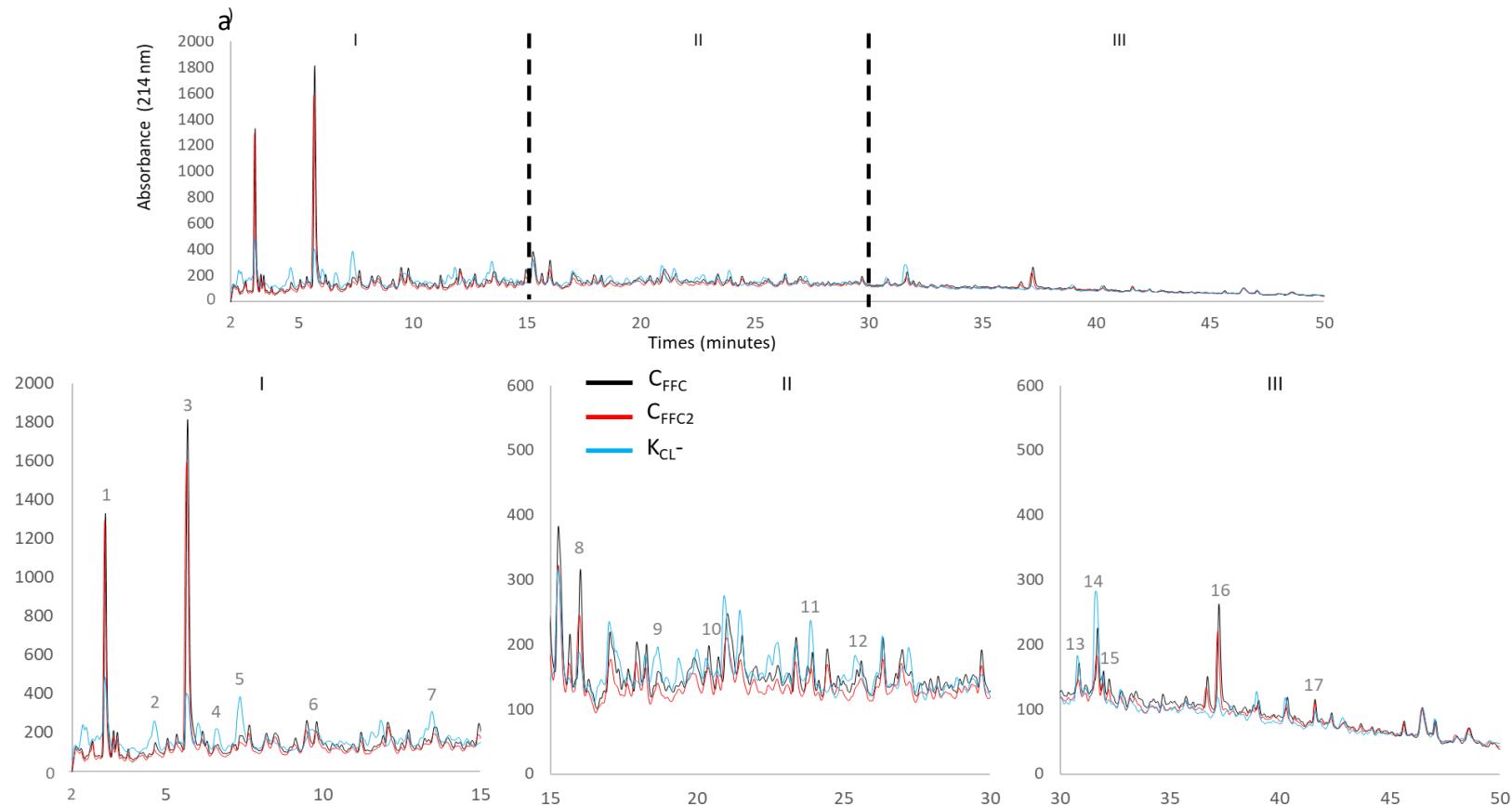


Figure 4-5.a Overlaid RP-HPLC profiles of the three EDUF fractions separated by EDUF configuration I and a zoom in retention time between (I) 2 and 15 minutes, (II) 15 and 30 minutes, (III) 30 and 50 minutes.

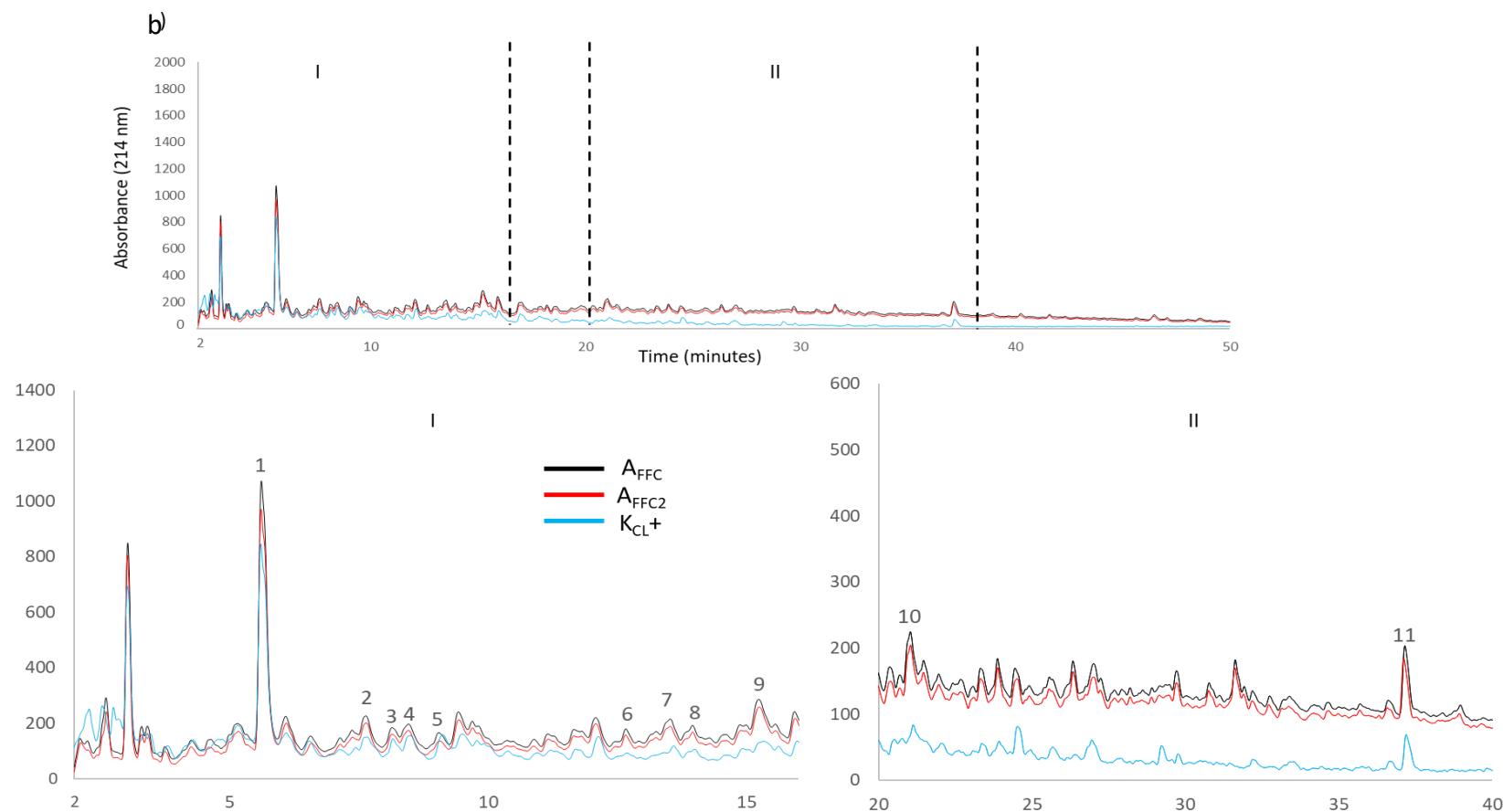


Figure 4-6.b Overlaid RP-HPLC profiles of the three EDUF fractions separated by EDUF configuration 2, and a zoom in retention time between (I) 2 and 14 minutes (II) 20 and 40 minutes.

Tableau 4-1 RP-HPLC and MS results for peaks presenting significant differences after EDUF separation in samples of recovery and initial compartments

Pea-k	Compart-ment	EDUF configuration 1			Peak	EDUF configuration 2		
		Liquid chromatography		Mass Spectrometry		Liquid chromatography		Mass spectrome-try
		Reten-tion time (min)	Peak area	MW (Da)		Reten-tion time (min)	Peak area	MW (Da)
1	C <sub>FFC</sub>	3.05	6715.9 ±323.0 <sup>a</sup>	444.22,	1	5.62	10788.2 ±488.9 <sup>a</sup>	856.45**, 780.45**, 553.26,
	C <sub>FFC2</sub>		6753.1 ±152.7 <sup>a</sup>	418.21**, 411.16**, 377.16, 346.18*, 331.17, 279.12**, 252.11, 165.07, 119.07, 102.04		A <sub>FFC2</sub>	9594.1 ± 161.7 <sup>b</sup>	398.22, 389.18*, 388.19*, 275.12,
	K <sub>CL-</sub>		2500.8 ± 914.5 <sup>b</sup>			K <sub>CL+</sub>	8787.0 ± 507.9 <sup>b</sup>	262.13, 204.09, 187.06
2	C <sub>FFC</sub>	4.64	563.3 ±113.1 <sup>a</sup>	662.35**, 658.37*, 630.37,	2	7.64	1660.3 ±204.2 <sup>a</sup>	672.42**, 631.35,
	C <sub>FFC2</sub>		480.1 ±83.8 <sup>a</sup>	151.26**, 462.19**, 409.13**, 374.17**, 370.19*, 359.20, 347.17, 331.17, 276.11		A <sub>FFC2</sub>	987.1 ± 301.9 <sup>b</sup>	608.36, 547.24*
	K <sub>CL-</sub>		1594.1 ± 5.97 <sup>b</sup>			K <sub>CL+</sub>	960.4 ± 135.7 <sup>b</sup>	429.25, 395.17*, 386.25, 377.19*, 365.15*, 315.21
3	C <sub>FFC</sub>	5.67	12804 ± 110.6 <sup>a</sup>	630.33, 389.18, 275.12*, 261.11*, 204.09*, 187.06	3	8.14	926.6 ±168.2 <sup>a</sup>	940.44, 513.36**, 406.26**, 331.21,
	C <sub>FFC2</sub>		12915.5 ±57.2 <sup>a</sup>			A <sub>FFC2</sub>	489.8 ± 145.3 <sup>b</sup>	317.19, 301.20, 170.10, 142.11
	K <sub>CL-</sub>		2151.9 ± 150.0 <sup>b</sup>			K <sub>CL+</sub>	704.7 ±16.1 <sup>a,b</sup>	
4	C <sub>FFC</sub>	6.62	544.5 ±195.0 <sup>a</sup>	746.44**, 519.19, 469.32*,	4	8.46	1290.4 ±183.4 <sup>a</sup>	940.44, 817.43,
	C <sub>FFC2</sub>		426.0 ±147.1 <sup>a</sup>			A <sub>FFC2</sub>	792.5 ± 201.1 <sup>b</sup>	741.45**

	K <sub>CL-</sub>		977.56 ± 24.6 <sup>b</sup>	462.19**, 416.22, 409.18**, 377.16**, 374.22, 351.14		K <sub>CL+</sub>		1041.9 ± 173.5 <sup>a,b</sup>	699.39*, 671.33, 586.33**, 363.18, 333.17, 287.18, 244.17, 184.12, 156.09, 149.05
5	C <sub>FFC</sub>	7.35	919.2 ± 384.7 <sup>a</sup>	790.33**, 631.35*, 547.25,	5	A <sub>FFC</sub>	9.05	627.9 ± 197.2 <sup>a</sup>	598.37, 587.32*, 491.24
	C <sub>FFC2</sub>		885.8 ± 102.1 <sup>a</sup>	460.25**, 396.17, 377.16, 365.15, 347.14**, 333.13**, 315.12		A <sub>FFC2</sub>		322.5 ± 95.8 <sup>a</sup>	
	K <sub>CL-</sub>		2415.3 ± 592.6 <sup>b</sup>	416.22, 381.19*, 349.16*, 344.20*		K <sub>CL+</sub>		1170.4 ± 137.6 <sup>b</sup>	
6	C <sub>FFC</sub>	9.78	1533.8 ± 114.7 <sup>a</sup>	510.23**, 417.23**, 416.22, 381.19*, 349.16*, 344.20*	6	A <sub>FFC</sub>	12.66	529.3 ± 90.2 <sup>a</sup>	743.36**, 724.36**, 701.41, 491.24, 487.30, 414.24, 374.21, 361.20, 359.18, 345.19*, 335.18, 329.23, 198.13
	C <sub>FFC2</sub>		1579.7 ± 138.5 <sup>a</sup>			A <sub>FFC2</sub>		340.3 ± 42.7 <sup>b</sup>	
	K <sub>CL-</sub>		525.1 ± 254.6 <sup>b</sup>			K <sub>CL+</sub>		838.2 ± 58.8 <sup>c</sup>	
7	C <sub>FFC</sub>	11.89	528.3 ± 116.5 <sup>a</sup>	912.46**, 676.28**, 605.24**, 493.25*, 444.22, 416.22**, 407.2**, 391.17**, 359.20, 345.19	7	A <sub>FFC</sub>	13.53	1405.0 ± 139.9 <sup>a</sup>	1085.62, 956.55**, 758.33* 393.19, 345.22
	C <sub>FFC2</sub>		559.8 ± 275.1 <sup>a</sup>			A <sub>FFC2</sub>		954.3 ± 231.0 <sup>b</sup>	
	K <sub>CL-</sub>		1378.8 ± 546.2 <sup>b</sup>			K <sub>CL+</sub>		394.3 ± 61.9 <sup>c</sup>	
8	C <sub>FFC</sub>	16.01	1712.9 ± 435.6 <sup>a</sup>	991.49**, 982.53**, 805.41*, 645.27**, 483.3*, 416.22, 386.25*, 315.21	8	A <sub>FFC</sub>	13.96	891.2 ± 101.7 <sup>a</sup>	402.24, 315.21, 184.12
	C <sub>FFC2</sub>		1409.5 ± 201.4 <sup>a</sup>			A <sub>FFC2</sub>		547.3 ± 176.9 <sup>a,b</sup>	
	K <sub>CL-</sub>		636.12 ± 152.2 <sup>b</sup>			K <sub>CL+</sub>		491.2 ± 137.01 <sup>b</sup>	

