

Sommaire

Liste des tableaux	i
Liste des figures	iii
Liste des abréviations	v
Introduction	1

Revue bibliographique

I. Hydrolysats et peptides bioactifs : synthèse, caractéristiques et propriétés.....	4
I.1. Obtention d'hydrolysats et de peptides bioactifs	4
I.1.1. Hydrolyse chimique	4
I.1.2. Autolyse et fermentation	5
I.1.3. Hydrolyse enzymatique contrôlée.....	5
I.2. Caractéristiques des peptides bioactifs et facteurs influençant leurs propriétés	5
I.2.1. Caractéristiques des hydrolysats et des peptides bioactifs	5
I.2.2. Facteurs influençant la qualité des hydrolysats et des peptides bioactifs.....	8
II. Certaines propriétés nutraceutiques de protéines et de peptides d'origine alimentaire	10
II.1. Propriété hypocholestérolémiante d'hydrolysats et de peptides de légumineuses.....	11
II.1.1. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires et de l'hypercholestérolémie.....	11
II.1.2. Athérosclérose ; Élément clé des MCV	14
II.1.3. Rôle hypocholestérolémiant des hydrolysats de protéines de légumineuses	16
II.2. Propriété antioxydante d'hydrolysats et de peptides de légumineuses	19
II.2.1. Qu'est-ce qu'un état de stress oxydant.....	19
II.2.2. Les radicaux libres	19
II.2.3. Implication du stress oxydant dans l'athérosclérose	21
II.2.4. Les différents systèmes de défense antioxydante.....	22
II.2.5. Rôle antioxydant de protéines et d'hydrolysats de légumineuses	24
III. Mécanismes d'action des peptides.....	25
III.1. Mécanismes d'action <i>in vitro</i>	25
III.2. Mode d'action des peptides <i>in vivo</i>	27
IV. Fenugrec	30

Matériel et Méthodes

I. Préparation du matériel biologique.....	32
I.1. Matière première	32
I.2. Préparation de l'isolat de protéines de fenugrec	32
I.3. Préparation des hydrolysats des protéines de fenugrec	32
II. Analyse qualitative des protéines et des hydrolysats.....	33
II.1. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes en gel polyacrylamide.....	33
II.2. Analyse de la composition chimique	34

II.3. Analyse de la composition en acides aminés	34
II.4. Fractionnement des hydrolysats de fenugrec	35
III. Activité antioxydante des protéique et des hydrolysats de fenugrec <i>in vitro</i>	36
III.1. Activité antiradicalaire	36
III.2. Test du pouvoir réducteur (<i>ferric reducing antioxidant power ; FRAP</i>)	37
III.3. Test de protection contre la décoloration du β -carotène	37
III.4. Protection contre l'oxydation de l'ADN	38
IV. Propriétés des protéines et des hydrolysats de fenugrec <i>in vivo</i>	38
IV.1. Animaux et protocole nutritionnel	38
IV.2. Prélèvement du sang et des organes.....	40
IV.3. Séparation des lipoprotéines	40
IV.4. Dosages biochimiques au niveau sérique.....	40
IV.4.1. Mesure des activités transaminases.....	40
IV.4.2. Teneurs sériques en glucose, en acide urique et en albumine	41
IV.5. Dosage des lipides sériques, hépatiques et fécaux	41
IV.5.1. Extraction des lipides tissulaires	41
IV.5.2. Dosage des lipides.....	41
IV.6. Analyse des lipoprotéines	42
IV.6.1. Dosage du cholestérol et des phospholipides au niveau des fractions	42
IV.6.2. Teneurs en apolipoprotéines.....	42
IV.7. Evaluation du statut redox	43
IV.7.1. Préparation des homogénats tissulaires	43
IV.7.2. Teneurs tissulaires en protéines.....	43
IV.7.3. Teneurs en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)	44
IV.7.4. Evaluation de la défense antioxydante	44
a. Propriété antioxydante des HDL	44
b. Dosage des groupements thiols au niveau tissulaire	45
c. Activité Arylestérase (aryldialkylphosphatase ; EC 3.1.8.1)	45
d. Activité Glutathion Réductase (EC 1.6.4.2).....	45
e. Activité Catalase (EC 1.11.1.6).....	45
f. Activité Superoxyde Dismutase (EC 1.15.1.1)	46
V. Analyse statistique.....	46

Résultats

I. Caractérisation de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.....	47
I.1. Cinétique et degré d'hydrolyse	47
I.2. Profil électrophorétique de l'isolat et des hydrolysats des protéines	47
I.3. Répartition des peptides en fonction de leur poids moléculaire.....	49
I.4. Composition chimique et composition en acides aminés	49
II. Propriété antioxydante <i>in vitro</i> de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec	51

II.1. Propriété de piégeage du radical DPPH	51
II.2. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)	53
II.3. Pouvoir inhibiteur de la décoloration du β -carotène	53
II.4. Protection contre la dégradation oxydative de l'ADN	55
III. Propriétés <i>in vivo</i> de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec	55
III.1. Influence de l'apport en isolat et en hydrolysats de protéines de fenugrec sur les rapports nutritionnels, l'évolution du poids corporel et le poids relatif des organes	55
III.2. Paramètres biochimiques sériques	57
III.3. Teneurs sériques en lipides	58
III.4. Répartition du cholestérol et des phospholipides dans les lipoprotéines	58
III.5. Teneurs sériques en apolipoprotéines AI, AIV et B	61
III.6. Rapports d'athérogénicité	61
III.7. Teneurs en lipides du foie et de l'aorte	62
III.8. Activité antioxydante <i>in vivo</i> de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec	63
III.8.1. Propriété antioxydante des HDL	63
III.8.2. Activité arylestérase sérique.....	64
III.8.3. Mesure du niveau d'oxydation dans les tissus	64
III.8.4. Défenses antioxydantes au niveau tissulaire	66
a. Teneurs en protéines et en thiols au niveau tissulaire	66
b. Activités des enzymes antioxydantes au niveau tissulaire	67
<i>Discussion</i>	69
<i>Conclusion et perspectives</i>	85
<i>Références bibliographiques</i>	87
<i>Annexe</i>	101

Liste des tableaux

Tableau I.	Mécanismes d'action des acides aminés et importance de leur position dans la séquence peptidique	7
Tableau II.	Exemples d'études mettant en évidence l'effet hypocholestérolémiant des protéines de certaines légumineuses.....	12
Tableau III.	Cibles moléculaires des radicaux libres et conséquences biologiques.....	20
Tableau IV.	Mécanismes d'action des antioxydants non enzymatiques	26
Tableau V.	Composition du régime donné aux rats (g.100 g ⁻¹ de régime)	39
Tableau VI.	Composition chimique des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats.....	47
Tableau VII.	Composition en acides aminés de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.....	50
Tableau VIII.	Teneurs en minéraux de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.....	51
Tableau IX.	Effet de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec sur la prise alimentaire, le rapport d'efficacité nutritionnelle et l'excrétion fécale du cholestérol.	56
Tableau X.	Poids relatif du foie, du cœur et du tissu adipeux chez des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.....	57
Tableau XI.	Paramètres biochimiques sériques et activités des transaminases chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	58
Tableau XII.	Rapport d'athérogénicité chez les rats traités ou non avec l'isolat et les hydrolysats de protéines de fenugrec	62
Tableau XIII.	Teneurs en lipides (par g de tissu) au niveau hépatique et aortique chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	63
Tableau XIV.	Teneurs tissulaires en protéines et en groupement thiols chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	67
Tableau XV.	Activités des enzymes antioxydantes tissulaires chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.....	68
Tableau XVI.	Facteur de dissociation (α) des groupements α -NH ₂ en fonction de la température et du pH selon la fiche technique des enzymes Novozyme®	101
Tableau XVII.	Evolution du degré d'hydrolyse de protéines de fenugrec par Espérase et Purafect.....	101
Tableau XVIII.	Répartition du poids moléculaire des peptides issus de l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec Espérase et Purafect	101
Tableau XIX.	Pouvoir inhibiteur du radical DPPH par les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats	102
Tableau XX.	Pouvoir réducteur de l'ion ferrique par les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats	102
Tableau XXI.	Pouvoir inhibiteur du radical DPPH et pouvoir réducteur des différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec	103

Tableau XXII.	Pouvoir inhibiteur de la décoloration du β -carotène par les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats	103
Tableau XXIII.	Composition détaillée du régime donné aux rats expérimentaux.....	104
Tableau XXIV.	Avantages et désavantages de l'utilisation du rat comme modèle animal pour l'étude de l'hypercholestérolémie	105
Tableau XXV.	Evolution du poids des rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats	105
Tableau XXVI.	Teneurs sériques en différents lipides chez les rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.....	105
Tableau XXVII.	Teneurs en apolipoprotéines B, AI et AIV chez les rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.....	106
Tableau XXVIII.	Teneurs en TBARS au niveau hépatique, cardiaque et de l'aorte chez des rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.....	106
Tableau XXIX.	Propriété antioxydante des HDL isolées de rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.....	106
Tableau XXX.	Activité arylestérase (paraoxonase) sérique chez les rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats	106

Liste des figures

Figure 1. Paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique et la qualité des hydrolysats	9
Figure 2. Influence du choix d'enzyme sur la composition et la qualité des hydrolysats.....	9
Figure 3. Les différentes classes majeures de protéines des légumineuses	11
Figure 4. Risque de survenue d'un premier évènement cardiovasculaire en fonction du pourcentage de réduction de C-LDL	15
Figure 5. Athérogénicité des LDL oxydées	16
Figure 6. Rôle cardioprotecteur des HDL.....	17
Figure 7. Source, métabolisme et devenir des radicaux libres dans les cellules vasculaires	21
Figure 8. Les différents types d'antioxydants.....	23
Figure 9. Mécanismes d'action des peptides, hydrolysats et protéines hypocholestérolémiants.....	28
Figure 10. Exemples de peptides bioactifs de certaines légumineuses et leurs mécanismes d'action hypocholestérolémiante.....	29
Figure 11. Diagramme représentatif des différentes étapes de fractionnement des hydrolysats des protéines de fenugrec par ultrafiltrations successives	36
Figure 12. Courbe de la cinétique d'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect.....	48
Figure 13. Profil électrophorétique sur SDS-PAGE de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec	48
Figure 14. Distribution, exprimé en pourcentage pondéral, des protides issus de l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect.....	49
Figure 15. Pouvoir inhibiteur du radical DPPH par l'isolat et les hydrolysats de protéines de fenugrec	52
Figure 16. Pouvoir inhibiteur du radical DPPH par les différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec	52
Figure 17. Pouvoir réducteur de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.....	53
Figure 18. Pouvoir réducteur des différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec	54
Figure 19. Pouvoir inhibiteur de la décoloration du β -carotène par l'isolat et les hydrolysats de protéines de fenugrec	54
Figure 20. Pouvoir protecteur de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec contre la dégradation oxydative de l'ADN	55
Figure 21. Evolution du poids des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	56
Figure 22. Teneurs en lipides sériques chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.....	59

Figure 23. Répartition du cholestérol et des phospholipides dans les différentes fractions des lipoprotéines des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	60
Figure 24. Teneurs en apolipoprotéines AI, AIV et B chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	61
Figure 25. Propriété antioxydante des HDL des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.....	64
Figure 26. Activité arylestérase (paraoxonase) sérique chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	65
Figure 27. Teneurs en TBARS au niveau hépatique, cardiaque et aortique chez des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.....	65
Figure 28. Corrélation entre les teneurs en TBARS dans l'aorte, la cholestérolémie et les phospholipides de l'aorte chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec	66
Figure 29. Chromatogramme des protéines dans l'éluât après fractionnement, par FPLC, des lipoprotéines de deux pools de sérum de rats témoins et rats IPF.....	107

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
ALAT	Alanine aminotransférase
AOx	Antioxydant
Apo	Apolipoprotéine
ASAT	Aspartate aminotransférase
EC	Esters de cholestérol
CI ₅₀	Concentration inhibitrice de 50%
CL	Cholestérol libre
CT	Cholestérol total
DCFH (-DA)	2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine (diacétate)
DH	Degré d'hydrolyse
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
ERN	Espèces réactives de l'azote
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	pouvoir réducteur du fer ferreux (Ferric reducing antioxidant power)
GPx	Glutathion peroxydase
GSSG-Red	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
HC	Hypercholestérolémique (rat) / hypercholestérolémiant (régime)
HDL	Lipoprotéines de haute densité (high density lipoproteins)
HMGCoA	hydroxyméthylglutaryl coenzyme A
LDL	Lipoprotéines de faible densité (low density lipoproteins)
LDL-R	Récepteurs de LDL
MCV	Maladies cardiovasculaires
MICS	Multiple Indicator Cluster Survey
PFHE	Protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase
PFHP	Protéines de fenugrec hydrolysées avec Purafect
IPF	Isolat de protéines de fenugrec
PL	Phospholipide
PON1	Paraoxonase
RL	Radical libre
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
-SH	Thiols
SOD	Superoxyde dismutase
T	Témoin
TAHINA	Epidemiological Transition and Health Impact in North Africa
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TG	Triglycérides
TNB	Acide thionitrobenzoïque
VLDL	Lipoprotéines de très faible densité (very low density lipoproteins)

Introduction

Introduction

Dans certaines régions du monde, les légumineuses occupent une place importante dans l'alimentation humaine. Leur teneur élevée en protéines leur acquiert la caractéristique d'être un bon substituant des protéines animales si elles sont associées aux céréales. Dans certaines sociétés encore, les légumineuses sont même l'unique source de protéines (Bouchenak et Lamri-Senhadj, 2013 ; Malaguti *et al.*, 2014).