9	C <sub>FFC</sub>	18.41	300.3 ±36.1 <sup>a</sup>	869.48,	9	A <sub>FFC</sub>	15.23	2771.1 ±207.6 <sup>a</sup>	991.50*,
	C <sub>FFC2</sub>		239.7 ±40.57 <sup>a</sup>	676.34**,		A <sub>FFC2</sub>		1902.8 ± 702.7 <sup>a,b</sup>	599.31**,
	K <sub>CL-</sub>		873.2 ± 158.53 <sup>b</sup>	531.29**, 502.24, 490.24**, 470.27**, 414.28*, 373.22, 312.14		K <sub>CL+</sub>		1097.3 ± 476.7 <sup>b</sup>	430.24*, 384.23, 358.22*, 345.22, 317.17*, 228.14
10	C <sub>FFC</sub>	19.88	812.5 ±112.5 <sup>a</sup>	586.33,	10	A <sub>FFC</sub>	21.03	1739.2 ±220.2 <sup>a</sup>	1347.67*, 928.56,
	C <sub>FFC2</sub>		661.2 ±109.8 <sup>a,b</sup>	473.24**,		A <sub>FFC2</sub>		1477.9 ±118.9 <sup>a</sup>	809.53**,
	K <sub>CL-</sub>		328.8 ± 179.9 <sup>b</sup>	407.21**, 393.19, 349.21, 343.24, 335.18		K <sub>CL+</sub>		929.8 ± 191.0 <sup>b</sup>	714.37*, 407.2, 374.19**
11	C <sub>FFC</sub>	23.91	359.4 ±37.9 <sup>a</sup>	867.50*, 592.28,	11	A <sub>FFC</sub>	37.14	1460.3 ±83.3 <sup>a</sup>	588.27
	C <sub>FFC2</sub>		677.7 ±44.1 <sup>a,b</sup>	436.23**,		A <sub>FFC2</sub>		1226.4 ± 90.9 <sup>b</sup>	
	K <sub>CL-</sub>		1221.7 ± 403.2 <sup>b</sup>	431.27**		K <sub>CL+</sub>		754.8 ±38.5 <sup>c</sup>	
12	C <sub>FFC</sub>	25.59	356.7 ±130.6 <sup>a,b</sup>	836.42**, 625.1 ±141.4 <sup>a</sup>					
	C <sub>FFC2</sub>			829.39**, 230.55 ± 65.7 <sup>b</sup>					
	K <sub>CL-</sub>			656.37**, 623.31, 357.26*					
13	C <sub>FFC</sub>	31.67	968.3 ±71.4 <sup>a</sup>	947.46, 602.30,					
	C <sub>FFC2</sub>			847.4 ±174.4 <sup>a</sup>					
	K <sub>CL-</sub>			2767.8 ± 95.9 <sup>b</sup>					
14	C <sub>FFC</sub>	37.19	1508.6 ±108.8 <sup>a</sup>	672.35**, 1321.9 ±56.3 <sup>a</sup>					
	C <sub>FFC2</sub>			662.35**, 344.67 ± 65.5 <sup>b</sup>					
	K <sub>CL-</sub>			588.27*					
15	C <sub>FFC</sub>	40.31	313.4 ±50.9 <sup>a</sup>	738.34, 372.08,					
	C <sub>FFC2</sub>			263.1 ±36.2 <sup>a</sup>					
	K <sub>CL-</sub>			356.10, 351.15 524.7 ± 26.1 <sup>b</sup>					

Results presented in sections 5.5.1, 5.5.2 and 5.5.3 suggested that anionic peptides have gluco-regulatory effects by enhancing the glucose uptake in L6 muscle cells and decreasing the glucose production in hepatic cells, while cationic peptides decreased the inflammation in activated macrophages. In order to identify potential bioactive peptides, both fractions were characterized by MS/MS analysis coupled with a database for identification. Results indexed in table 4-2 are the compounds found as common to all bioactive and anionic fractions, from this and our previous study (A<sub>FFC</sub>; A<sub>RC1</sub>; A<sub>RC2</sub>; A<sub>RC3</sub> and K<sub>CL-</sub> ). Fifty-three compounds have been found in common to all these fractions, and for now, twenty-four potential sequences have been identified by comparison with a Salmonidae database downloaded from NCBI [198].

To our best knowledge, this is the first time that potential sequences involved in the improvement of the glucose uptake and/or in the regulation of the hepatic glucose production have been identified from salmon by-products. Nevertheless, these sequences have to be synthetized and tested in *in vitro* models to confirm their bioactivity.

*Tableau 4-2 Characterization and sequences of potential gluco-regulatory peptides*

Molecular weight (Avg) (Da)	Retention time (Avg) (min)	Potential se- quence	Net charge at pH 6.00	pI
4.755	276.1112			
5.532	315.2056			
6.854	373.2208			
7.532	365.1587			
7.545	395.1688			
7.853	357.1898			
9.781	430.2421	IIGE	-	4
9.814	211.1112			
9.869	416.2268	VALD	-	3.80
10.174	456.2581	IPVE	-	4.60
11.862	345.1899	VDL	-	3.80
13.639	393.19			

14.514	377.1605			
14.751	501.2784			
14.81	391.1772			
14.996	531.2898	IEGTL	-	4.00
15.253	409.1846			
15.271	503.258			
15.448	522.2673	IVEY	-	4.00
15.464	539.2046			
15.663	472.2887			
15.671	430.2419			
15.767	502.2629			
15.796	991.497	VAPEEHPTL	-	4.50
16.54	444.2582			
17.27	531.289	IEGTL	-	4.00
17.587	359.2054			
18.7	869.4857	LLTEAPLN LVEPAAGTI	- -	3.99
19.02	502.2634			
19.377	650.3259			
19.78	407.2057			
20.05	593.2770	IGEFF	-	3.79
20.324	473.2463			
20.583	586.3313	IVGEVA	-	4.00
20.585	545.3046			
20.774	625.2585	IDTDY	-	3.56
20.906	515.2941	IEVGV IEGVV	-	4.00
21.397	407.2056			
21.423	359.205			
22.342	458.2738	IVDI	-	3.80
23.055	494.2373			

23.093	542.2366			
23.68	470.2731			
23.831	478.2423			
24.083	592.2848	LAADGF	-	3.80
24.588	829.3972	LAFDHDL	-	4.19
		LATNQHF	+	6.74
25.851	623.316	ITDYL	-	3.80
27.307	521.2483	IDAGF	-	3.79
28.554	569.3413			
29.454	660.3504	ILLGMD	-	4.30
32.102	602.3058	IGEVW	-	4.00
39.385	611.2951			
40.044	738.3424	LDTDYL	-	3.56

## Conclusion

EDUF allowed the generation of specific fractions concentrated in BPs from a low bioactive or a non-bioactive hydrolysate. To the best of our knowledge, it was the first time that bioactive peptide fractions generated after separation by EDUF were demonstrated bioactive on three different bioactivities, all involved in the T2D. Two fractions were particularly promising: A<sub>FFC</sub> and C<sub>FFC2</sub>. Indeed, both fractions were able to 1) increase the glucose uptake in L6 muscle cells in insulin condition at 1 ng/mL (12 and 21%, respectively), 2) decrease the hepatic glucose production in hepatic cells at 1 ng/mL in basal (17 and 16%, respectively) and insulin (25 and 34%, respectively) conditions and 3) decrease the LPS-induced inflammation in macrophages at 1 µg/mL (45 and 30%, respectively). Moreover, A<sub>FFC</sub>, have shown an impressive capacity to decrease the inflammation with a decrease of the inflammation more important than the phenformin which is a drug usually used to treat T2D. Furthermore, it appeared also from these results that anionic peptides may play a major role in the glucose regulation and insulin sensitivity, both largely reported as risk factors of the T2D. Indeed, anionic peptides concentrated in the KCl<sup>-</sup> were able to increase the glucose uptake and to decrease the HGP, while cationic peptides concentrated in KCl<sup>+</sup> and presents

in both AFFC and AFFC2 have shown good anti-inflammatories properties. Nevertheless, it is more probable that these bioactivities are the result of a synergistic effect among peptides than the effect of just one peptide. Moreover, by coupling MS/MS analysis and EDUF selectivity, 24 sequences were identified with potential glucoregulatory effects.

#### **4.6. Acknowledgments**

The authors are thankful to Bruno Marcotte for his technical assistance and, Cooke Aquaculture for providing the salmon frames. This work was also supported by the “Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada” (CRSNG), the Consortium de Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels au Québec (CRIBIQ), the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). Authors would also thanks Mitacs for their financial supports by a Cluster grant program: Salmon peptides identification and purification and their insulin modulation. Special gratitude goes to Jean-Philippe Songpadith and Karina Danielle Pereira for the hepatic glucose production and anti-inflammatory experiments.

# **Chapitre 5**

**Identification of four novel  
glucoregulatory peptides, from salmon  
by-product hydrolysate**

## **5. Identification of four novel glucoregulatory peptides, from salmon by-product hydrolysate.**

Les auteurs sont : Loïc Henaux (candidat au doctorat, planification et réalisation des expériences, analyses des résultats et rédaction de l'article), Jacinthe Thibodeau (professionnelle de recherche, supervision de l'étudiant pour les analyses LC-MS), Geneviève Pilon (Supervision de l'étudiant pour les études *in vitro*, correction et révision du manuscrit) Tom Gill (collaborateur scientifique du projet, correction et révision du manuscrit), André Marette (Supervision de l'étudiant pour les études *in vitro*, co-directeur de thèse, correction et révision du manuscrit) et Laurent Bazinet (directeur de thèse, supervision scientifique de l'étudiant, correction et révision du manuscrit).

La soumission de cet article est en attente d'une décision concernant la prise d'un brevet.

## **Transition contextuelle**

Lors du précédent chapitre, un deuxième fractionnement par EDUF, d'un hydrolysat de coproduits de saumon a permis de générer deux fractions ( $A_{FFC}$  et  $C_{FFC2}$ ) présentant trois effets bioactifs contre le diabète de type 2. En effet, ces fractions ont démontré leurs capacités d'augmenter l'absorption du glucose, de diminuer la production du glucose hépatique, ainsi que l'inflammation. De plus, la caractérisation de ces fractions bioactives par LC-MS/MS et l'utilisation de base de données spécialisées a permis l'identification de 24 séquences peptidiques potentiellement à l'origine de ces bioactivités. Cependant il est important de valider leur bioactivités individuellement.

Les objectifs de cette présente étude, étaient de 1) identifier les séquences ayant obtenues les scores de concordance les plus élevés, et de confirmer ces séquences par l'analyse de leurs spectres de fragmentation (spectres MS/MS). Puis, de 2) tester individuellement ces séquences synthétisées chimiquement, pour les trois bioactivités étudiées précédemment, à savoir l'absorption du glucose par les cellules musculaires, la production de glucose hépatique et l'inflammation.

## **5.1. Résumé**

La production de peptides bioactifs à partir de sources naturelles, devient une alternative de plus en plus sérieuse aux médicaments dans le traitement des maladies chroniques, comme le diabète de type 2. En effet, les peptides bioactifs possèdent de nombreux avantages, par rapport aux médicaments de synthèse, comme une faible toxicité, une faible accumulation dans le corps. Ainsi, quatre nouveaux peptides bioactifs ont été identifiés à partir de l'hydrolyse enzymatique et la séparation par EDUF d'un hydrolysat de coproduits de saumon. Le peptide IPVE a démontré la capacité, dans un premier temps, à augmenter l'absorption du glucose par des cellules musculaires à une concentration de 1 ng/mL. Ces effets ont par la suite été confirmés par une étude de l'effet-dose réponse. En effet, les résultats ont montré que IPVE pouvait stimuler l'absorption du glucose à une concentration de 1 ng/mL, mais aussi à une concentration de 10 ng/mL. Trois autres peptides ont démontré leur effet glucorégulateur, en diminuant la production du glucose par les cellules hépatiques (HGP). Les peptides IVDI et IEGTL ont diminué la HGP en présence d'insuline, alors que VAPEEHPTL a diminué la HGP en condition basale et présence d'insuline.

## **5.2. Abstract**

The production of bioactive peptides from natural sources is becoming an increasingly serious alternative to drugs in the treatment of chronic diseases, such as type 2 diabetes. Indeed, bioactive peptides have many advantages over synthetic drugs, such as low toxicity, low accumulation in the body. Thus, four new bioactive peptides were identified from enzymatic hydrolysis and the separation by EDUF of a salmon co-product hydrolyzate. IPVE, demonstrated the ability, at first, to increase glucose uptake by muscle cells at a concentration of 1 ng / mL. These effects were subsequently confirmed by a dose-response study. Indeed, the results showed that IPVE could stimulate glucose uptake at a concentration of 1 ng / mL, but also at a concentration of 10 ng / mL. Three other peptides demonstrated their glucoregulatory effect, by decreasing the hepatic glucose production (HGP). IVDI and IEGTL decreased the HGP in the presence of insulin, whereas VAPEEHPTL, decreased the HGP under basal conditions and presence of insulin.

### **5.3. Introduction**

Bioactive peptides (BPs) are abundant and easily obtainable from food proteins where they are present in an inactive form. BPs have been isolated from various food by-products, such as slaughterhouse by-products [199], meat [200] and marine [201] food processing by-product, milk-derived by-products [202] and food plant by-products [10]. Once released by enzymatic hydrolysis or microbial fermentation, they can exert their health benefits and may therefore serve therapeutics roles. While concerns about the use of synthetic drugs and their side effects are constantly increasing, BPs from natural sources may represent an interesting alternative for the treatment of non-communicable diseases, such as the DT2. Comparatively to drugs, BPs present a lot of advantages such as high bioactivity and biospecificity to targets, various therapeutic action and molecular mechanisms, low levels of toxicity, structural diversity and their short half-life ensures that they have a low level of accumulation in body tissues [126].

Recently, BPs generated by the subsequent action of pepsin and trypsin/chymotrypsin on salmon proteins by-products have demonstrated, in both *in vitro* and *in vivo* studies, various glucoregulatory and inflammatory properties [4,13,113]. In addition, as presented in chapter 5, subsequent fractionation of this hydrolyzate by electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) allowed the generation of bioactive fractions demonstrating *in vitro* a triple effect against the TD2, such as an enhancement of the glucose uptake, a decrease of the HGP and a decreased of the inflammation. Moreover, tandem mass spectrometry analyses of the bioassay-guided fractions allowed the identification of 24 peptide sequences that may represent novel anti-diabetic peptides.

The aim of this study was 1) to confirm the sequences identified in chapter 5, and to choose the most promising sequences. Then, to confirm their bioactivity, 2) peptides were chemically synthetized and tested individually for their capacity to increase the glucose uptake, to decrease the HGP and to decrease the inflammation

## 5.4. Material and methods

### 5.4.1.1. RP-UPLC and mass spectrometry analyses

The RP-UPLC analyses were done according to the previous study of Durand et al., (2018) [154]. Briefly, a 1290 Infinity II UPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used to separate samples before entering the mass spectrometer. The EDUF fractions were diluted to 0.5 mg/mL, then filtered through 0.22 $\mu$ m PVDF filter into a glass vial. Five microlitres of each sample was loaded onto an Acquity UPLC CSH 130 1.7 $\mu$ m C18 column (2.1 mm i.d. $\times$ 150 mm, Waters Corporation, Milford, MA, USA) at a flow rate of 400 $\mu$ L/min and a temperature of 45°C. A linear gradient from 2% to 25% over 50 minutes, and ramping to 90% until 57 minutes was used. The gradient consisted of a solvent A, which was LC-MS grade water with 0.1% formic acid, and a solvent B, which was LC-MS grade ACN with 0.1% formic acid. Each sample was run in triplicate for statistical evaluation of technical reproducibility.

A hybrid ion mobility quadrupole TOF mass spectrometer (6560 high definition mass spectrometry (IM-Q-TOF), Agilent, Santa Clara, USA) was used to identify the composition of each EDUF fractions. All LC-MS/MS experiments were acquired using Q-TOF. Signals were recorded in positive mode of Extended Dynamic Range, 2 GHz, 3200 m/z with a scan range between 100–2000m/z. Nitrogen was used as the drying gas at 13.0 L/min and 150°C, and as nebulizer gas at 30 psig. The capillary voltage was set at 3500 V, the nozzle voltage at 300 V and the fragmentor at 400 V. Data analysis were done using the Agilent Mass Hunter Software package (LC/MS Data Acquisition, Version B.07.00 and Qualitative Analysis for IM-MS, Version B.07.00 with BioConfirm Software). Additional search was done using the Spectrum Mill MS Proteomics Workbench Rev B.05.00.180. The Salmonidae protein database was used to search and identified potential peptides.

### 5.4.2. Peptide Synthesis

Peptide synthesis and purification were performed by the *Laboratoire de chimie peptidique et biomoléculaire du CHU de Québec* (Québec, QC, Canada). Peptides were synthesized by standard Fmoc solid-phase synthesis using 1-Cl- Trt resin [203,204]. Briefly, the Fmoc protecting group was removed from the resin by two 10 min treatments with 20% piperidine

in dimethylformamide (DMF, v/v) and amino acid coupling was performed with Fmoc- Xaa-OH (3 equivalents), 1-(6-Chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU, 3 equivalents) and N-methylmorpholine (12 equivalents) in dimethylformamide (DMF, 2 × 30 min). The synthesized peptides were released by treating the resin with 20% hexafluoro-1-propanol (HFIP) in dichloromethane (DCM) for 30 min [205]. Side chain deprotection was achieved by treating the peptides with TFA/Triisopropylsilane (TIPS)/H<sub>2</sub>O (95:2.5:2.5, v/v/v) for 3 h. Then peptides were precipitated with cold ether and purified by RP-HPLC with a Shimadzu Prominence instrument (Columbia, MD, USA) on a Vydac 218 MS column (22.0 × 250 mm, 300 Å, 10 µm, C18) using 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O (solvent A) and 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN (solvent B) with a linear gradient of 10–100% solvent B for 20 min at 10 mL/min and UV detection at 220 nm and 254 nm. After freeze-drying, the purified peptides were characterized by a hybrid ion mobility quadrupole TOF mass spectrometer (6560 high definition mass spectrometry (IM-Q-TOF), Agilent, Santa Clara, USA).