Les légumineuses sont aussi considérées comme aliments nutraceutiques. En effet, il existe plusieurs études qui corrélient leur consommation régulière avec la diminution du risque de certaines maladies (Duranti, 2006 ; Bazzano *et al.*, 2011). Il a été rapporté que plusieurs molécules constituant ces légumineuses (isoflavones, fibres, phytostérols) pouvaient être responsables d'un effet cardioprotecteur. Toutefois, ce sont les protéines qui restent les mieux étudiées pour cet effet (Xiao, 2008 ; Bouchenak et Lamri-Senhadj, 2013 ; Garcia *et al.*, 2013 ; Sánchez et Vázquez, 2017).

A côté de leur rôle nutritionnel, les protéines de légumineuses peuvent également être considérées comme une source potentielle de peptides biologiquement actifs (Lemes *et al.*, 2016 ; Daliri *et al.*, 2017). Ces peptides bioactifs sont des séquences d'acides aminés (2-50 acides aminés) encryptées dans la molécule protéique et qui demeurent inactives jusqu'à ce qu'elles soient libérées par digestion gastro-intestinale ou par hydrolyse *in vitro* (Zhong *et al.*, 2007b ; Yust *et al.*, 2012 ; Nasri, 2017). Ces molécules représentent des substances alternatives et prometteuses pour la santé humaine comme pour les industries agroalimentaires (Sarmadi et Ismail, 2010 ; Garcia *et al.*, 2013). Parmi les nombreuses propriétés attribuées aux hydrolysats et aux peptides bioactifs, on distingue les propriétés hypolipémiantes, antioxydantes et cardioprotectrices (Adams *et al.*, 2004 ; Wilson *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2008a ; León-Espinoza *et al.*, 2016 ; Yahia *et al.*, 2017 ; Zhang *et al.*, 2018).

Parmi les protéines et les hydrolysats de légumineuses qui ont suscitées le plus d'intérêt, ce sont ceux du soja qui sont les mieux étudiés (Pasupuleti et Braun, 2008 ; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2014 ; Gao *et al.*, 2017). Cependant, d'autres légumineuses ont de même fait l'objet de travaux qui s'intéressent à de nouvelles sources de protéines végétales dans le but de satisfaire, d'un côté, les besoins croissants de la société en sources de protéines, et d'un autre côté, rechercher de nouvelles sources de molécules aux propriétés nutraceutiques (Roy *et al.*, 2010), à l'exemple

du pois (Pownall *et al.*, 2010), du pois chiche (Torres-Fuentes *et al.*, 2015 ; Xue *et al.*, 2015), de la lentille (Barbana *et al.*, 2011) et du lupin (Bähr *et al.*, 2013 ; Lammi *et al.*, 2014).

D'autres protéines de légumineuses, telles que celles du fenugrec (*Trigonella foenum graecum*), appelé aussi "*el helba*" en arabe (الحلبة), restent très peu étudiées. En effet, tenant compte de leur richesse en protéines (28%) (El Nasri et El Tinay, 2007), les grains de fenugrec peuvent aussi constituer une source de protéines et de peptides bioactifs. Cette légumineuse est utilisée principalement comme condiment dans la préparation des potages dans le Maghreb, ou même en phytothérapie. Elle est réputée pour ses vertus : hypoglycémiant, antidiabétique, hypolipémiant...etc. Selon Reddy et Srinivasan, (2011), une supplémentation d'un régime hypercholestérolémiant avec 12% de grains de fenugrec diminue la triglycéridémie, la cholestérolémie et le cholestérol LDL chez la souris. De même, au niveau hépatique, les concentrations des lipides totaux, du cholestérol et des triglycérides sont diminuées. Dans une autre étude, Elmnán *et al.*, (2012), ont noté que l'effet hypocholestérolémiant des grains de fenugrec, donnés à des rates Wistar, est dose dépendant. Par ailleurs, chez des patients diabétiques non insulino-dépendants, un apport quotidien de 100 g de fenugrec délipidé pendant 10 jours entraîne une diminution de la glycémie postprandiale (Sharma et Raghuram, 1990).

Du fait que les protéines de cette plante se retrouvent simultanément avec d'autres constituants non protéiques, il est difficile de distinguer l'effet propre de ces protéines. De plus, malgré la richesse de ces grains en protéines, très peu de données sont disponibles au sujet des propriétés de ces dernières. Effectivement, il n'existe que deux travaux *in vitro* qui, à notre connaissance, ont étudié les propriétés bioactives des protéines de cette plante. Le premier a étudié, en culture cellulaire, l'effet d'une protéine de fenugrec thermostable sur l'expression des gènes liés au métabolisme des lipides (Vijayakumar *et al.*, 2010), tandis que l'autre a porté sur l'effet de la fermentation des protéines sur leurs propriétés antioxydantes (Setti *et al.*, 2017). Cependant, ces deux travaux n'ont pas exploré les propriétés bioactives des protéines après une hydrolyse contrôlée, chez le modèle animal.

Dans le présent travail, nous nous sommes donc proposés d'étudier l'effet cardioprotecteur, hypolipémiant et antioxydant des protéines du fenugrec, et d'analyser l'effet de l'hydrolyse sur leurs propriétés. Pour atteindre ces objectifs, l'étude a été construite sur deux grands axes :

- Le premier, consiste à déterminer la composition physicochimique des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats, et d'évaluer leurs propriétés antioxydantes *in vitro*.
- Le second, porte sur l'évaluation, *in vivo*, de l'activité hypocholestérolémiante de ces protéines et hydrolysats, chez le rat en situation d'hypercholestérolémie. A cet effet, nous nous sommes proposé d'étudier l'effet d'un traitement avec ces préparations sur les paramètres lipidiques au niveau sérique, hépatique et dans les différentes fractions lipoprotéiques. Dans cette même partie, l'effet protecteur des protéines et des hydrolysats contre les conséquences délétères de l'hypercholestérolémie vis-à-vis des tissus cibles de l'athérosclérose est étudié via l'analyse des teneurs en lipides et le statut redox au niveau du foie, du cœur et de l'aorte.

Revue
bibliographique

I. Hydrolysats et peptides bioactifs : synthèse, caractéristiques et propriétés

Le terme nutraceutique est une combinaison entre les mots nutrition et pharmaceutique, tous deux importants pour la santé humaine. Il rassemble tous les aliments ou leurs composants qui, outre la nutrition, apportent des bienfaits pour la santé, notamment la prévention et le traitement de certaines affections. Ainsi, un nutraceutique est différent d'un complément alimentaire, car il doit non seulement compléter le régime alimentaire, mais également contribuer à la promotion de la santé (De Mejia et Dia, 2010).

Ces caractéristiques peuvent aussi être retrouvées dans les peptides bioactifs qui sont eux aussi définis comme « des peptides naturels ou obtenus par hydrolyse enzymatique de protéines et qui exercent un effet physiologique sur l'organisme » (Blanco-Míguez *et al.*, 2016). Cette définition exclut les peptides obtenus par hydrolyse chimique. En effet, selon Möller *et al.*, (2008), une molécule est considérée comme bioactive seulement si elle a la propriété d'affecter la santé de manière bénéfique, excluant ainsi de cette définition les effets potentiellement dommageables (tels que la toxicité, l'allergénicité et la mutagénicité).

I.1. Obtention d'hydrolysats et de peptides bioactifs

Un hydrolysats protéique est un mélange d'oligopeptides, de peptides et d'acides aminés produit par une hydrolyse partielle ou poussée de protéines. Ainsi, les peptides bioactifs peuvent être extraits de n'importe quelle protéine. Ce sont des séquences de trois à 50 acides aminés qui peuvent être libres ou encryptées dans une séquence protéique. Les peptides encryptés deviennent actifs lorsqu'ils sont libérés de la protéine, principalement par hydrolyse chimique, autolyse ou encore par hydrolyse enzymatique moyennant des protéases spécifiques d'origine animale, végétale ou microbienne (Blanco-Míguez *et al.*, 2016 ; Nasri, 2017). Mais, pour différentes raisons, la fermentation et l'hydrolyse enzymatique sont les plus utilisées (Lemes *et al.*, 2016 ; Nwachukwu et Aluko, 2019). Dans l'industrie agroalimentaire, l'hydrolyse des protéines est principalement employée dans le but d'améliorer les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines animales et végétales (Wani et Kumar, 2016).

I.1.1. Hydrolyse chimique

Les procédés d'hydrolyse chimique, alcaline ou acide, sont très difficiles à contrôler, polluantes, non reproductibles et affectent fortement la qualité des produits finaux. De plus, on peut assister à une destruction ou modification de certains acides aminés (Nasri, 2017).

I.1.2. Autolyse et fermentation

L'autolyse, ou hydrolyse par des enzymes endogènes présentes dans la source alimentaire elle-même, est un procédé qui est surtout utilisé pour la production d'hydrolysats à partir de coproduits marins surtout, dans le but de les valoriser (Cao *et al.*, 2009 ; Arias-Moscoso *et al.*, 2015). Le coût d'un tel procédé est quasiment nul. Cependant, du fait que les enzymes contenues dans ces tissus sont un mélange très complexe, le produit final de l'hydrolyse ne peut être homogène.

Dans les produits alimentaires fermentés, il peut aussi y avoir une production de peptides bioactifs sous l'action d'enzymes microbiennes (Daliri *et al.*, 2017). Certains chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'exploration de peptides bioactifs obtenus par fermentation de protéines d'origine marine et de leurs coproduits (Bueno-Solano *et al.*, 2009 ; Jemil *et al.*, 2017), ou même de certaines protéines de légumineuses (Stanisavljević *et al.*, 2015).

I.1.3. Hydrolyse enzymatique contrôlée

Comparée à l'hydrolyse acide ou alcaline, l'hydrolyse d'une protéine par des protéases pures et spécifiques procure des conditions plus modérées du procédé et produit peu, voire pas, de produits indésirables ou toxiques (Hrčková *et al.*, 2002 ; Nwachukwu et Aluko, 2019). De plus, l'utilisation d'enzymes exogènes pures est préférée à la fermentation microbienne en raison du rendement, du temps d'hydrolyse qui serait plus court, du contrôle de la réaction et des produits d'hydrolyse ainsi que de la facilité de sa mise en place (Daliri *et al.*, 2017).

Il existe d'autres techniques pour la production de peptides bioactifs, telles que la synthèse enzymatique et la génie génétique, mais qui restent très restreints dans leurs utilisations malgré leur forte reproductibilité (Nasri, 2017).

I.2. Caractéristiques des peptides bioactifs et facteurs influençant leurs propriétés

I.2.1. Caractéristiques des hydrolysats et des peptides bioactifs

L'hydrolyse enzymatique des protéines conduit principalement à un changement de sa structure et de sa conformation, une diminution de son poids moléculaire, une augmentation du nombre des groupements ionisables et une exposition des groupements hydrophobes. Ces changements caractérisent l'activité biologique que peuvent avoir les hydrolysats et les peptides (Kanu *et al.*, 2009).

- **La nature des peptides**

La nature des peptides est d'une grande importance pour leurs bioactivités. Par exemple, une faible digestibilité des hydrolysats et des peptides semble très importante pour une activité hypolipémiant (Udenigwe et Rouvinen-Watt, 2015). En outre, la nature hydrophobe des peptides leur permet de se lier aux acides biliaires et au cholestérol, ce qui conduit à une inhibition de la réabsorption de ce dernier au niveau intestinal (Guerin *et al.*, 2016). Cette hydrophobicité est aussi essentielle pour l'activité antioxydante des peptides, en leur permettant d'agir dans les milieux hydrophobes, comme dans les lipides (Zou *et al.*, 2016).

- **Position de l'acide aminé dans la séquence du peptide**

L'acide aminé qui se trouve à l'extrémité C-terminale ou en N-terminale du peptide est le plus déterminant de son activité, puisqu'il sera en contact direct avec son environnement. Il est rapporté que la présence de proline, de lysine, d'arginine ou d'un acide aminé aromatique en C-terminal est le plus souvent nécessaire pour l'activité des peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Kitts et Weiler, 2003 ; Maestri *et al.*, 2018).