#### **5.4.3. *In vitro* experiments**

##### **5.4.3.1. Glucose uptake experiments**

Glucose uptake experiments were conducted as previously described by Roblet et al (2013) [6]. L6 skeletal muscle cells were grown in an α-minimum essential medium (α-MEM) containing 2% (v/v) fetal bovine serum (GBS) in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C [71]. Cells were plated at 600,000 cells/plate in 24-well plates to obtain about 25,000 cells/mL. The cells were incubated 7 days, to reach their complete differentiation to myotubes (7 days post-plating). L6 myotubes were deprived of GBS for 3h, with a α-MEM containing 0% of GBS. Then, the cells were incubated for 75 minutes with 10 µl of the peptide fractions at a concentration of 1 ng/mL. Finally, insulin was added (10 µl at 1.10<sup>-5</sup>M) for 45 min. Experiments were repeated 9 times, and each repetition was run in triplicate. After experimental treatments, cells were rinsed once with 37 °C HEPES-buffered solution (20 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and 1 mM CaCl<sub>2</sub>) and were subsequently incubated in HEPES-buffered solution containing 10 µM 2-deoxyglucose and 0.3 µCi/mL 2-deoxy-[<sup>3</sup>H] glucose for 8 minutes. Then, the cells were rinsed three times with 0.9% NaCl solution at 4°C and then frozen. The next day, the cells were disrupted by

adding 500 µl of a 50 mM NaOH solution. The radioactivity was determined by scintillation counting. Protein concentrations were determined by the BCA method, and results of glucose uptake were expressed in pmol/min.mg of protein.

Results shown are the mean response of at least 9 independent experiments realized in triplicate.

#### **5.4.3.2. Hepatic Glucose Production Experiments**

Hepatic glucose production experiments were conducted as described by Chevrier *et al*, (2015). Briefly, FAO rat hepatocytes were grown and maintained in monolayer culture in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) containing 10% FBS in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were plated at 4.10<sup>6</sup> cells/plate. Then, cells were deprived with 1 mL/well of RPMI without FBS, and the peptides were added at 10 µl/well at a concentration of 1 ng/mL, with or without insulin at 0.1 nmol. Cells were washed three times with PBS, then incubated for 5h in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C with the peptides in the presence or absence of insulin at 0.1 nmol in a hepatic glucose production medium (glucose-free DMEM containing sodium bicarbonate at 3.7 g/L, 2 mmol sodium pyruvate, and 20 mmol sodium L-lactate. Glucose production was measured in the medium by using the Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay kit (Invitrogen). Results shown are the mean response of at least 6 independent experiments realized in triplicate.

#### **5.4.3.3. Anti-inflammatory Experiments**

Anti-inflammatory experiments were conducted as described by Chevrier *et al*, (2015). Briefly, J774 mouse macrophages were grown and maintained in monolayer culture in DMEM high-glucose (25 mmol) medium supplemented with 10% FBS, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cells were plated at 4.10<sup>6</sup> cells/plate for 24h before the experiment, macrophages were stimulated with 2.5 ng/mL of lipopolysaccharide (LPS) in the presence of peptides overnight at a concentration of 1 ng/mL, and the accumulation of nitrite (NO) was used as an index of inducible NO synthase (iNOS) activity. NO was measured by using the Griess method. Then, cells were lysed in 50 mmol NaOH, and protein content was

determined by using BCA protein Assay kit. Results shown are the mean response of at least 6 independent experiments performed in triplicate.

## 5.5. Results

### 5.5.1. Identification and synthesis of potential bioactive peptides

As previously described (see chapter 5) anionic fractions were subjected to RP-UHPLC-Q-tof analysis. A total of 24 peptides were identified based on the MS/MS data.

However, 13 peptides were chosen based on their scores obtained by comparison of their experimental MS/MS spectrum (Fig. 5-1a) and their theoretical MS/MS spectrum (Fig 5-1b). Amino acids were identified based on mass differences of consecutive fragmentation and peptide sequences were deduced accordingly. For instance, the ion m/z 623.316 was identified as a pentapeptide with the sequence of LTDYL (Figure 5-1). The identification was first based on its y ions series of m/z 132.1003 (y<sub>1</sub>), 295.1673 (y<sub>2</sub>), 410.1916 (y<sub>3</sub>) and 511.2390 (y<sub>4</sub>) and b ion series of m/z 215.1387 (b<sub>2</sub>), 330.1652 (b<sub>3</sub>) and 493.2248 (b<sub>4</sub>). The sequences of the twelve other peptides have been confirmed following the same protocol and were listed in table 5-1.

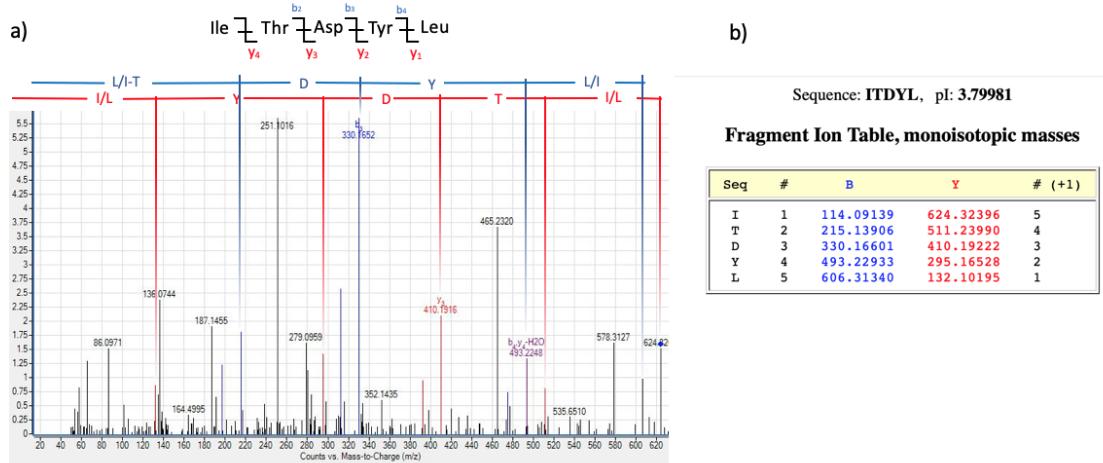


Figure 5-1 UHPLC MS-MS analysis of ions peak m/z of 623.316 Da corresponding to the sequence of LTDYL and b) theoretical fragmentation spectra of LTDYL

*Tableau 5-1 Sequences and characteristics of synthetic peptides*

Sequences identified	Molecular weight (Da)	Retention time (min)	Net charge (at pH 6)	pI	Scores*	% SPI**
IPVE	456.2581	10.174	-	4.60	7.97	73.1
IVDI	458.2738	22.342	-	3.80	6.6	78
IEGTL	531.289	17.27	-	4.00	9.93	77.3
LAFDHDL	829.3972	24.588	-	4.19	10.19	79.3
LATNQHF	829.3972	24.588	+	6.74	11.26	80,8
LVEPAAGTI	869.4857	18.7	-	3.99	7.74	77.9
LLTEAPLN	869.4857	18.7	-	3.99	8.93	79.2
VAPEEHPTL	991.497	15.796	-	4.50	17.53	93.7
LDTDYL	738.3424	40.044	-	3.56	8.26	81.3
ILLGMD	660.3504	29.454	-	4.30	10.63	81.3
ITDYL	623.316	25.851	-	3.80	11.59	89.1
IGEEF	593.2770	20.05	-	3.79	9.05	77.8
IDAGF	521.2483	27.307	-	3.79	7.83	81.7

\* Score of an individual peptide. It reflects the information content in the MS/MS spectrum [206].

>15 (quality: outstanding) and combined with % SPI of 60 or greater, very likely to be valid.

>9 (quality: good) and combined with % SPI of 60 or greater, likely to be valid.

>5 (quality: mixed quality) and combined with a % SPI of 60 or greater, review results to determine whether interpretation is valid.

\*\* % SPI: percentage of the extracted MS/MS ion current explained by theoretical fragmentation of the database hit [206].

These peptides have been chemically synthetized to confirm their individual bioactivity.

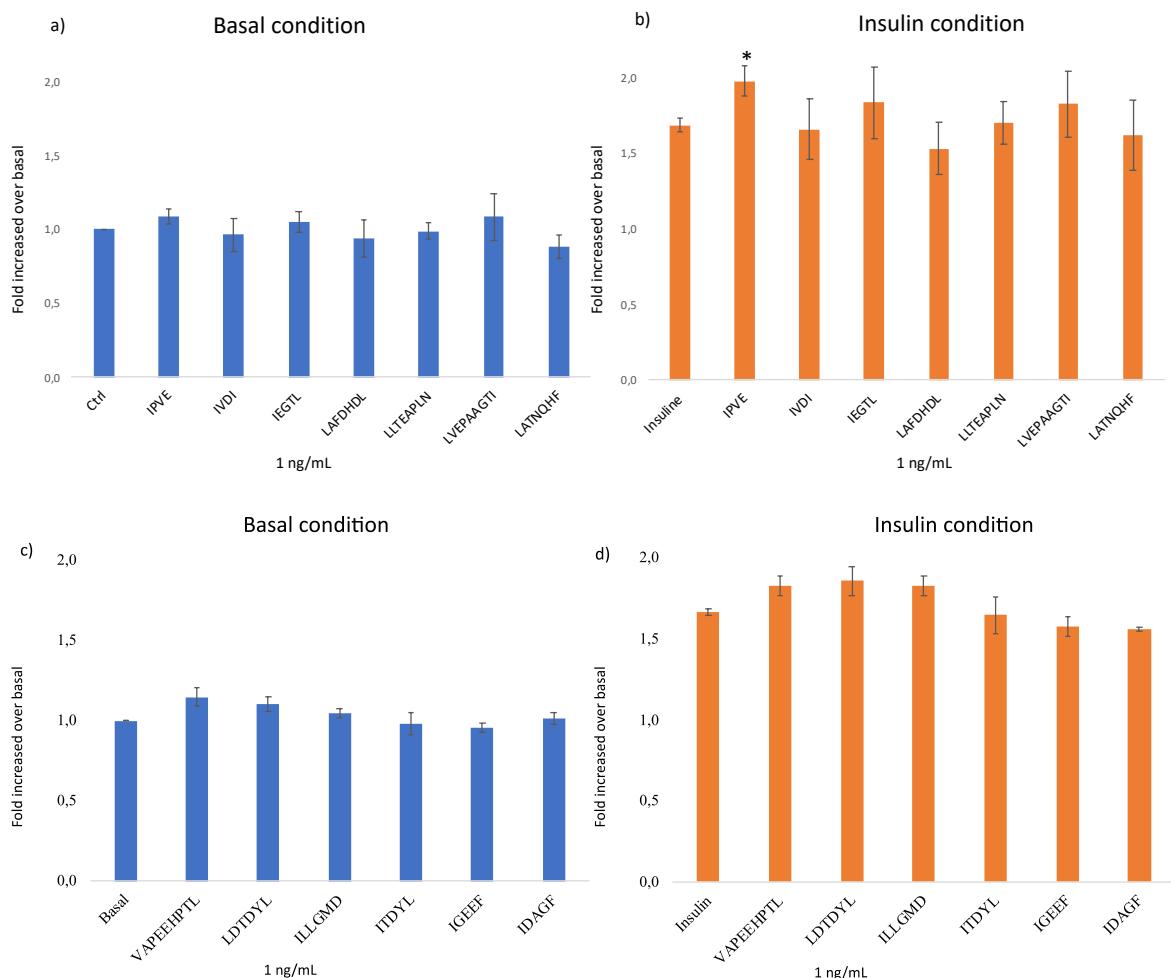
### 5.5.2. *In vitro* experiments

#### 5.5.2.1. Glucose uptake experiments

The capacity of the peptides to enhance the glucose uptake in muscle cells was investigated and results were presented in figure 5-2. Peptides synthesis was performed in two parts. Firstly, IPVE, IVDI, IEGTL, LAFDHDL, LLTEAPLN, LVEPAAGTI, LATNQF, were

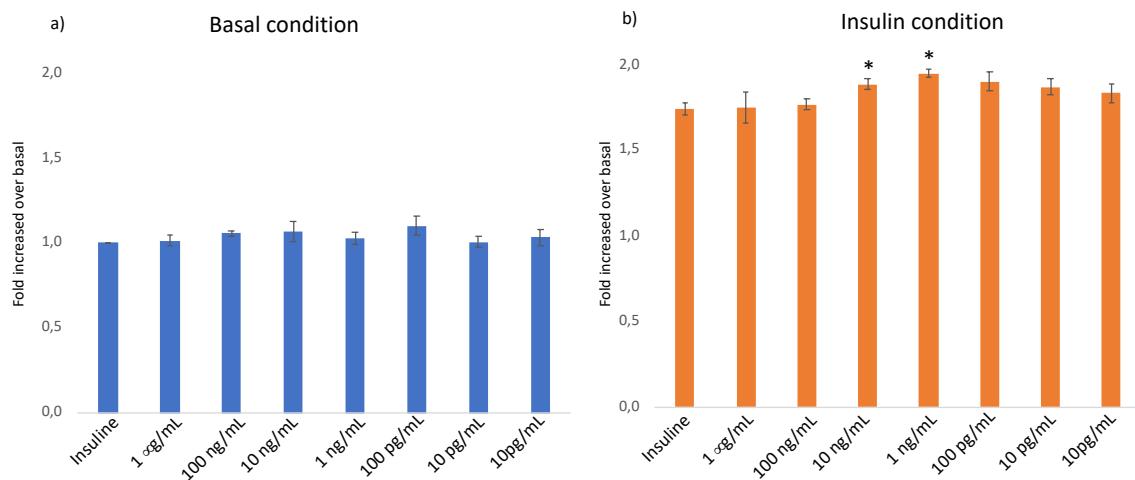
synthesized and then tested for their capacity to increase the glucose uptake (Fig 5-2a and 5-2b). In a second time VAPEEHPTL, LDTDYL, ILLGMD, ITDYL, IGEEF and IDAGF were synthesized, and their capacity to modulate the glucose uptake was investigated (Fig 5-2c and 5-2d). All peptides were tested in basal condition (Fig. 5-2a and 5-2c) and in insulin condition (Fig. 5-2b and 5-2d).

No differences were observed in basal condition whatever the peptide tested. While in presence of insulin, IPVE has demonstrated a significant enhancement of the glucose uptake (17%) comparatively to the insulin control ( $P = 0.016$ ).



**Figure 5-2 Effects of synthetic peptides on the glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells in basal (a and c) or insulin-stimulated (b and d) conditions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n = 9$ . An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value.**

Then, the dose-response effect to IPVE has been tested (Figure 5-3) with concentrations from 1 µg/mL to 10 pg/mL. These results confirmed the capacity to IPVE to improve the glucose uptake in muscle cells, as it was able to increase the bioactivity at 10 ng/mL and 1 ng/mL. Also, this result shown that the response of IPVE was dose-dependent, since for the highest ( $> 10$  ng/mL) and the lowest ( $< 100$  pg/mL) concentrations tested, IPVE presented no effect on the glucose uptake.



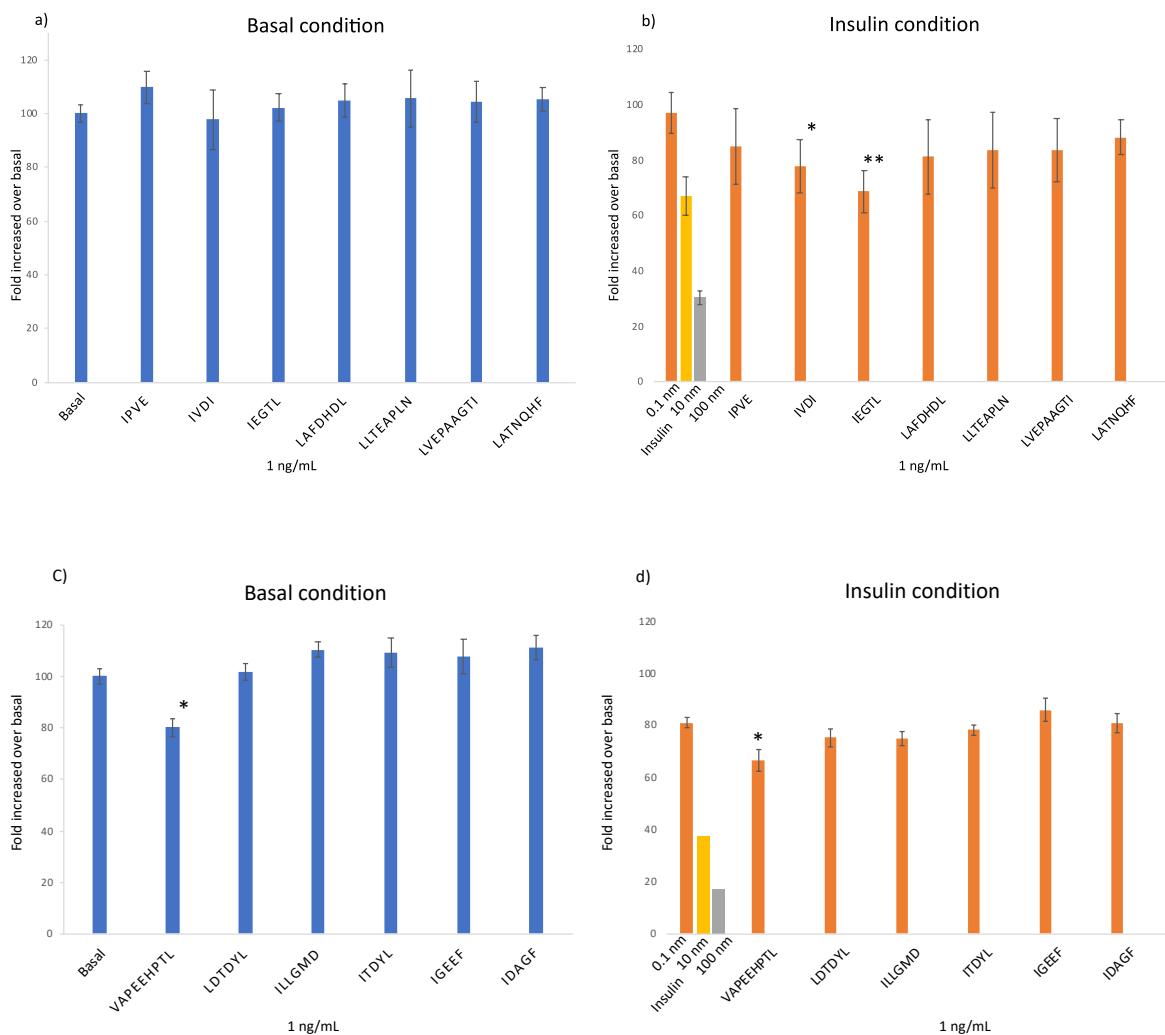
*Figure 5-3 Dose-response effect of IPVE on the glucose uptake modulation in L6 skeletal muscle cells in basal (a and c) or insulin-stimulated (b and d) conditions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 9. An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value.*

### 5.5.2.2. Hepatic Glucose Production

The capacity to increase the HGP of the thirteen peptides was investigated and results are presented in figure 5-4. As for the glucose uptake experiments, IPVE, IVDI, IEGTL, LAFDHDL, LLTEAPLN, LVEPAAGTI, LATNQF were tested in a first time. Then in a second time VAPEEHPTL, LTDYI, ILLGMD, ITDYL, IGEEF and IDAGF were tested for their capacity to decrease the HGP. All the thirteen peptides were tested in 6 repetitions, and in basal (fig. 5-4a and 5-4c) and insulin (fig. 5-4b and 5-4d) conditions.

Concerning the first seven peptides (Fig. 5-4a and 5-4b), the results have shown no differences in basal condition (Fig. 5-4a). For the insulin condition, as the peptides were incubated with insulin at 0.1 nm, the statistical comparisons were performed with the insulin

control at 0.1 nm. Two peptides demonstrated a decrease in their bioactivity when incubated with insulin. Indeed, IVDI and IEGTL have decreased the HGP by 20% and 30%, when compared to insulin at 0.1 nm, respectively. Moreover, IEGTL incubated with insulin at 0.1 nm has shown the same capacity to decrease the HGP than insulin alone at 10 nm. Concerning the six remaining peptides (Figure 5-4c and 5-4d), VAPEEHPTL demonstrated a decreased of the HGP in basal (20%) and insulin-stimulated (18%) conditions.



**Figure 5-4 Effects of synthetic peptides on in vitro hepatic production from FAO cells in basal (a and c) and insulin-stimulated (b and d) conditions. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 6. An asterisk indicates that mean values are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control's mean value. Two asterisks indicate that mean values are very significantly different ( $P < 0.01$ ) from the control's mean value**

### 5.5.2.3. Anti-inflammatory Experiments

*In-vitro* anti-inflammatory effects of thirteen peptides were investigated and results are presented in Fig. 5-5. All peptides were tested in the presence of LPS, to observe a possible reduction of the LPS-induced inflammatory effect. Moreover, Phenformin which is an antidiabetic drug used for the treatment of type 2 diabetes was used to compare the effect of the peptides. According to these results, none of the peptides demonstrated a significant decrease of the NO production.

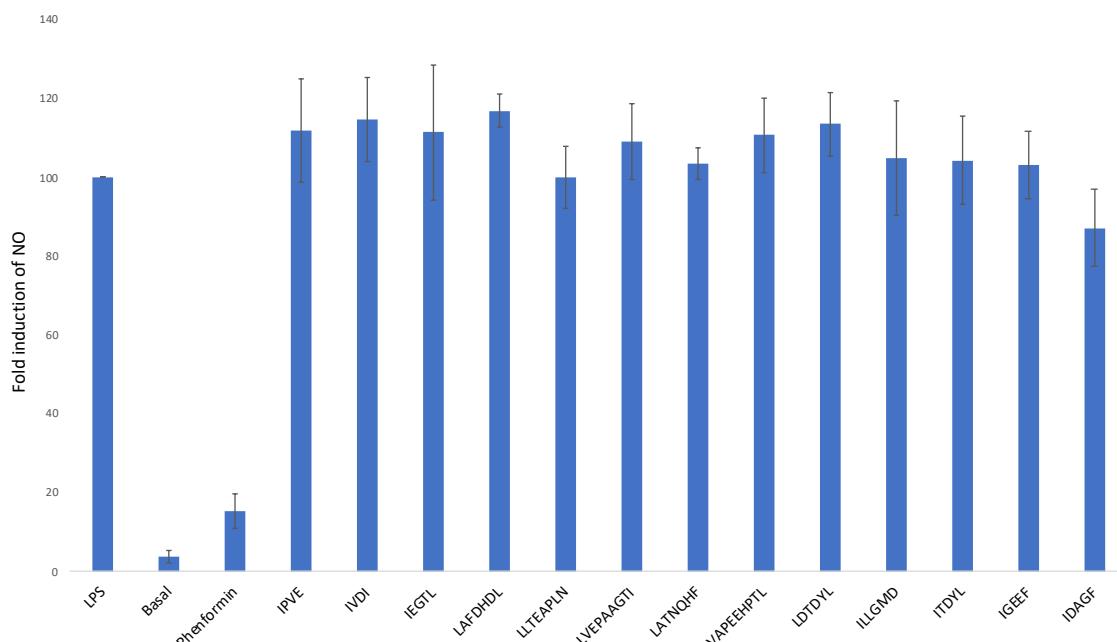


Figure 5-5 Effects of peptides on the nitric oxide (NO) production on lipopolysaccharide (LPS)-induced J774 macrophage cells. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation,  $n = 4$

Nevertheless, as reported in chapter 4, some fractions demonstrated a strong anti-inflammatory effect. The previous effect observed could be due to other peptides such as cationic peptides or due to a synergistic effect among peptides. To validate these hypotheses, further analyses have to be done and peptides have to be tested in a mixture. Moreover, since other anionic peptides or cationic peptides might be involved in the bioactivity, further analysis are necessary to continue the characterization and identification of these potential bioactive peptides.

## 5.6. Discussion

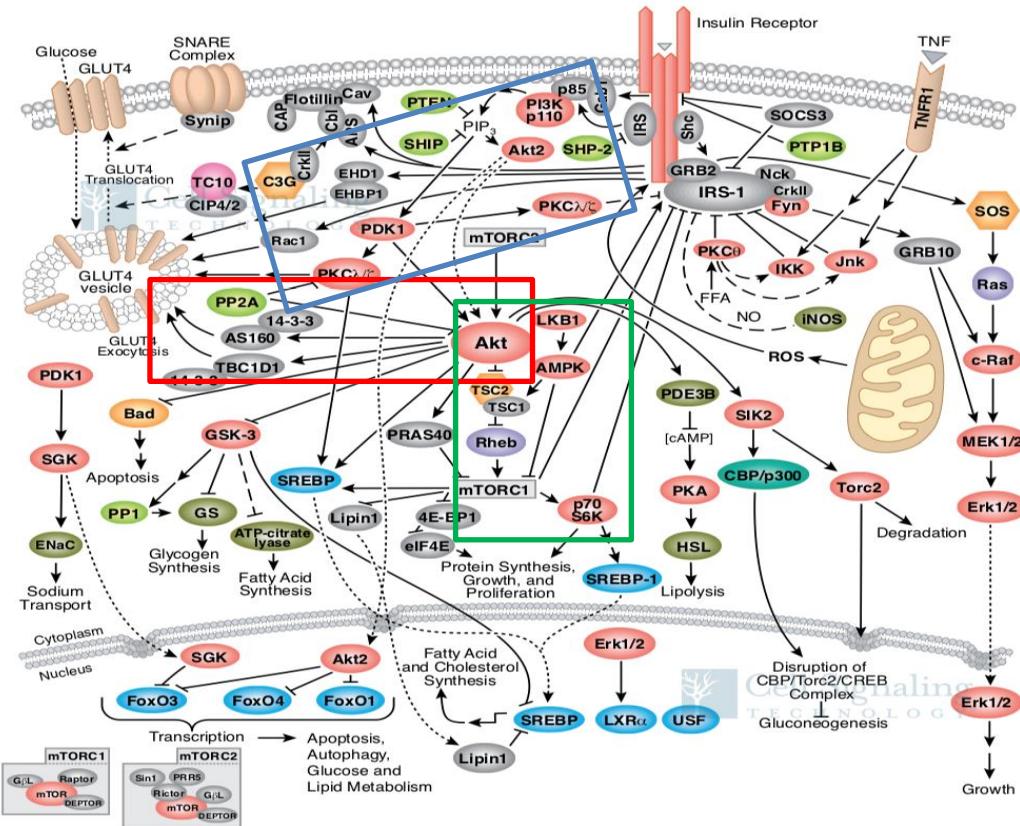
Numerous studies reported the beneficial effects of salmon proteins and salmon protein hydrolyzate on the T2D. Nevertheless, none of these studies were able to identify the peptide sequences responsible for these beneficial effects. In this study, thirteen peptides (listed in table 5-1) were identified, from anionic bioactive fractions previously generated ( $A_{FFC}$ ,  $A_{RC1}$ ,  $A_{RC2}$ ,  $A_{RC3}$  and  $K_{CL-}$ ), and synthesized.

Hence, IPVE demonstrated the capacity to increase the glucose uptake in skeletal muscle at 10 ng/mL and 1 ng/mL when incubated with insulin. While, three other peptides (IVDI, IEGTL and VAPEEHPTL) demonstrated glucoregulatory effects by reducing the HGP. In addition, the anti-inflammatory properties of the peptides were investigated, but none of the peptides have decreased the inflammation. Interestingly, the four BPs demonstrated an insulin-dependent glucose metabolism activity.

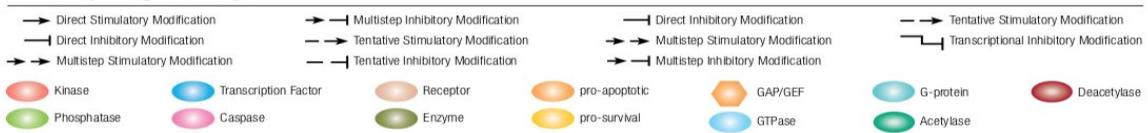
The identified peptides in this study are mostly composed of hydrophobic amino acids such as Ala (A), Gly (G), Ile (I), Leu (L), Pro (P) and Val (V). It was previously described that antidiabetic and anti-obesity peptides are generally hydrophobic [207]. Indeed, a mixture of hydrophobic amino acids, mostly composed of Ile (2 nm), but also by Cys (0.012 nm), Met (0.006 nm), Val (0.0016 nm) and Leu (0.014 nm) demonstrated the capacity to increase in basal and insulin-stimulated conditions the glucose uptake in isolated rats epitrochlearis muscle [208]. These effects appear to be mediated via a pathway that is independent from the usual insulin cascade and therefore may prove effective as an alternative therapeutic treatment for the insulin resistance [208]. Indeed, as presented in Fig 6-6 (red frame), insulin increases the AKT phosphorylation, which inactivates AS160 by its phosphorylation and then promotes GLUT4 translocation [209]. Nevertheless, the AA mixture seemed to increase the AS160 phosphorylation, and so promotes GLUT4 translocation, independently of the AKT phosphorylation. In another study, three hydrophobic peptides (IAVPGEVA, IAVPTGVA and LPYP) identified from soy glycinin, were able to increase the glucose uptake in HepG2 cells from another way. Indeed, the glucose uptake was increased via GLUT1 and GLUT4 activation, through the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathways via phosphorylation of AKT and AMPK [210]. Moreover, the phosphorylation of AMPK, as presented in Fig 5-6

(green frame) can inhibit the mTOR/p70S6K pathway ; its inactivation was described as a novel modulator of insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle cells [71]. Interestingly, these three peptides have the same molecular mechanisms than antidiabetic drugs such as metformin [211] and thiazolidinediones [210,212]. In addition, leucine has also demonstrated its glucose metabolism effects by stimulating the glycogen synthesis via the inactivation of glycogen synthase kinase-3 in L6 cells [213]. Finally, it was reported that dipeptides mostly composed by hydrophobic AAs, such as IV, LV, VL, II, LI, IL and LL, were able to increase the glucose uptake in muscle cells via the PI3-kinase and PKC ( protein kinase C) pathways (Fig 5-6, blue frame) [214]. It has also been observed that the PI 3-kinase-dependent PKC activation was diminished in muscle and liver during insulin resistance and type 2 diabetes [215].

*Figure 5-6 Insulin receptor pathway. Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. <https://www.cellsignal.com> [217]. Red frame: AKT/AS160 pathway. Green frame: mTOR/p70S6K pathway. Blue frame: PI3K/PKC pathway*



Pathway Diagram Key



Nevertheless, to better understand, how IPVE, IVDI, IEGTL and VAPEEHPTL, promotes glucose metabolism, further analyses must be carried out on the molecular mechanisms of these BPs. It could be interesting to test different molecular pathways such as AKT/AS160 or the AKT/AMPK pathways, previously described.