En général, les 20 acides aminés protéinogènes peuvent interagir avec les radicaux libres mais les plus efficaces sont ceux soufrés, aromatiques, en plus de l'histidine (Samaranayaka et Li-Chan, 2011). L'addition des résidus leucine ou proline à l'extrémité N-terminale du dipeptide His-His ou la présence des acides aminés hydrophobes, en particulier ceux aromatiques, dans un peptide augmente son activité antioxydante (Kitts et Weiler, 2003).

De plus, la présence de la leucine à une des extrémités de la séquence peptidique ainsi que sa richesse en acides aminés hydrophobes attribuent une activité hypocholestérolémiant à certains peptides (Zhong *et al.*, 2007b ; Maestri *et al.*, 2018).

Outre la composition des peptides en acides aminés, la position de ces derniers détermine également la bioactivité des peptides. En effet, et d'après Sánchez et Vázquez, (2017), un changement dans l'ordre de la séquence Lys-**Arg-Glu**-Ser en Lys-**Glu-Arg**-Ser conduit à une perte totale de l'activité biologique du peptide, suggérant ainsi une relation structure-activité particulière. Dans le tableau 1, Sarmadi et Ismail, (2010), ont regroupé quelques caractéristiques des peptides antioxydants en démontrant l'importance de la position des acides aminés dans la séquence peptidique. Ces données vont permettre de trancher, d'une part, sur le choix de l'enzyme en sachant ses sites de coupures, et d'autre part, sur le choix de la matière première qui doit être riche en certains acides aminés et séquences peptidiques.

Tableau I. Mécanismes d'action des acides aminés et importance de leur position dans la séquence peptidique (Sarmadi et Ismail, 2010)

Acides aminés	Mécanisme d'action	Position de l'acide aminé
Acides aminés aromatiques	<ul style="list-style-type: none"> Neutralisent les molécules radicalaires en leur cédant un électron. 	<ul style="list-style-type: none"> Tripeptides avec un Trp ou Tyr en C-terminal sont doués d'une forte activité antiradicalaire mais piège mal le peroxy-nitrite.
Acides aminés hydrophobes	<ul style="list-style-type: none"> Améliorent la solubilisation des peptides dans les lipides ce qui favorise leur interactions avec radicaux hydrophobes et aux acides gras polyinsaturés (AGPI). Forte réactivité des groupements aliphatiques de l'Ala, Leu et Val avec les AGPI. La Gly pourrait agir comme donneur d'hydrogène. 	<ul style="list-style-type: none"> Val ou Leu en N-terminal Présence de Pro, His ou Tyr dans la séquence peptidique. Ala ou Leu à l'extrémité du peptide. Présence de Gln et Pro dans la séquence.
Acides aminés basiques	<ul style="list-style-type: none"> Les groupements carboxyles ou amines dans la chaîne latérale agissent comme chélateurs des métaux. Donneurs d'hydrogène. 	<ul style="list-style-type: none"> Présence de His dans le peptide. Effet chélateur de l'His en N-terminal. Effet piègeur des radicaux libres de l'His en C-terminal.
Cystéine	<ul style="list-style-type: none"> Grâce au groupement thiol, elle peut piéger les radicaux libres et le peroxy-nitrite, protéger contre l'oxydation des tissus. 	<ul style="list-style-type: none"> Rentre dans la composition du glutathion.

• Le degré d'hydrolyse et la taille des peptides

Selon la propriété recherchée, la taille de la séquence peptidique joue un rôle déterminant dans la propriété d'un peptide. Par exemple, il est établi que les propriétés fonctionnelles et antimicrobiennes sont surtout attribuées aux peptides longs ou à ceux obtenus par une hydrolyse limitée (Amza *et al.*, 2013 ; Luna Vital *et al.*, 2015 ; Yasser *et al.*, 2016). En revanche, les peptides de faible taille ou ceux obtenus par une hydrolyse poussée sont surtout réputés pour leur pouvoir antioxydant (Amza *et al.*, 2013 ; Zou *et al.*, 2016). En plus, un degré d'hydrolyse élevé reflète la présence de nouvelles terminaisons. En effet, pour chaque équivalent de liaison peptidique clivé, on aura formation de deux nouvelles fonctions : COOH et NH₂.

Dans une hydrolyse avec des protéases alcalines, il est possible d'estimer la taille des peptides *via* le degré d'hydrolyse. Ce dernier est calculé par la méthode du pH-Stat, qui est une technique basée sur le maintien du pH de la réaction d'hydrolyse constant par un ajout continu de NaOH : Si on considère qu'un équivalent de liaisons peptidiques est coupé par l'enzyme, on aura donc formation d'un équivalent de fonctions COO^- et un équivalent de fonctions NH_3^+ . Or, dans des pH basiques, les fonctions NH_3^+ se dissocient cédant ainsi leurs H^+ qui sont neutralisés par les molécules hydroxyles (OH^- : 1 mole/1 mole) du milieu, et par conséquent, le pH diminue proportionnellement au nombre de moles de NH_3^+ formées et des liaisons peptidiques coupées. Enfin, le nombre de moles de NaOH ajoutées, pour maintenir le pH constant, sera équivalent au nombre de liaisons peptidiques coupées, et le degré d'hydrolyse est estimé par un calcul simple (Adler-Nissen, 1982).

A partir de ces caractéristiques des peptides bioactifs citées ci-dessus, on peut faire ressortir certains paramètres qui influenceraient la qualité des hydrolysats, tels que le choix de l'enzyme, la nature du substrat et le temps d'hydrolyse (Nasri, 2017) (figure 1).

I.2.2. Facteurs influençant la qualité des hydrolysats et des peptides bioactifs

- **Le choix de l'enzyme**

La spécificité de la protéase détermine la taille, l'acide aminé N- et C-terminal et la nature des peptides formés. En conséquence, les hydrolysats qui sont formés par diverses enzymes peuvent avoir des propriétés différentes (figure 2). Les protéases de faible spécificité produisent des peptides plus courts que les protéases de grande spécificité (Sarmadi et Ismail, 2010 ; Nasri, 2017 ; Maestri *et al.*, 2018).

- **Nature de la matière première**

La nature de la protéine et sa richesse en certains acides aminés peut influencer la qualité du produit final. De même, la présence de molécules non protéiques ou des antiprotéases peut affecter la cinétique et l'étendue de l'hydrolyse (Nasri, 2017).

- **Temps d'hydrolyse et rapport enzyme/substrat (E/S)**

Le rapport E/S et le temps d'hydrolyse influencent fortement la qualité de l'hydrolysat. En effet, plus le temps d'hydrolyse est prolongé, et plus la taille des peptides est faible, et plus de nouvelles fonctions amines ou carboxyles seront exposées. Le rapport E/S détermine la vitesse à laquelle se déroule l'hydrolyse, mais aussi la taille des peptides obtenus (Nasri, 2017).