Moreover, another critical aspect in the development of BPs as natural new therapeutic approaches is their bioavailability. Indeed, the bioavailability of peptides, which is the quantity that passes through the cell membranes in the intestine and stay available for action within the cells [216]. This bioavailability is generally affected by their physicochemical properties such as molecular size, charge, sequence, and solubility [17,207]. Moreover, this bioavailability is determined by their sensitivity to the digestive enzyme peptidase and intestinal absorption. In human, the gastrointestinal digestion of peptides starts in the stomach by the action of pepsin and it continues in the Luminal phase of the small intestine by the

action of pancreatic proteases trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, elastase, and carboxypeptidase A and B [217]. These four BPs have been obtained by successive enzymatic digestion using three gastrointestinal enzymes, such as pepsin, trypsin and chymotrypsin, and should not be affected by these gastrointestinal enzymes anymore. Nevertheless, if smaller peptides (di- or tri-peptides) can be transported across the enterocytes through intestinal-expressed peptide transporters (PEP1 and PEP2) [217], the transport of these oligopeptides through the intestine must be investigated. It was previously described that oligopeptides may be absorbed by passive transport through hydrophobic regions (transcellular transport) of membrane epithelia or tight junctions (paracellular transport) [218–220]. Moreover, hydrophobic peptides showed a higher permeation through biological membranes [207,217]. Nevertheless, other strategies such as chemical or physical modifications could be performed to ensure that their bioactivities are conserved and delivered to the cellular sites of action [207]

## 5.7. Conclusion

In this study four new BP sequences were identified (IPVE, IVDI, IEGTL and VAPEEHPTL) and their glucoregulatory effects demonstrated. Indeed, IPVE improved glucose uptake by 17% in presence of insulin, comparatively to the insulin control. While the three other peptides, IVID (20%), IEGTL (30%) and VAPEEHPTL (18%) demonstrated the capacity to decrease the hepatic glucose production in presence of insulin. VAPEEHPTL also decreased the hepatic glucose production in basal condition (20%). These peptides could represent novel natural antidiabetic agents, as they could potentiate the action of the insulin in its target tissues, but they could also reduce the fasting hyperglycemia as VAPEEHPTL could regulate the glucose independently of the insulin. Nevertheless, the molecular mechanisms and their bioavailability have to be determined, before being considered as natural new therapeutic agents for the treatment of T2D

## **5.8. Acknowledgments**

The authors are thankful to Bruno Marcotte research professional at Université Laval, for his great implication in this project, and Cooke Aquaculture for providing the salmon frames. This work was also supported by the “Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada” (CRSNG), the Consortium de Recherche et Innovations en Bioprocédés Industriels au Québec (CRIBIQ), the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). Authors would also thanks Mitacs for their financial supports by a Cluster grant program: Salmon peptides identification and purification and their insulin modulation. Special gratitude goes to Jean-Philippe Songpadith and Karina Danielle Pereira for the hepatic glucose production and anti-inflammatory experiments.

## **Conclusions et perspectives**

# Conclusions et perspectives

## Principaux résultats et retour sur l'hypothèse

Le présent travail visait à déterminer la capacité de l'électrodialyse à fractionner un hydrolysat complexe de coproduits de saumon, afin de générer des fractions plus pures et plus bioactives, et facilitant l'identification de peptides bioactifs à partir d'une matrice complexe.

Dans une première partie, il a été démontré qu'un empilement judicieux de membranes d'ultrafiltration dans un module d'ÉDUF permettait de concentrer des peptides bioactifs et/ou de retirer de potentiels inhibiteurs. En effet, l'étude de la capacité des fractions générées à agir sur l'absorption du glucose dans un modèle *in vitro* de cellules musculaires, a permis d'observer qu'une seule étape de fractionnement par EDUF, permettait de concentrer des peptides capables d'augmenter l'absorption du glucose en condition basale et/ou en présence d'insuline ( $C_{FFC}$ ,  $C_{RC1}$  et  $C_{RC2}$ ) mais aussi de retirer des peptides inhibiteurs ( $C_{RC3}$ ). Concernant la deuxième configuration d'EDUF, les fractions anioniques générées par EDUF ont démontré un autre profil bioactif, car les trois fractions ( $A_{RC1}$ ,  $A_{RC2}$  et  $A_{RC3}$ ) ont permis d'augmenter l'absorption du glucose en condition basale, signifiant que le ou les peptides bioactifs étaient de faible poids moléculaire et/ou possédant plusieurs charges comme il(s) étaient capable(s) d'atteindre le dernier compartiment de récupération ( $A_{RC3}$ ). Ainsi, ces résultats ont permis de répondre à la première partie de l'hypothèse sur l'empilement spécifique de membranes d'UF avec des seuils de coupure différents dans un module d'EDUF qui permet de concentrer des peptides bioactifs, cationiques ou anioniques, et de générer des fractions bioactives contre le DT2.

Dans un deuxième temps, une deuxième séparation par EDUF a été réalisée à partir des solutions finales ( $A_{FFC}$  et  $C_{FFC}$ ), précédemment obtenues. Ainsi afin de purifier ces deux fractions, une partie des peptides cationiques ont été retirés de  $A_{FFC}$  (déjà déplétée en peptides

anioniques lors de la première séparation par EDUF), alors qu'une partie des peptides anioniques ont été retirés de C<sub>FFC</sub> (déjà déplétée en peptides cationiques lors de la première séparation par EDUF). Les fractions générées par EDUF, de compositions différentes, ont été testées sur différentes bioactivités impliquées dans le diabète de type 2, comme l'absorption du glucose, la production de glucose hépatique et l'inflammation. Deux fractions, A<sub>FFC</sub> et C<sub>FFC2</sub>, ont démontré triple effet bioactif en augmentant l'absorption du glucose (12 et 21%, respectivement), en diminuant la production du glucose hépatique (25 et 34%, respectivement) et en diminuant la réponse inflammatoire (40 et 30%). Concernant l'inflammation, A<sub>FFC</sub> a démontré une diminution plus importante de la réponse inflammatoire que la Phenformine, médicament antidiabétique de synthèse autrefois utilisé contre le DT2. Finalement, l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) a permis d'identifier 24 séquences, représentant de potentiels peptides bioactifs. Ainsi, ces résultats ont permis de répondre à une partie de l'hypothèse, concernant l'utilisation de l'EDUF afin de caractériser et d'identifier des peptides bioactifs. En effet, la comparaison des fractions bioactives a permis d'identifier 24 peptides potentiellement responsables des bioactivités étudiées.

Finalement, sur ces 24 séquences identifiées, 13 peptides ont été synthétisés afin de valider leurs bioactivités dans des études *in vitro* sur l'absorption du glucose musculaire, la production du glucose hépatique et finalement l'inflammation. Ainsi, quatre nouveaux peptides issus de coproduits de saumon ont été identifiés et leur propriétés glucorégulatrices démontrées. En effet, IPVE a permis d'augmenter l'absorption du glucose. Alors que IVDI, IEGTL et VAPEEHPTL ont diminué la production de glucose hépatique. Ces résultats ont ainsi permis de répondre à la dernière partie de l'hypothèse, à savoir que le fractionnement par EDUF à faciliter l'identification de quatre peptides glucorégulateurs aux effets démontrés *in vitro*.

Ainsi, par ces résultats, notre hypothèse que «*l'empilement d'un nombre spécifique de membranes d'UF avec des seuils de coupure différents dans un module d'EDUF, permet de concentrer des peptides bioactifs, issus de l'hydrolyse enzymatique de coproduits de saumon, cationiques ou anioniques, et de générer des fractions bioactives contre le DT2, tout en*

*facilitant l'identification des peptides, démontrant individuellement des propriétés biologiques contre le DT2 (absorption du glucose, production de glucose hépatique, inflammation)» a été pleinement confirmée.*

## **Contribution originale de la thèse**

La valorisation des coproduits de l'industrie de la transformation du poisson demeure un défi majeur d'un point de vue économique et environnemental. Ces coproduits regorgent de molécules de haute valeur telles que des peptides bioactifs, imbriqués dans la structure primaire des protéines. Cependant, ces coproduits, souvent sous-évalués et sous-estimés ne sont que peu ou pas valorisés. La valorisation de ces coproduits nécessite une étape d'hydrolyse enzymatique, afin de libérer ces peptides bioactifs, mais aussi des étapes de fractionnement adaptées afin de les concentrer. La plupart des études portant sur le fractionnement de peptides bioactifs disponibles dans la littérature utilisent des procédés conventionnels, soit peu sélectifs, pour la séparation de peptides (ultrafiltration) ou présentant un impact environnemental non négligeable (les techniques chromatographiques). Dans ce contexte, l'utilisation d'un nouveau procédé de séparation, sélectif, éco-efficient et facilement applicable telle que développé dans ces travaux de thèse, peut s'avérer très prometteur et avantageux pour l'industrie.

La démarche entreprise lors de cette thèse a permis de montrer l'efficacité de l'EDUF pour le fractionnement d'hydrolysats complexes afin de concentrer des peptides bioactifs agissants contre le DT2. En effet, une séparation, non optimisée, a permis de générer des fractions présentant une triple bioactivités. Fait intéressant, les deux fractions présentant ce triple effet bioactif sont issues du compartiment d'alimentation, et représentent donc 80% de la masse valorisable, ainsi il est envisageable de produire ces fractions en grande quantité. Finalement, l'étude des fractions bioactives, générées par EDUF, a permis l'identification de quatre nouveaux peptides glucorégulateurs, aux effets démontrés *in vitro*. L'identification de ces peptides pourrait permettre de s'assurer de la répétabilité des procédés d'hydrolyse, de séparation, et ainsi de s'assurer de la bioactivité des fractions générées de coproduits issues de différents lots de production, pour la mise sur le marché d'un nouveau produit

nutraceutique contre le DT2. De plus, ces séquences pourraient être commercialisées comme nouveau produit pharmaceutique contre le DT2. Ainsi, les travaux de cette thèse pourraient permettre le développement futur de deux nouveaux produits, ciblant deux marchés différents.

## **Principales limites, contraintes et techniques.**

Premièrement, l'EDUF a été utilisée comme technique « préparative » c'est-à-dire que la séparation a été faite dans le but de générer le plus de fractions possédant des peptides avec des propriétés physico-chimiques différentes, dans le but de faciliter l'identification par la suite les peptides bioactifs. Lors de ces travaux, l'EDUF n'a donc pas été utilisée de manière optimisée.

Deuxièmement, l'identification des peptides a été réalisée sur les fractions anioniques. En effet, comme les fractions anioniques, récupérées lors de la première et deuxième séparation par EDUF ont démontré une augmentation de l'absorption du glucose. Ainsi, dans un premier temps, la caractérisation a été effectuée sur ces fractions afin d'identifier de possibles peptides glucorégulateurs. Néanmoins, certaines fractions cationiques ainsi que les fractions AFFC et C<sub>FFC2</sub>, ont aussi démontré des effets bioactifs intéressants, et mériteraient d'être caractérisées afin d'identifier de nouvelles séquences.

Troisièmement, les études *in vitro* effectuées lors de ce travail de doctorat ont permis d'identifier pour la première fois, quatre peptides bioactifs issus de coproduits de saumon. Cependant, ces peptides ont été testés individuellement, et à une concentration de 1ng/mL. Or, les fractions obtenues par EDUF ont elles aussi été testées à 1 ng/mL, et sont composées d'au moins une centaine de peptides. De ce fait, les peptides bioactifs se trouvent à une concentration, dans les fractions, bien inférieure à la concentration testée *in vitro*.

Finalement, le mode d'action et la biodisponibilité des peptides bioactifs représentent des étapes clefs dans le développement de produits nutraceutiques et pharmaceutiques. Ceci n'a pas été abordé dans le présent travail.

## Perspectives

- ⇒ Connaissant les propriétés physico-chimiques des peptides et notamment la masse et la charge des peptides il serait possible d'optimiser le procédé pour produire des fractions bioactives. De plus, pour augmenter la productivité de l'ensemble du procédé de production de peptides bioactifs, il serait intéressant de se pencher sur la question de l'hydrolyse et de la séparation par EDUF en simultané.
- ⇒ Une fois, les paramètres de séparation optimisés, il serait nécessaire de réaliser une mise à l'échelle industrielle, afin d'étudier le comportement des phénomènes électrodialytiques (évolution des concentrations peptidiques, des taux de migration, des résistances membranaires, etc.), et d'étudier la faisabilité économique d'une utilisation de la technologie par l'industrie notamment nutraceutique.
- ⇒ Concernant les fractions bioactives, il serait intéressant de continuer la caractérisation de ces fractions, afin d'identifier de nouvelles séquences peptidiques, et de vérifier leurs bioactivités, et notamment anti-inflammatoire.
- ⇒ Enfin, à propos des séquences bioactives identifiées il est important d'étudier leur mécanisme d'action et de tester différentes voies métaboliques mise en jeux dans le métabolisme du glucose. Ainsi, plusieurs pistes ont été identifiées comme la capacité à favoriser la translocation du transporteur GLUT4 via les voies PI3K/PKC ou AKT/AS160, ou encore en étudiant le transport du glucose dans les cellules musculaires via la voie mTOR/p70 S6 kinase.
- ⇒ Il est aussi important de déterminer la biodisponibilité de ces peptides. Une première étude en utilisant un modèle de cellule CACO-2 permettrait d'avoir un premier

élément de réponse quant à la capacité des peptides à traverser l'épithélium intestinale, car le modèle CACO-2 est capable de recréer les jonctions serrées, les microvillosités ainsi que les enzymes et transporteurs qui caractérisent les entérocytes.

- ⇒ Une étude *in vivo* sur les peptides et les fractions bioactives est aussi nécessaire, afin de confirmer les effets observés *in vitro*. Il serait intéressant de tester dans cette étude *in vivo*, un mélange de peptides ayant démontré les effets les plus prometteurs sur les différentes bioactivités testées *in vitro*, afin de vérifier l'effets positifs sur un ensemble d'anomalies observées lors de l'établissement du DT2.
- ⇒ Finalement d'un point de vue général, la démarche entreprise au sein de ce manuscrit peut être effectuée sur d'autres coproduits de poisson. Les protéines musculaires étant bien conservées entre les espèces, il est envisageable que ces peptides puissent être retrouvés dans des coproduits issus de la transformation d'autres poissons. Cela permettrait d'augmenter la quantité de coproduits valorisés.

## Références

## Références

- [1] L. Chen, D.J. Magliano, P.Z. Zimmet, The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus - Present and future perspectives, *Nat. Rev. Endocrinol.* 8 (2012) 228–236. doi:10.1038/nrendo.2011.183.
- [2] International Diabetes Federation, *Atlas du Diabète de la FID*, 2017.
- [3] M. Stumvoll, B.J. Goldstein, T.W. van Haeften, Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy., *Lancet* (London, England). 365 (2005) 1333–46. doi:10.1016/S0140-6736(05)61031-X.
- [4] G. Chevrier, P.L. Mitchell, L.-E. Rioux, F. Hasan, T. Jin, C.R. Roblet, A. Doyen, G. Pilon, P. St-Pierre, C. Lavigne, L. Bazinet, H. Jacques, T. Gill, R.S. McLeod, A. Marette, Low-Molecular-Weight Peptides from Salmon Protein Prevent Obesity-Linked Glucose Intolerance, Inflammation, and Dyslipidemia in LDLR-/-/ApoB100/100 Mice., *J. Nutr.* 145 (2015) 1415–22. doi:10.3945/jn.114.208215.
- [5] I.S. Arvanitoyannis, A. Kassaveti, Fish industry waste: Treatments, environmental impacts, current and potential uses, *Int. J. Food Sci. Technol.* 43 (2008) 726–745. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x.
- [6] C. Roblet, A. Doyen, J. Amiot, G. Pilon, A. Marette, L. Bazinet, Enhancement of glucose uptake in muscular cell by soybean charged peptides isolated by electrodialysis with ultrafiltration membranes (EDUF): Activation of the AMPK pathway, *Food Chem.* 147 (2013) 124–130. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.108.
- [7] K. Kumar, A.N. Yadav, V. Kumar, P. Vyas, H.S. Dhaliwal, Food waste : a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds, *Bioresour. Bioprocess.* (2017). doi:10.1186/s40643-017-0148-6.
- [8] P.A. Harnedy, R.J. Fitzgerald, Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review, *J. Funct. Foods.* 4 (2012) 6–24. doi:10.1016/j.jff.2011.09.001.
- [9] S.K. Kim, E. Mendis, Bioactive compounds from marine processing byproducts - A review, *Food Res. Int.* 39 (2006) 383–393. doi:10.1016/j.foodres.2005.10.010.
- [10] A. Schieber, F.C. Stintzing, R. Carle, By-products and Wastes of Plant Food Processing as a Source of Functional Compounds, *Food Sci. Technol.* 12 (2001) 401–413.
- [11] C. Lavigne, A. Marette, H. Jacques, Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278 (2000) E491–E500.

- [12] C. Lavigne, F. Tremblay, G. Asselin, H. Jacques, A. Marette, Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281 (2001) E62–E71.
- [13] G. Pilon, J. Ruzzin, L.E. Rioux, C. Lavigne, P.J. White, L. Froyland, H. Jacques, P. Bryl, L. Beaulieu, A. Marette, Differential effects of various fish proteins in altering body weight, adiposity, inflammatory status, and insulin sensitivity in high-fat-fed rats, *Metabolism*. 60 (2011) 1122–1130. doi:10.1016/j.metabol.2010.12.005.
- [14] H. Korhonen, A. Pihlanto, Bioactive peptides: Production and functionality, *Int. Dairy J.* 16 (2006) 945–960. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.012.
- [15] M. Yoshikawaa, H. Fujitab, N. Matobaa, Y. Takenakaa, T. Yamamotoa, R. Yamauchia, H. Tsurukia, K. Takahatac, Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases, *BioFactors*. 12 (2000) 143–146.
- [16] H. Korhonen, A. Pihlanto, Selective isolation of cationic amino acids and peptides by electro-membrane filtration, *Curr. Pharm. Des.* 9 (2005) 1297–1308. doi:10.2174/1381612033454892.
- [17] C.C. Udenigwe, R.E. Aluko, Food protein-derived bioactive peptides : production , processing , and potential health benefits, *J. Food Sci.* 77 (2012) R11–R24. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x.
- [18] H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 491–511. doi:10.1128/CMR.00056-05.
- [19] K.H. Ellegard, C. Gammelgard-Larsen, E.S. Sorensen, S. Fedosov, Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides, *Int. Dairy J.* 9 (1999) 639–652. doi:10.1016/S0958-6946(99)00135-1.
- [20] I. Recio, S. Visser, Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane, *J. Chromatogr. A.* 831 (1999) 191–201. doi:10.1016/S0021-9673(98)00950-9.
- [21] W.D. Deeslie, M. Cheryan, Fractionation of Soy Protein Hydrolysates Using Ultrafiltration Membranes, *J. Food Sci.* 57 (1992) 411–413. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb05505.x.
- [22] L. Beaulieu, M. Sirois, É. Tamigneaux, Evaluation of the in vitro biological activity of protein hydrolysates of the edible red alga, *Palmaria palmata* (dulse) harvested from the Gaspe coast and cultivated in tanks, *J. Appl. Phycol.* (2016). doi:10.1007/s10811-016-0850-3.
- [23] Y.-J. Jeon, H.-G. Byun, S.-K. Kim, Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes, *Process Biochem.* 35 (1999)

471–478. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9592\(99\)00098-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9592(99)00098-9).

- [24] C. Roblet, A. Doyen, J. Amiot, L. Bazinet, Impact of pH on ultrafiltration membrane selectivity during electrodialysis with ultrafiltration membrane (EDUF) purification of soy peptides from a complex matrix, *J. Memb. Sci.* 435 (2013) 207–217. doi:[10.1016/j.memsci.2013.01.045](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2013.01.045).
- [25] G. Bargeman, J. Houwing, I. Recio, G.-H. Koops, C. van der Horst, Electro-membrane filtration for the selective isolation of bioactive peptides from an alpha(s2)-casein hydrolysate., *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2002) 599–609. doi:[10.1002/bit.10419](https://doi.org/10.1002/bit.10419).
- [26] G. Bargeman, M. Dohmen-Speelmans, I. Recio, M. Timmer, C. Van Der Horst, Selective isolation of cationic amino acids and peptides by electro-membrane filtration, *Lait.* 80 (2000) 175–185.
- [27] G. Bargeman, G.H. Koops, J. Houwing, I. Breebaart, H.C. Van Der Horst, M. Wessling, The development of electro-membrane filtration for the isolation of bioactive peptides: The effect of membrane selection and operating parameters on the transport rate, *Desalination.* 149 (2002) 369–374. doi:[10.1016/S0011-9164\(02\)00824-X](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00824-X).
- [28] S.M. Kamau, S.C. Cheison, W. Chen, X.M. Liu, R.R. Lu, Alpha-lactalbumin: Its production technologies and bioactive peptides, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9 (2010) 197–212. doi:[10.1111/j.1541-4337.2009.00100.x](https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00100.x).
- [29] L. Bazinet, L. Firdaus, Separation of Bioactive Peptides by Membrane Processes: Technologies and Devices, *Recent Pat. Biotechnol.* Volume 7 (2013) 9–27. doi:[10.2174/1872208311307010003](https://doi.org/10.2174/1872208311307010003).
- [30] Fédération Française des Diabétiques, La glycémie, (n.d.). <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/glycemie> (accessed March 24, 2019).
- [31] J.. Mering, O. Minkowski, Diabetes mellitus naeh Pankreasstirpation., *Arch. Für Exp. Pathol. Und Pharmakologie.* 26 (1852) 371–387. doi:[10.1007/bf01831214](https://doi.org/10.1007/bf01831214).
- [32] F.G. Banting, C.H. Best, Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes, *Can. Med. Assoc. J.* 12 (1922) 141–146.
- [33] M. Bliss, Découverte de l’insuline, (2018). <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/dcouverte-de-linsuline>.
- [34] The Nobel Fundation, Frederick G. Banting – Biographical, (n.d.). <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1923/banting/biographical> (accessed February 17, 2019).
- [35] M.C. Petersen, G.I. Shulman, Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance, *Physiol. Rev.* 98 (2018) 2133–2223. doi:[10.1152/physrev.00063.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017).

- [36] P.M. Jones, S.J. Persaud, Islet Function and Insulin Secretion, in: Textb. Diabetes, Fifth Ed., 2016: pp. 87–102.
- [37] S. Del Prato, C. Bianchi, G. Daniele, Abnormalities of Insulin Secretion and  $\beta$ -Cell Defects in Type 2 Diabetes, in: Textb. Diabetes Fourth Ed., 2016: pp. 160–173. doi:10.1002/9781444324808.ch10.
- [38] S.S. Andrali, M.L. Sampley, N.L. Vanderford, S. Ozcan, Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic  $\beta$ -cells, Biochem. J. 415 (2008) 1–10. doi:10.1042/BJ20081029.
- [39] C.J. Hedeskov, Mechanism of glucose-induced insulin secretion., Physiol. Rev. 60 (1980) 442–509. doi:10.1152/physrev.1980.60.2.442.
- [40] S.E. Kahn, R.L. Hull, K.M. Utzschneider, Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes, Nature. 444 (2006) 840–846. doi:10.1038/nature05482.
- [41] J. Capeau, Voies de signalisation de l’insuline: mécanismes affectés dans l’insulino-résistance, M/S Médecine Sci. 19 (2003) 834–839.
- [42] V. Ouellet, Effets de la protéine de morue sur la sensibilité à l’insuline chez des hommes et des femmes résistants à l’insuline, Université Laval, 2009.
- [43] M.F. White, Molecular mechanism of insulin action, in: Textb. Diabetes, Fifth Ed., 2016: pp. 114–132.
- [44] R.A. Rizza, Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: Implications for therapy, Diabetes. 59 (2010) 2697–2707. doi:10.2337/db10-1032.
- [45] Fédération Internationale du Diabète, Atlas du DIABÈTE de la FID Septième édition 2015, 2015. [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas).
- [46] CANADIAN DIABETES ASSOCIATION, STATISTIQUES SUR LE DIABÈTE AU CANADA, (n.d.). [https://www.diabetes.ca/how-you-can-help/advocate/pourquoi-un-leadership-federal-est-essentiel/statistiques-sur-le-diabete-au-canada#\\_ftn1](https://www.diabetes.ca/how-you-can-help/advocate/pourquoi-un-leadership-federal-est-essentiel/statistiques-sur-le-diabete-au-canada#_ftn1) (accessed January 23, 2019).
- [47] Équipe de professionnels de la santé de Diabète Québec, Le diabète de type 2, (2018). <https://www.diabete.qc.ca/fr/comprendre-le-diabete/tout-sur-le-diabete/types-de-diabete/le-diabete-de-type-2> (accessed March 3, 2019).
- [48] L. Groop, C. Forsblom, M. Lehtovirta, T. Tuomi, S. Karanko, M. Nissén, B.O. Ehrnström, B. Forsén, B. Isomaa, B. Snickars, M.R. Taskinen, Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): Evidence for sex-specific parental effects, Diabetes. 45 (1996) 1585–1593. doi:10.2337/diab.45.11.1585.
- [49] A.J. Scheen, Pathophysiology of Type 2 Diabetes, Acta Clin. Belg. 58 (2003) 335–

341. doi:10.3803/enm.2018.33.1.9.

- [50] A.G. Tabák, C. Herder, W. Rathmann, E.J. Brunner, M. Kivimäki, Prediabetes: A high-risk state for diabetes development, *Lancet.* 379 (2012) 2279–2290. doi:10.1016/S0140-6736(12)60283-9.
- [51] J. Tuomilehto, J. Indstrom, J. Eriksson, T. Valle, E. Hamalainen, M. Uusitupa, Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus By Changes in Lifestyle Among Subjects With Impaired Glucose Tolerance, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 1343–1350. doi:10.1056/NEJM200105033441801.
- [52] E.E. Kershaw, J.S. Flier, Adipose Tissue as an Endocrine Organ, *J. Clin. Endocrinology Metab.* 89 (2004) 2548–2556. doi:10.1016/B978-0-11-408134-5.00014-7.
- [53] N. Ouchi, S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, K. Walsh, Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease, *Curr. Opin. Lipidol.* 14 (2003) 561–566. doi:10.1097/00041433-200312000-00003.
- [54] A.H. Berg, P.E. Scherer, Adipose Tissue, Inflammation, and Cardiovascular Disease, *Circ. Res.* 96 (2005) 939–949. doi:10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
- [55] S.E. Shoelson, L. Herrero, A. Naaz, Obesity, inflammation, and insulin resistance, *Gastroenterology.* 132 (2007) 2169–2180. doi:10.1007/978-1-4614-6819-6\_1.
- [56] A. Marette, Molecular mechanisms of inflammation in obesity-linked insulin resistance, *Int. J. Obes.* 27 (2003) S46–S48. doi:10.1038/sj.ijo.0802500.
- [57] J.M. Olefsky, C.K. Glass, Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance, *Annu. Rev. Physiol.* 72 (2010) 219–246. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135846.
- [58] H. Tilg, A.R. Moschen, Adipocytokines: Mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 772–783. doi:10.1038/nri1937.
- [59] N. Dali-Youcef, Inflammation métabolique et insulino-résistance : les connaissances actuelles, *Med. Des Mal. Metab.* 9 (2015) 279–291. doi:10.1016/S1957-2557(15)30075-4.
- [60] N. Ouchi, J.L. Parker, J.J. Lugus, K. Walsh, Adipokines in inflammation and metabolic disease, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 85–97. doi:10.1038/nri2921.
- [61] S. Cinti, G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloria, S. Wang, M. Fortier, A.S. Greenberg, M.S. Obin, Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2347–2355. doi:10.1194/jlr.m500294-jlr200.
- [62] S.P. Weisberg, D. Hunter, R. Huber, J. Lemieux, S. Slaymaker, K. Vaddi, I. Charo,

R.L. Leibel, A.W.F. Jr.1, CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 115–124. doi:10.1172/JCI24335.or.

- [63] H. Kanda, S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, M. Kasuga, MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1494–1505. doi:10.1172/JCI26498DS1.
- [64] M. Roden, K. Petersen, G. Shulman, Insulin resistance in type 2 diabetes, in: *Textb. Diabetes* Fourth Ed., 2016: pp. 174–186.
- [65] M.A. Abdul-Ghani, R.A. DeFronzo, Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010). doi:10.1155/2010/476279.
- [66] U. Özcan, Q. Cao, E. Yilmaz, A.-H. Lee, N.N. Iwakoshi, E. Özdenlen, G. Tuncman, C. Görgün, L.H. Glimcher, G.S. Hotamisligil, Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes, *Science* (80-. ). 306 (2004) 457–462.
- [67] F. Tremblay, C. Lavigne, H. Jacques, A. Marette, Skeletal Muscle of High Fat – Fed Rats Is Associated With Alterations in Both Akt / Protein Kinase B and, *Diabetes*. 50 (2001) 1901–1910.
- [68] G. Pereghin, T.B. Price, K.F. Petersen, M. Roden, G.W. Cline, K. Gerow, D.L. Rothman, G.I. Shulman, Increased Glucose Transport-Phosphorylation and Muscle Glycogen Synthesis after Exercise Training in Insulin-Resistant Subjects, *Exerc. Insul. Sensit.* 335 (1996) 1357–1362.
- [69] W.T. Garvey, L. Maianu, J.-H. Zhu, G. Brechtel-Hook, P. Wallace, A.D. Baron, Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2377–2386. doi:<https://doi.org/10.1172/JCI1557>.
- [70] F. Tremblay, M. Krebs, L. Dombrowski, A. Brehm, E. Bernroider, E. Roth, P. Nowotny, W. Waldha, M. Roden, Overactivation of S6 Kinase 1 as a Cause of Human Insulin Resistance During Increased Amino Acid Availability, *Diabetes*. 54 (2005).
- [71] F. Tremblay, A. Marette, Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway: A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38052–38060. doi:10.1074/jbc.M106703200.
- [72] F. Baquero, C. Nombela, The microbiome as a human organ, *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (2012) 2–4. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x.
- [73] S.E. Kahn, R.L. Prigeon, D.K. Mcculloch, E.J. Boyko, R.N. Bergman, M.W. Schwartz, J.L. Neifing, W.K. Ward, J.C. Beard, J.P. Palmer, D. Porte, Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta - cell function in human subjects . Evidence for a hyperbolic function, *Diabetes*. 42 (1993) 1663–1672.

- [74] H. Khodabandehloo, S. Gorgani-Firuzjaee, G. Panahi, R. Meshkani, Molecular and cellular mechanisms linking inflammation to insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction, *Transl. Res.* 167 (2016) 228–256. doi:10.1016/j.trsl.2015.08.011.
- [75] M.E. Cerf, Beta cell dysfunction and insulin resistance, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4 (2013) 1–13. doi:10.3389/fendo.2013.00037.
- [76] Diabetes Prevention Program Research Group, Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin, 346 (2002) 393–403.
- [77] K.-F. Eriksson, F. Lindgård, Prevention of Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise, *Diabetologia*. 34 (1991) 891–898.
- [78] H.B. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, Hu ZX, Lin J, Xiao JZ, Cao HB, Liu PA, Jiang XG, Jiang YY, Wang JP, Zheng H, Zhang H, Bennett PH, Effects of Diet and Exercise in Preventing NIDDM in People With Impaired Glucose Tolerance, *Diabetes Care*. 20 (1997) 537–544.
- [79] L.A. Bazzano, M. Serdula, S. Liu, Prevention of Type 2 Diabetes by Diet and Lifestyle Modification, *J. Am. C.* 24 (2005) 310–319. doi:10.1080/07315724.2005.10719479.
- [80] G. Davì, F. Santilli, C. Patrono, Nutraceuticals in Diabetes and Metabolic Syndrome, *Cardiovasc. Ther.* 28 (2010) 216–226. doi:10.1111/j.1755-5922.2010.00179.x.
- [81] R.A. DeFronzo, Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus, *Ann Intern Med.* 133 (2000) 73–74. doi:200007040-00016 [pii].
- [82] D.M. Nathan, J.B. Buse, M.B. Davidson, E. Ferrannini, R.R. Holman, R. Sherwin, B. Zinman, Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy, *Diabetes Care*. 32 (2009) 193–203. doi:10.2337/dc08-9025.
- [83] D.E. Moller, New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome., *Nature*. 414 (2001) 821–827. doi:10.1038/414821a.
- [84] A.R. Saltiel, J.M. Olefsky, Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes., *Diabetes*. 45 (1996) 1661–1669. doi:10.2337/diabetes.45.12.1661.
- [85] B. Viollet, B. Guigas, N.S. Garcia, J. Leclerc, M. Foretz, F. Andreelli, Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview, *Clin. Sci.* 122 (2012) 253–270. doi:10.1042/CS20110386.
- [86] FAO (Food & Agriculture Organisation), The state of world fisheries and aquaculture, 2018.
- [87] O.R. Peñarubia, Fish Waste Management : Turning fish waste into healthy feed, 2017.