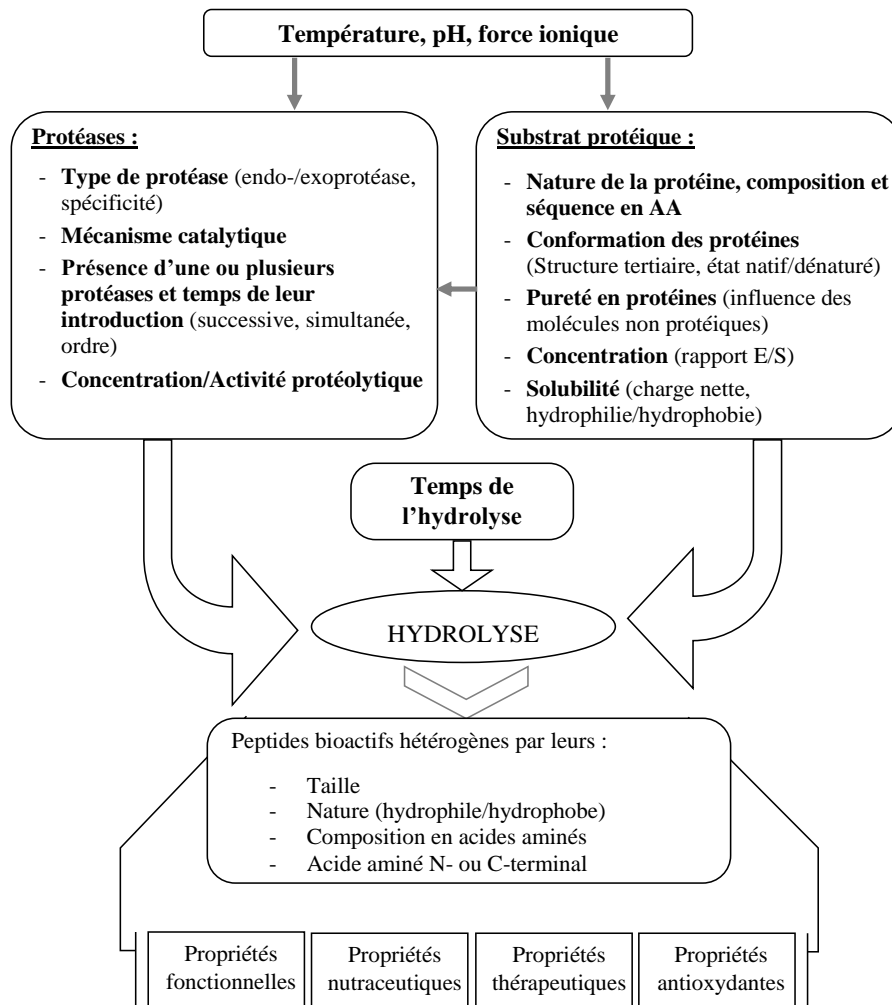


Figure 1. Paramètres influençant l'hydrolyse enzymatique et la qualité des hydrolysats (Chabanon, 2005).

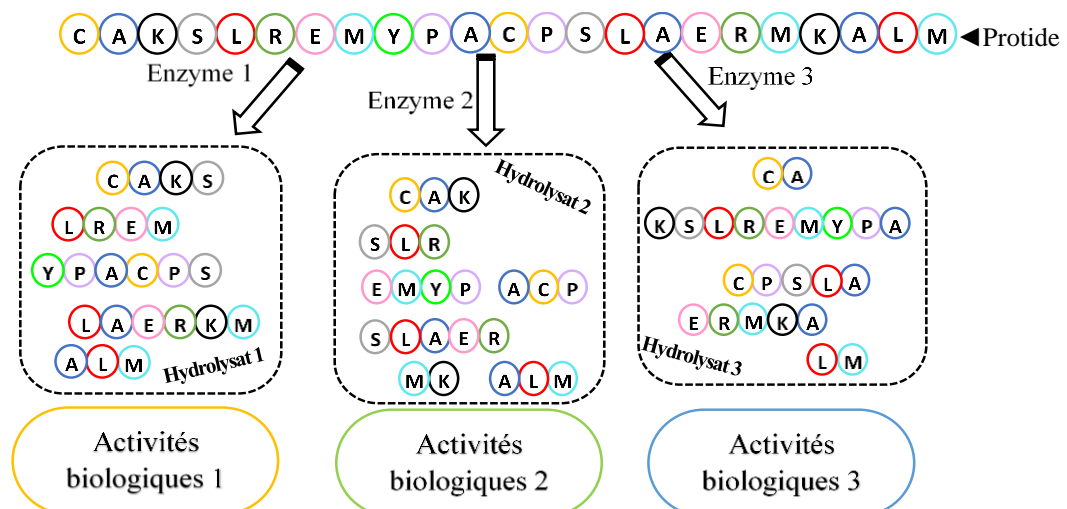


Figure 2. Influence du choix d'enzyme sur la composition et la qualité des hydrolysats (Nasri, 2017).

- **Les conditions d'hydrolyse**

Etant donné qu'on travaille avec des enzymes et des protéines, la qualité de l'hydrolysats est influencée par certaines conditions telles que le pH, la température et les forces ioniques dans le milieu (Nwachukwu et Aluko, 2019). Ces conditions ont un effet sur l'activité des enzymes, mais aussi sur la conformation de la protéine ce qui permet, ou non, une plus grande surface de contact et d'interaction avec l'enzyme (Nasri, 2017). Un choix étudié de ces paramètres permet un contrôle optimal de l'hydrolyse et détermine la qualité des produits obtenus avec les propriétés fonctionnelles et bioactives désirées (Samaranayaka et Li-Chan, 2011 ; Maestri *et al.*, 2018).

II. Propriétés nutraceutiques des protéines et des peptides d'origine alimentaire

Etant donné que les légumineuses sont principalement connues pour leur forte teneur en protéines, et après la réputation que ces dernières ont acquise dans la protection contre certaines maladies, un grand intérêt leur a été attribué par de nombreux chercheurs (Blachie *et al.*, 2010). Les protéines des légumineuses sont principalement représentées par les globulines, l'albumine, et à moindre degré les prolamines (qui sont plutôt prédominantes dans les céréales) ainsi que d'autres protéines mineurs telles que les inhibiteurs de protéases et d'amylase, les lectines et les lipo-oxygénases. Dans les légumineuses, les globulines sont les plus abondantes (70% des protéines). Selon leur coefficient de sédimentation, on rencontre surtout les globulines 7S (trimériques) et 11S (hexamériques), et en moindre degré les globulines 15S (figure 3) (Duranti, 2006 ; Boye *et al.*, 2010). Selon certains auteurs, les propriétés observées avec les protéines de légumineuses sont principalement attribuées à la sous-unité α' de la globuline 7S (Garcia *et al.*, 2013).

Les protéines de légumineuses ne sont pas uniquement une source d'acides aminés, mais elles ont également des propriétés nutraceutiques. Plusieurs effets bénéfiques leurs ont été attribués (Bouchenak et Lamri-Senhadj, 2013). Il n'y a pas longtemps, les protéines de soja étaient en tête des protéines végétales les plus étudiées (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2014). A présent, on remarque de plus en plus de travaux qui s'intéressent aux protéines extraites à partir de nouvelles sources végétales (Roy *et al.*, 2010), et dont on peut citer les études résumées dans le tableau 2, qui traitent les propriétés hypocholestérolémiantes de certaines protéines de légumineuses.

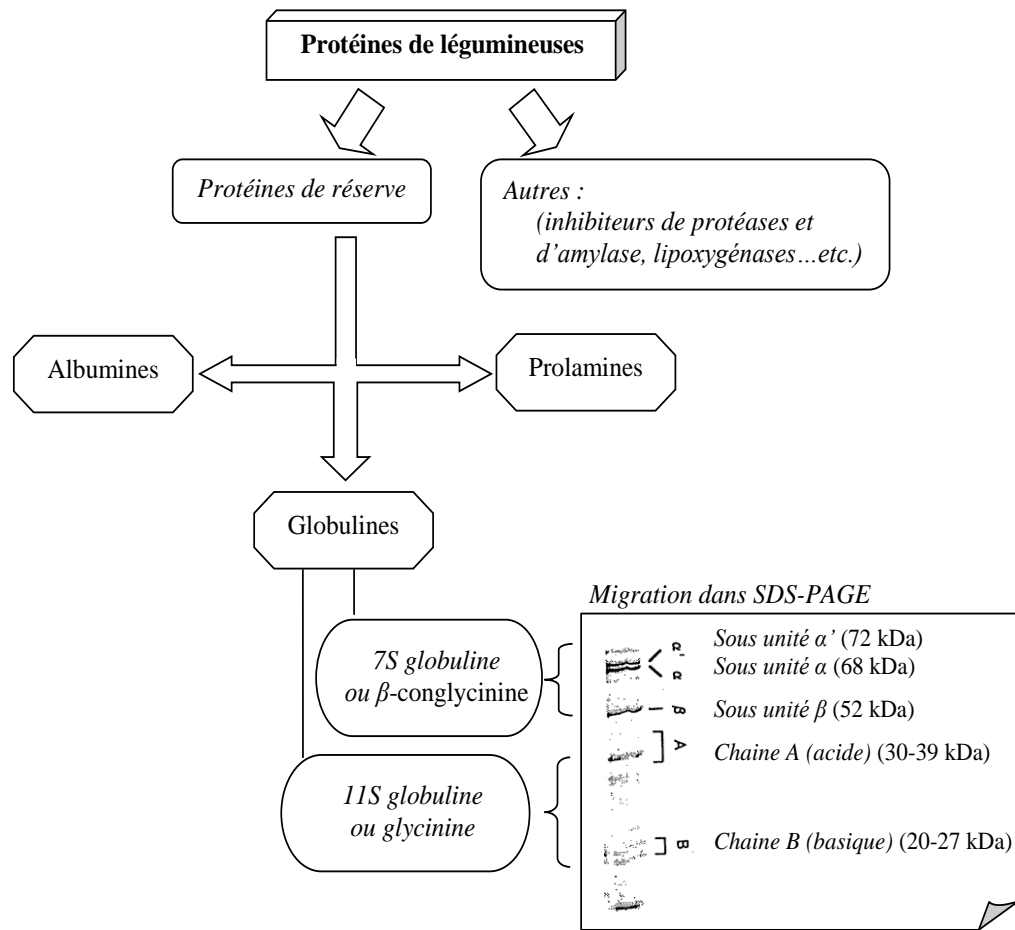


Figure 3. Les différentes classes majeures de protéines des légumineuses (Duranti, 2006 ; Feyzi *et al.*, 2015).

Par ailleurs, ces protéines alimentaires peuvent aussi être considérées comme une source potentielle de peptides biologiquement actifs qui sont libérés par digestion gastro-intestinale ou par hydrolyse enzymatique *in vitro*, et pouvant présenter des propriétés nutraceutiques ou fonctionnelles. Selon Zhong *et al.*, (2007b), et Yust *et al.*, (2012), certaines propriétés observées avec les protéines peuvent même être améliorées par l'hydrolyse.

II.1. Propriété hypocholestérolémiante d'hydrolysats et de peptides de légumineuses

II.1.1. Epidémiologie des maladies cardiovasculaires et de l'hypercholestérolémie

Les maladies cardiovasculaires (MCV) provoquent plus de décès dans le monde que toute autre cause de mortalité, et affectent de plus en plus les populations des pays développés comme ceux des pays en développement. Il a été estimé qu'en 2015, 17,7 millions de personnes en sont mortes, soit 31% de l'ensemble des décès dans le monde (O.M.S, 2017).

Tableau II. Exemples d'études mettant en évidence l'effet hypocholestérolémiant des protéines de certaines légumineuses.

Source de protéine	Model expérimental/Sujet	Résultats
Haricot rouge Ferreira <i>et al.</i> , (2015)	<i>Rat HC</i>	↘ CT et C-LDL ↗ C-HDL ↗ Excrétion fécale du cholestérol
Lupin Bähr <i>et al.</i> , (2013)	<i>Sujet HC</i> <i>Apport : 25 g, 2 fois par jour</i>	↘ C-LDL ↘ C-LDL/C-HDL
Soja Ferreira <i>et al.</i> , (2010)	<i>Rat HC</i>	↘ TG et CT sériques et hépatiques ↗ C-HDL
Lentille et pois chiche Boualga <i>et al.</i> , (2009)	<i>Rat</i>	↘ TG sériques ↘ Nombre des particules VLDL ↘ TG et CT hépatiques
Pois Spielmann <i>et al.</i> , (2008)	<i>Rat</i>	↘ CT sérique et C-VLDL ↗ ARNm CYP7A1, HMGCR, LDL-R hépatiques ↗ acides biliaires fécaux
Dolique Frota <i>et al.</i> , (2008)	<i>Rat HC</i>	↘ CT et C-LDL ↘ Stéatose hépatique
Haricot mat (papillon) Mayilvaganan <i>et al.</i> , (2004)	<i>Rat HC</i>	↘ Lipides et CT hépatiques ↘ C-LDL et TG sériques ↗ C-HDL
Féverole Macarulla <i>et al.</i> , (2001)	<i>Rat HC</i>	↘ C-LDL ↘ TG et CT hépatiques ↗ Excrétion fécale des stérols

HC : hypercholestérolémique.