- [88] T. Rustad, I. Storrø, R. Slizyte, Possibilities for the utilisation of marine by-products, *Int. J. Food Sci. Technol.* 46 (2014) 2001–2014. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x.
- [89] V. Venugopal, F. Shahidi, Structure and composition of fish muscle, *Food Rev. Int.* (1996) 37–41.
- [90] G. Wu, Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition, *Amino Acids.* 37 (2009) 1–17. doi:10.1007/s00726-009-0269-0.
- [91] S.K. Tilami, S. Sampels, Reviews in Fisheries Science & Aquaculture Nutritional Value of Fish : Lipids , Proteins , Vitamins , and Minerals, *Rev. Fish. Sci. Aquac.* (2017). doi:10.1080/23308249.2017.1399104.
- [92] V. Venugopal, *Marine Products for Healthcare*, 2009.
- [93] A.G.J. Tacon, M. Metian, Fish Matters : Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global, *Rev. Fish. Sci.* 21 (2013) 22–38. doi:10.1080/10641262.2012.753405.
- [94] M.L. Daviglus, J. Stamler, A.J. Orenstein, A.R. Dyer, K. Liu, P. Greenland, M.K. Molly, D. Morris, R.B. Shekelle, Fish Consumption And The 30-Year Of Fatal Myocardial Infarction, *N. Engl. J. Med.* 336 (1997) 1046–1053.
- [95] H. Fujita, M. Yoshikawa, LKPNM : a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein, *Immunopharmacology.* 44 (1999) 123–127.
- [96] Frédéric Tremblay, C. Lavigne, H. Jacques, A. Marette, Dietary Cod Protein Restores Insulin-Induced Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and GLUT4 Translocation to the T-Tubules in Skeletal Muscle of High-Fat-Fed Obese Rats, *Diabetes Care.* 52 (2003) 29–37.
- [97] V. Ouellet, J. Marois, S.J. Weisnagel, H. Jacques, Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial, *Diabetes Care.* 30 (2007) 2816–2821. doi:10.2337/dc07-0273.
- [98] V. Ouellet, S.J. Weisnagel, J. Marois, J. Bergeron, P. Julien, R. Gougeon, A. Tchernof, B.J. Holub, H. Jacques, Dietary Cod Protein Reduces Plasma C-Reactive Protein in Insulin-Resistant Men and Women, *J. Nutr.* 2008 (2008) 2386–239. doi:10.3945/jn.108.092346.studies.
- [99] Z. Madani, K. Louchami, A. Sener, W.J. Malaisse, D.A.I.T. Yahia, Dietary sardine protein lowers insulin resistance , leptin and TNF-  $\alpha$  and beneficially affects adipose tissue oxidative stress in rats with fructose-induced metabolic syndrome, *Int. J. Mol. Med.* (2012) 311–318. doi:10.3892/ijmm.2011.836.
- [100] C.F. Zhu, H.B. Peng, G.Q. Liu, F. Zhang, Y. Li, Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes, *Nutrition.* 26 (2010) 1014–

1020. doi:10.1016/j.nut.2010.01.011.

- [101] C. Parolini, R. Vik, M. Busnelli, B. Bjørndal, S. Holm, T. Brattelid, S. Manzini, G.S. Ganzetti, F. Dellera, B. Halvorsen, P. Aukrust, C.R. Sirtori, J.E. Nordrehaug, J. Skorve, R.K. Berge, G. Chiesa, A salmon protein hydrolysate exerts lipid-independent anti-atherosclerotic activity in apoE-deficient mice, *PLoS One*. 9 (2014) 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0097598.
- [102] A. Drotningvik, S.A. Mjøs, D.M. Pampanin, R. Slizyte, A. Carvajal, T. Remman, I. Høgøy, O.A. Gudbrandsen, Dietary fish protein hydrolysates containing bioactive motifs affect serum and adipose tissue fatty acid compositions, serum lipids, postprandial glucose regulation and growth in obese Zucker fa/fa rats, *Br. J. Nutr.* 116 (2016) 1336–1345. doi:10.1017/s0007114516003548.
- [103] C.H. Hsieh, T.Y. Wang, C.C. Hung, M.C. Chen, K.C. Hsu, Improvement of glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats by Atlantic salmon skin gelatin hydrolysate as the dipeptidyl-peptidase IV inhibitor, *Food Funct.* 6 (2015) 1887–1892. doi:10.1039/c5fo00124b.
- [104] W.J. Fu, T.E. Haynes, R. Kohli, J. Hu, W. Shi, T.E. Spencer, R.J. Carroll, C.J. Meininger, G. Wu, Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats., *J. Nutr.* 135 (2005) 714–21. doi:10.1093/jn/135.4.714.
- [105] G. Wu, J.K. Collins, P. Perkins-Veazie, M. Siddiq, K.D. Dolan, K.A. Kelly, C.L. Heaps, C.J. Meininger, Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats., *J. Nutr.* 137 (2007) 2680–5. doi:10.1093/jn/137.12.2680.
- [106] R. Kohli, C.J. Meininger, T.E. Haynes, W. Yan, J.T. Self, G. Wu, Dietary l-Arginine Supplementation Enhances Endothelial Nitric Oxide Synthesis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Nutrient Metab.* 134 (2004) 600–608. doi:10.1093/jn/134.3.600.
- [107] G. Wu, F.W. Bazer, T.A. Davis, S.W. Kim, P. Li, J. Marc Rhoads, M. Carey Satterfield, S.B. Smith, T.E. Spencer, Y. Yin, Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease, *Amino Acids*. 37 (2009) 153–168. doi:10.1007/s00726-008-0210-y.
- [108] C. Clemmensen, A.N. Madsen, S. Smajilovic, B. Holst, H. Bräuner-Osborne, l-Arginine improves multiple physiological parameters in mice exposed to diet-induced metabolic disturbances, *Amino Acids*. 43 (2012) 1265–1275. doi:10.1007/s00726-011-1199-1.
- [109] F. Franconi, A. Loizzo, G. Ghirlanda, G. Seghieri, Taurine supplementation and diabetes mellitus., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 9 (2006) 32–36. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L43655260%0Ahttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=13631950&id=doi:&atitle=Taurine+supplementation+and+diabetes+mellitus.&stitle=Curr+Opin+Clin>

+Nutr+Metab+Care&title=Curren.

- [110] Q. Di Wu, J.H. Wang, F. Fennessy, H.P. Redmond, D. Boucher-Hayes, Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis, *Am. J. Physiol. Physiol.* 277 (1999) C1229–C1238. doi:10.1152/ajpcell.1999.277.6.c1229.
- [111] S.W. Schaffer, J. Azuma, M. Mozaffari, Role of antioxidant activity of taurine in diabetes, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 87 (2009) 275–286. doi:10.1139/y09-013.
- [112] S. Angeles, G. Blancas, F.J. Alarcon-Aguilar, J. Almanza-Perez, M. Cruz, R. Garcia-Macedo, R. Roman, Glycine regulates the production of pro-inflammatory cytokines in lean and monosodium glutamate-obese mice, *Eur. J. Pharmacol.* 599 (2008) 152–158. doi:10.1016/j.ejphar.2008.09.047.
- [113] C. Roblet, M.J. Akhtar, S. Mikhaylin, G. Pilon, T. Gill, A. Marette, L. Bazinet, Enhancement of glucose uptake in muscular cell by peptide fractions separated by electrodialysis with filtration membrane from salmon frame protein hydrolysate, *J. Funct. Foods.* 22 (2016) 337–346. doi:10.1016/j.jff.2016.01.003.
- [114] M. Perreault, A. Marette, Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle, *Nat. Med.* 7 (2001) 1138–1143. doi:10.1038/nm1001-1138.
- [115] S. Saadi, N. Saari, F. Anwar, A. Abdul Hamid, H.M. Ghazali, Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 80–116. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.003.
- [116] S.K. Kim, I. Wijesekara, Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review, *J. Funct. Foods.* 2 (2010) 1–9. doi:10.1016/j.jff.2010.01.003.
- [117] M. Fountoulakis, H.-W. Lahm, Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins, *J. Chromatogr. A.* 826 (1998) 109–134. doi:10.1016/S0021-9673(98)00721-3.
- [118] S. He, C. Franco, W. Zhang, Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP), *Food Res. Int.* 50 (2013) 289–297. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.031.
- [119] E.B.-M. Daliri, D.H. Oh, B.H. Lee, Bioactive Peptides, *Foods.* (2017) 1–21. doi:10.3390/foods6050032.
- [120] J. Christensen, E. Dudley, J. A. Pederson, J. Steele, Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria., *Antonie Van Leeuwenhoek.* 76 (1999) 217–246. doi:10.1023/A:1002001919720.
- [121] J.E. Ahn, S.Y. Park, A. Atwal, B.F. Gibbs, B.H. Lee, Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from whey fermented by lactobacillus species, *J.*

Food Biochem. 33 (2009) 587–602. doi:10.1111/j.1745-4514.2009.00239.x.

- [122] E.B.M. Daliri, B.H. Lee, D.H. Oh, Current Perspectives on Antihypertensive Probiotics, *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 9 (2017) 91–101. doi:10.1007/s12601-016-9241-y.
- [123] P.A. Harnedy, R.J. Fitzgerald, In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmata* protein hydrolysates, *J. Appl. Phycol.* 25 (2013) 1793–1803. doi:10.1007/s10811-013-0017-4.
- [124] N.R.A. Halim, H.M. Yusof, N.M. Sarbon, Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review, *Trends Food Sci. Technol.* 51 (2016) 24–33. doi:10.1016/j.tifs.2016.02.007.
- [125] H.G. Kristinsson, Functional and bioactive peptides from hydrolyzed aquatic food proteins, *Mar. Nutraceuticals Funct. Foods.* (2007) 229–246.
- [126] D. Agyei, M.K. Danquah, Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 272–277. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.001.
- [127] M.K. Danquah, D. Agyei, Pharmaceutical applications of bioactive peptides, *OA Biotechnol.* 1 (2012) 1–7.
- [128] R. Przybylski, Stratégie de production, de fractionnement et de valorisation du peptide antimicrobien  $\alpha$ 137 - 141 à partir de l' hémoglobine et du cruor bovins, 2016.
- [129] D. Agyei, C.M. Ongkudon, C. Yi, A.S. Chan, M.K. Danquah, Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides, *Food Bioprod. Process.* 98 (2016) 244–256. doi:10.1016/j.fbp.2016.02.003.
- [130] S. Suwal, Fractionation of Peptides from Protein Hydrolysate by Electrodialysis with Filtration Membrane : Process optimization, Fouling characterization and Control, Laval, Québec, 2015.
- [131] A. Saxena, B.P. Tripathi, M. Kumar, V.K. Shahi, Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins : An overview, *Adv. Colloid Interface Sci.* 145 (2009) 1–22. doi:10.1016/j.cis.2008.07.004.
- [132] G. Brans, C.G.P.H. Schroën, R.G.M. Van Der Sman, R.M. Boom, Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges, *J. Memb. Sci.* 243 (2004) 263–272. doi:10.1016/j.memsci.2004.06.029.
- [133] L. Bazinet, Laurent; Firdaus, Separation of Bioactive Peptides by Membrane Processes: Technologies and Devices, *Recent Pat. Biotechnol.* Volume 7 (2013) 9–27. doi:10.2174/1872208311307010003.
- [134] H. Strathmann, Electrodialysis, a mature technology with a multitude of new

applications, Desalination. 264 (2010) 268–288. doi:10.1016/j.desal.2010.04.069.

- [135] E. Korngold, F. de Körösy, R. Rahav, M.F. Taboch, Fouling of anionselective membranes in electrodialysis, Desalination. 8 (1970) 195–220. doi:10.1016/S0011-9164(00)80230-1.
- [136] E. Drioli, L. Giorno, Biocatalytic membrane reactors: applications in biotechnology and the pharmaceutical industry, CRC Press, 1998.
- [137] L. Bazinet, Electrodialytic phenomena and their applications in the dairy industry: A review (vol 44, pg 525, 2004), Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45 (2005) 307–326. doi:Doi 10.1080/10408690490489279.
- [138] S. Mikhaylin, Impact des champs électriques pulsés à courte durée d’impulsion/pause sur le colmatage des membranes en cours de procédés électromembranaires: mécanismes d’action et influence sur les performances des procédés, Université Laval, 2015.
- [139] N. Lemay, S. Mikhaylin, L. Bazinet, Voltage spike and electroconvective vortices generation during electrodialysis under pulsed electric field: Impact on demineralization process efficiency and energy consumption, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 52 (2019) 221–231. doi:10.1016/j.ifset.2018.12.004.
- [140] L. Bazinet, J. Amiot, J.-F. Poulin, D. Labbe, A. Tremblay, Process and system for separation of organic charged compounds, (2005).
- [141] J.F. Poulin, J. Amiot, L. Bazinet, Simultaneous separation of acid and basic bioactive peptides by electrodialysis with ultrafiltration membrane, J. Biotechnol. 123 (2006) 314–328. doi:10.1016/j.biote.2005.11.016.
- [142] C.R. Roblet, Fractionnement d’un hydrolysat de protéines de soya. Comparaison des technologies baro-membranaire (UF) et électro-membranaire (EDUF) pour la collecte de fractions bioactives., Université Laval, Québec, 2012.
- [143] M.E. Langevin, C. Roblet, C. Moresoli, C. Ramassamy, L. Bazinet, Comparative application of pressure- and electrically-driven membrane processes for isolation of bioactive peptides from soy protein hydrolysate, J. Memb. Sci. 403–404 (2012) 15–24. doi:10.1016/j.memsci.2012.02.005.
- [144] J.F. Poulin, J. Amiot, L. Bazinet, Improved peptide fractionation by electrodialysis with ultrafiltration membrane: Influence of ultrafiltration membrane stacking and electrical field strength, J. Memb. Sci. 299 (2007) 83–90. doi:10.1016/j.memsci.2007.04.024.
- [145] J.F. Poulin, J. Amiot, L. Bazinet, Impact of feed solution flow rate on peptide fractionation by electrodialysis with ultrafiltration membrane, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 2007–2011. doi:10.1021/jf072813d.

- [146] N. Ndiaye, Y. Pouliot, L. Saucier, L. Beaulieu, L. Bazinet, Electroseparation of bovine lactoferrin from model and whey solutions, *Sep. Purif. Technol.* 74 (2010) 93–99. doi:10.1016/j.seppur.2010.05.011.
- [147] A. Doyen, E. Husson, L. Bazinet, Use of an electrodialytic reactor for the simultaneous b-lactoglobulin enzymatic hydrolysis and fractionation of generated bioactive peptides, *Food Chem.* 136 (2013) 1193–1202. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.018.
- [148] L. Firdaous, P. Dhulster, J. Amiot, A. Gaudreau, D. Lecouturier, R. Kapel, F. Lutin, L.P. Vézina, L. Bazinet, Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *J. Memb. Sci.* 329 (2009) 60–67. doi:10.1016/j.memsci.2008.12.012.
- [149] L. Firdaous, P. Dhulster, J. Amiot, A. Doyen, F. Lutin, L.P. Vézina, L. Bazinet, Investigation of the large-scale bioseparation of an antihypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process, *J. Memb. Sci.* 355 (2010) 175–181. doi:10.1016/j.memsci.2010.03.018.
- [150] A. Doyen, C.C. Udenigwe, P.L. Mitchell, A. Marette, R.E. Aluko, L. Bazinet, Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Food Chem.* 145 (2014) 66–76. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.108.
- [151] G. Cecile, U. Marie, V. Perreault, L. Henaux, V. Carnovale, Impact of a high hydrostatic pressure pretreatment on the separation of bioactive peptides from flaxseed protein hydrolysates by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.* 211 (2019) 242–251. doi:10.1016/j.seppur.2018.09.063.
- [152] C. Roblet, J. Amiot, C. Lavigne, A. Marette, M. Lessard, J. Jean, C. Ramassamy, C. Moresoli, L. Bazinet, Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes, *Food Res. Int.* 46 (2012) 237–249. doi:10.1016/j.foodres.2011.11.014.
- [153] R. He, A.T. Girgih, E. Rozoy, L. Bazinet, X.R. Ju, R.E. Aluko, Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Food Chem.* 197 (2016) 1008–1014. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.081.
- [154] R. Durand, E. Fraboulet, A. Marette, L. Bazinet, Simultaneous double cationic and anionic molecule separation from herring milt hydrolysate and impact on resulting fraction bioactivities, *Sep. Purif. Technol.* 210 (2019) 431–441. doi:10.1016/j.seppur.2018.08.017.
- [155] S. Suwal, C. Roblet, A. Doyen, J. Amiot, L. Beaulieu, J. Legault, L. Bazinet, Electrodialytic separation of peptides from snow crab by-product hydrolysate: Effect of cell configuration on peptide selectivity and local electric field, *Sep. Purif. Technol.* 127 (2014) 29–38. doi:10.1016/j.seppur.2014.02.018.

- [156] S. Suwal, C. Roblet, J. Amiot, A. Doyen, L. Beaulieu, J. Legault, L. Bazinet, Recovery of valuable peptides from marine protein hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membrane: impact of ionic strength, *Food Res. Int.* 65 (2014) 407–415. doi:10.1016/j.foodres.2014.06.031.
- [157] A. Doyen, L. Beaulieu, L. Saucier, Y. Pouliot, L. Bazinet, Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by-products hydrolysate after separation by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Sep. Purif. Technol.* 78 (2011) 321–329. doi:10.1016/j.seppur.2011.01.037.
- [158] A. Doyen, L. Saucier, L. Beaulieu, Y. Pouliot, L. Bazinet, Electroseparation of an antibacterial peptide fraction from snow crab by-products hydrolysate by electrodialysis with ultrafiltration membranes, *Food Chem.* 132 (2012) 1177–1184. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.059.
- [159] R. Liu, W. Zheng, J. Li, L. Wang, H. Wu, X. Wang, L. Shi, Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of *Macrae veneriformis* by UHPLC-Q-TOF mass spectrometry, *Food Chem.* 167 (2015) 484–489. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.113.
- [160] M.C. Menet, Principes de la spectrométrie de masse, *Rev. Francoph. Des Lab.* 2011 (2011) 41–53. doi:10.1016/S1773-035X(11)71211-4.
- [161] E. Costa, G. Menschaert, W. Luyten, Peptide identification using tandem mass spectrometry data, *Dtai.Cs.Kuleuven.Be.* 6 (2011) e22260. doi:10.1371/journal.pone.0022260.
- [162] C. Cariello, L.T. Lovey, La spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique, 2012.
- [163] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons, *Anal. Chem.* 2301 (1988) 2299–2301. doi:10.1007/s11665-016-1996-5.
- [164] Electrospray principle and applications, (2016). <http://mass-spectro.com/electrospray> (accessed March 13, 2019).
- [165] Quadrupole mass analyzer, (2016). <http://mass-spectro.com/quadrupole-mass-analyzer> (accessed March 14, 2019).
- [166] M. Kinter, N.E. Sherman, Fundamental Mass, in: *Protein Seq. Identif. Using Tandem Mass Spectrom.*, 2005: pp. 29–63.
- [167] Analyseur temps de vol (TOF), (2016). <http://mass-spectro.com/analyseur-temps-de-vol> (accessed March 14, 2019).
- [168] M. Kinter, N.E. Sherman, Collisionally Induced Dissociation of Protonated Peptide Ions and the Interpretation of Product Ion Spectra, in: *Protein Seq. Identif. Using*

Tandem Mass Spectrom., 2005: pp. 64–116.

- [169] Y. Liu, Algorithms for Peptide Identification from Mixture Tandem Mass Spectra, The University of Western Ontario, 2015. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/3151>.
- [170] T. Matsui, T. Oki, Y. Osajima, Isolation and Identification of Peptidic α-Glucosidase Inhibitors Derived from Sardine Muscle Hydrolyzate, (1999) 6–10.
- [171] E.C.Y. Li-chan, S. Hunag, C. Jao, K. Ho, K. Hsu, Peptides Derived from Atlantic Salmon Skin Gelatin as Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitors, *J. Agric. Food Chem.* (2012) 1–6.
- [172] S. Huang, C. Jao, K. Ho, K. Hsu, Peptides Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates, *Peptides.* 35 (2012) 114–121. doi:10.1016/j.peptides.2012.03.006.
- [173] P.A. Harnedy, M.B.O. Keeffe, R.J. Fitzgerald, Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*, *Food Chem.* 172 (2015) 400–406. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.083.
- [174] T. Hatanaka, K. Kawakami, M. Uraji, Inhibitory effect of collagen-derived tripeptides on dipeptidylpeptidase-IV activity, *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* (2014) 1–6. doi:10.3109/14756366.2013.858143.
- [175] C.-B. Ahn, Y.S. Cho, J.Y. Je, Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate, *Food Chem.* 168 (2015) 151–156. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.112.
- [176] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, Estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care.* 27 (2004) 1047–1053. doi:10.2337/diacare.27.5.1047 Diabetes Care May 2004 vol. 27 no. 5 1047-1053.
- [177] A. Nkondjock, O. Receveur, Fish-seafood consumption, obesity, and risk of type 2 diabetes: an ecological study., *Diabetes Metab.* 29 (2003) 635–642. doi:10.1016/S1261-3636(07)70080-0.
- [178] H. Wergedahl, B. Liaset, O.A. Gudbrandsen, E. Lied, M. Espe, Z. Muna, S. Mørk, R.K. Berge, Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats., *J. Nutr.* 134 (2004) 1320–1327.
- [179] B. Liaset, L. Madsen, Q. Hao, G. Criales, G. Mellgren, H. Marschall, P. Hallenborg, M. Espe, L. Frøyland, K. Kristiansen, Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats, *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1791 (2009) 254–262. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.016.
- [180] C. Sze, K. Lin, A. Pfaltzgra, L. Herrero-davila, E.B. Mubofu, S. Abderrahim, J.H. Clark, A.A. Koutinas, N. Kopsahelis, K. Stamatelatou, F. Dickson, S. Thankappan,

Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective, *Green Chem.* 6 (2013) 426–464. doi:10.1039/c2ee23440h.

- [181] A.A. Koutinas, A. Vlysidis, D. Pleissner, N. Kopsahelis, I.L. Garcia, I.K. Kookos, S. Papanikolaou, T.H. Kwanb, C.S.K. Lin, Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers, *Green Chem.* 43 (2014) 2587–2627. doi:10.1039/c3cs60293a.
- [182] K. Hashimoto, K. Sato, Y. Nakamura, K. Ohtsuki, Development of a large-scale (50 L) apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in enzymatic hydrolysates of food proteins, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3801–3806. doi:10.1021/jf047967x.
- [183] K. Hashimoto, K. Sato, Y. Nakamura, K. Ohtsuki, Development of continuous type apparatus for ampholyte-free isoelectric focusing (autofocusing) of peptides in protein hydrolysates, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 650–655. doi:10.1021/jf0520286.
- [184] S. Suwal, C. Roblet, J. Amiot, L. Bazinet, Presence of free amino acids in protein hydrolysate during electroseparation of peptides: Impact on system efficiency and membrane physicochemical properties, *Sep. Purif. Technol.* 147 (2015) 227–236. doi:10.1016/j.seppur.2015.04.014.
- [185] C.C. Udenigwe, A.P. Adebiyi, A. Doyen, H. Li, L. Bazinet, R.E. Aluko, Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein, *Food Chem.* 132 (2012) 468–475. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.024.
- [186] V.Y. Koumfig Noudou, S. Suwal, J. Amiot, S. Mikhaylin, L. Beaulieu, L. Bazinet, Simultaneous electroseparation of anionic and cationic peptides: Impact of feed peptide concentration on migration rate, selectivity and relative energy consumption, *Sep. Purif. Technol.* 157 (2016) 53–59. doi:10.1016/j.seppur.2015.11.020.
- [187] M. Aider, S. Brunet, L. Bazinet, Effect of pH and cell configuration on the selective and specific electrodialytic separation of chitosan oligomers, *Sep. Purif. Technol.* 63 (2008) 612–619. doi:10.1016/j.seppur.2008.07.018.
- [188] D. Giro, N. Sevillano, R. Salto, A. Haidour, M. Manzano, R. Rueda, M. Lo, Salacia oblonga extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rat myotubes : Role of mangiferin q, 28 (2009) 565–574. doi:10.1016/j.clnu.2009.04.018.
- [189] G. Zhou, R. Myers, Y. Li, Y. Chen, X. Shen, J. Fenyk-melody, M. Wu, J. Ventre, T. Doeber, N. Fujii, N. Musi, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, D.E. Moller, Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, 108 (2001) 1167–1174. doi:10.1172/JCI200113505.Introduction.
- [190] G. Pilon, P. Dallaire, A. Marette, Inhibition of Inducible Nitric-oxide Synthase by

Activators of AMP-activated Protein Kinase, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20767–20774. doi:10.1074/jbc.M401390200.

- [191] T.M. Marteau, G.J. Hollands, P.C. Fletcher, Changing Human Behavior to Targeting Automatic Processes, *1060* (2012) 1492–1496.
- [192] WHO, Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020, 2013.
- [193] E.C.Y. Li-chan, Bioactive peptides and protein hydrolysates : research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients, *Curr. Opin. Food Sci.* 1 (2015) 28–37. doi:10.1016/j.cofs.2014.09.005.
- [194] M. Del Mar Contreras, I. López-Expósito, B. Hernández-Ledesma, M. Ramos, I. Recio, Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food-derived bioactive peptides, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 981–994.
- [195] L. Henaux, J. Thibodeau, G. Pilon, T. Gill, A. Marette, How Charge and Triple Size-Selective Membrane Separation of Peptides from Salmon Protein Hydrolysate Orientate their Biological Response on Glucose Uptake, *Int. J. Mol. Sci.* (2019) 1–15.
- [196] R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, The metabolic syndrome, *Lancet.* 365 (2005) 1415–1428. doi:10.1016/S0140-6736(05)66378-7.
- [197] D. Martinez-Maqueda, B. Miralles, I. Recio, B. Hernandez-Ledesma, Food & Function Antihypertensive peptides from food proteins : a review, *Food Funct.* 3 (2012) 350–361. doi:10.1039/c2fo10192k.
- [198] www.ncbi.nlm.nih.gov, (n.d.).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=salmonidae> (accessed July 11, 2018).
- [199] R. Przybylski, L. Firdaous, G. Châtaigné, P. Dhulster, N. Nedjar, Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by- product and its potential application on meat as preservative, *Food Chem.* 211 (2016) 306–313. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.074.
- [200] T. Lafarga, M. Hayes, Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients, *Meat Sci.* 98 (2014) 227–239. doi:10.1016/j.meatsci.2014.05.036.
- [201] V. Ferraro, I.B. Cruz, R.F. Jorge, F.X. Malcata, M.E. Pintado, P.M.L. Castro, Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review, *Food Res. Int.* 43 (2010) 2221–2233. doi:10.1016/j.foodres.2010.07.034.
- [202] A. Pihlanto-Leppälä, Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides, *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2000) 347–356. doi:10.1016/S0924-2244(01)00003-6.

- [203] G.B. Fields, R.L. Noble, Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids, *Int. J. Pept. Protein Res.* 35 (1990) 161–214. doi:10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x.
- [204] R. Hammami, A. Gomaa, E. Biron, I. Fliss, M. Subirade, F. Bédard, Lasso-inspired peptides with distinct antibacterial mechanisms, *Amino Acids*. 47 (2015) 417–428. doi:10.1007/s00726-014-1877-x.
- [205] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides synthesised on 1-Chlorotriyl Chloride Resin, *J. Chem. Soc.* 0 (1994) 2559–2560.
- [206] Agilent, Agilent G2721AA/G2733AA Spectrum Mill MS Proteomics Workbench, 2012.
- [207] R. Pangestuti, S. Kim, Bioactive Peptide of Marine Origin for the Prevention and Treatment of Non-Communicable Diseases, (2017) 1–23. doi:10.3390/md15030067.
- [208] Y.-H. Liao, M. Kleinert, W. Wang, J.L. Ivy, An Amino Acid Mixture Enhances Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Isolated Rat Epitrochlearis Muscle, *Med. Sci. Sport. Exerc.* 43 (2011) 591. doi:10.1249/01.mss.0000401631.72916.d6.
- [209] C.P. Miinea, H. Sano, S. Kane, E. Sano, M. Fukuda, J. Peränen, W.S. Lane, G.E. Lienhard, AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain, *Biochem. J.* 391 (2005) 87–93. doi:10.1042/bj20050887.
- [210] C. Lammi, C. Zanoni, A. Arnoldi, Three peptides from soy glycinin modulate glucose metabolism in human hepatic HepG2 cells, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 27362–27370. doi:10.3390/ijms161126029.
- [211] S. Turban, C. Stretton, O. Drouin, C.J. Green, M.L. Watson, A. Gray, F. Ross, L. Lantier, B. Viollet, D.G. Hardie, A. Marette, H.S. Hundal, Defining the Contribution of AMP-activated Protein Kinase (AMPK) and Protein Kinase C (PKC) in Regulation of Glucose Uptake by Metformin in Skeletal Muscle Cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 20088–20099. doi:10.1074/jbc.m111.330746.
- [212] B. Brunmair, K. Staniek, F. Gras, N. Scharf, A. Althaym, R. Clara, M. Roden, E. Gnaiger, H. Nohl, W. Waldhäusl, C. Fürnsinn, Thiazolidinediones, Like Metformin, Inhibit Respiratory Complex I, Diabetes. 53 (1985) 1052–1059. doi:10.2337/DIABETES.53.4.1052.
- [213] K. Peyrollier, E. Hajduch, A.S. Blair, R. Hyde, H.S. Hundal, L-Leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells : evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation, *Biochem. J.* 350 (2000) 361–368.

- [214] M.M. Orifugi, J.K. Oga, K.K. Awanaka, M.H. Iguchi, Branched-Chain Amino Acid-Containing Dipeptides , Identified from Whey Protein Hydrolysates , Stimulate Glucose Uptake Rate in L6 Myotubes and Isolated Skeletal Muscles, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 55 (2009) 81–86.
- [215] C. Schmitz-Peiffer, T.J. Biden, Protein kinase C function in muscle, liver, and  $\beta$ -cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes, *Diabetes*. 57 (2008) 1774–1783. doi:10.2337/db07-1769.
- [216] F. Shahidi, A. Chandrasekara, Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review, *J. Funct. Foods*. 5 (2013) 570–581. doi:10.1016/j.jff.2013.02.004.
- [217] M. Darewicz, B. Dziuba, P. Minkiewicz, J. Dziuba, The preventive potential of milk and colostrum proteins and protein fragments, *Food Rev. Int.* 27 (2011) 357–388. doi:10.1080/87559129.2011.563396.
- [218] G.M. Pauletti, S. Gangwar, G.T. Knipp, M.M. Nerurkar, F.W. Okumu, K. Tamura, T.J. Siahaan, R.T. Borchardt, Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs, *J. Control. Release*. 41 (1996) 3–17. doi:10.1016/0168-3659(96)01351-1.
- [219] K.A. Witt, T.P. Davis, CNS drug delivery: Opioid peptides and the blood-brain barrier, *Am. Assoc. Pharm. Sci. J.* 8 (2006) E76–E88. doi:10.1007/978-0-387-76678-2\_30.
- [220] N. Salamat-Miller, T.P. Johnston, Current strategies used to enhance the paracellular transport of therapeutic polypeptides across the intestinal epithelium, *Int. J. Pharm.* 294 (2005) 201–216. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.01.022.