↘ : diminution.

↗ : augmentation.

CT : cholestérol total.

TG : triglycérides.

CYP7A1 : Cholestérol 7 α -hydroxylase.

HMGCR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase.

LDL-R : Récepteurs des LDL.

Ces maladies ne touchent pas uniquement les pays où le niveau de vie est aisé, mais il s'avère que c'est plutôt les pays dits pauvres ou ceux à revenu moyen qui en sont les plus touchés, puisqu'on y recense plus des trois quarts des décès dus aux MCV dans le monde. Et si l'organisation mondiale de la santé, qui a rapporté ces statistiques, attribue au vieillissement et à la pauvreté un rôle dans le développement de ces maladies, il ne faut pas non plus exclure le fait que ces sociétés vivent une transition remarquable dans leur mode de vie, constaté par une hausse de sédentarité et un accès facile à une alimentation rapide, riche en calories et en graisses et pauvre en antioxydants, en plus du manque de sensibilisation de la population (Atek *et al.*, 2007 ; O.M.S, 2017).

En Algérie, selon les statistiques de l'enquête M.I.C.S4, (2015), la situation est sensiblement différente de ce qu'elle l'est dans le monde, puisque la prévalence des MCV n'arrive que cinquième parmi les maladies chroniques avec 0,9%, derrière l'HTA (5,6%), le diabète (2,9%), l'asthme (1,3%) et les maladies articulaires (1,2%). Par contre, les MCV restent la première cause de décès par maladies non transmissibles (44,5%) et de l'ensemble des décès (26%), selon le rapport de l'étude TAHINA-2002 (Atek *et al.*, 2008).

Selon l'O.M.S, on attribue environ 75% des maladies cardiovasculaires aux facteurs de risque suivants : l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, la consommation insuffisante de fruits et légumes, la sédentarité et le tabagisme. Les dyslipidémies sont donc un des paramètres majeurs du risque cardiovasculaire. En Algérie, la prévalence des dyslipidémies (14,5% avec 4,4% pour l'hypercholestérolémie selon l'étude TAHINA-2002) est encore loin des chiffres enregistrés dans les pays occidentaux ; 53% aux Etats-Unis selon l'étude NHANES : "*National Health and Nutrition Examination Survey*" 2003-2006, 48% en France avec 30% pour l'hypercholestérolémie pure seulement selon l'étude Mona Liza 2006-2007 (Atek *et al.*, 2007 ; Ferrières *et al.*, 2009 ; Tóth *et al.*, 2012). Néanmoins, ceci n'a pas empêché les professionnels de la santé d'entreprendre certaines mesures pour lutter contre ces maladies et ce en élaborant un plan stratégique, dont figure en amont ; la sensibilisation aux risques et aux complications de ces maladies et l'intérêt de l'éducation nutritionnelle, et l'insistance sur le rôle de l'activité physique et la mobilité active (Mesbah *et al.*, 2013). En effet, et selon les recommandations européennes et celles américaines pour la lutte contre les dyslipidémies, l'adoption d'un style de vie sain constitue la première approche dans la thérapie des MCV (Bejarano *et al.*, 2014). De plus, ces approches se sont avérées efficaces, puisqu'aux Etats-Unis et en Europe de l'Ouest, les complications de l'athérosclérose ont diminué de 30% entre 1975 et 2005 (Machecourt, 2005).

II.1.2. Athérosclérose ; Élément clé des MCV

L'athérosclérose est la complication la plus commune entre les MCV ; c'est une pathologie multifactorielle résultant de l'interaction entre plusieurs facteurs : métaboliques, oxydatifs, thrombotiques et inflammatoires (Hao et Friedman, 2014). C'est une plaque qui se développe anormalement à l'intérieur de la paroi vasculaire (en conséquence à un dysfonctionnement vasculaire) aboutissant à la réduction de la lumière des artères. Cette plaque est formée suite aux dépôts lipidiques, calciques et d'éléments fibreux ce qui entraîne son durcissement. Et comme la plaque continue de croître et que le vaisseau perd son élasticité, la force du flux sanguin à travers la lumière décroissante du vaisseau peut éventuellement provoquer sa rupture, ce qui conduit à la formation d'un thrombus (Paul et Baudin, 2009 ; Hao et Friedman, 2014).

▪ Relation entre l'athérosclérose et l'hypercholestérolémie

L'hypercholestérolémie est un état de désordre métabolique caractérisé par des teneurs élevées en cholestérol. Ce désordre favorise l'apparition d'un état de stress oxydant qui se répercute lourdement sur l'organisme (Csont *et al.*, 2007 ; Otunola *et al.*, 2014). Il a été noté que les teneurs en peroxydes lipidiques augmentent proportionnellement avec les teneurs en cholestérol LDL (C-LDL) (Csont *et al.*, 2007), quant à Yang *et al.*, (2008b), ils ont constaté qu'il existe une corrélation positive entre les teneurs en malondialdéhyde (MDA) (un marqueur d'oxydation) et l'indice d'athérogénicité chez des patients dyslipidémiques.

La réduction des taux du C-LDL constitue une des recommandations majeures pour lutter contre les complications des dyslipidémies, en particulier l'hypercholestérolémie, puisque cette macromolécule est fortement incriminée dans la physiopathologie de l'athérosclérose (Bejarano *et al.*, 2014). Dans un travail étudiant l'efficacité des traitements hypocholestérolémiants, on a constaté, chez des personnes à haut risque, qu'une diminution de plus de 50% des concentrations du C-LDL retarde la survenue du premier évènement cardiovasculaire (figure 4) (Bangalore *et al.*, 2016).

En fait, les LDL sont des lipoprotéines qui approvisionnent les cellules périphériques en cholestérol. Chez l'être humain, c'est la fraction la plus abondante des lipoprotéines circulantes. En temps normal, le flux d'entrée et de sortie du cholestérol dans l'intima des artères est minutieusement équilibré. En situation d'hypercholestérolémie, cet équilibre sera perturbé et les LDL peuvent demeurer prisonnières dans cet espace. Ces molécules de LDL vont ensuite

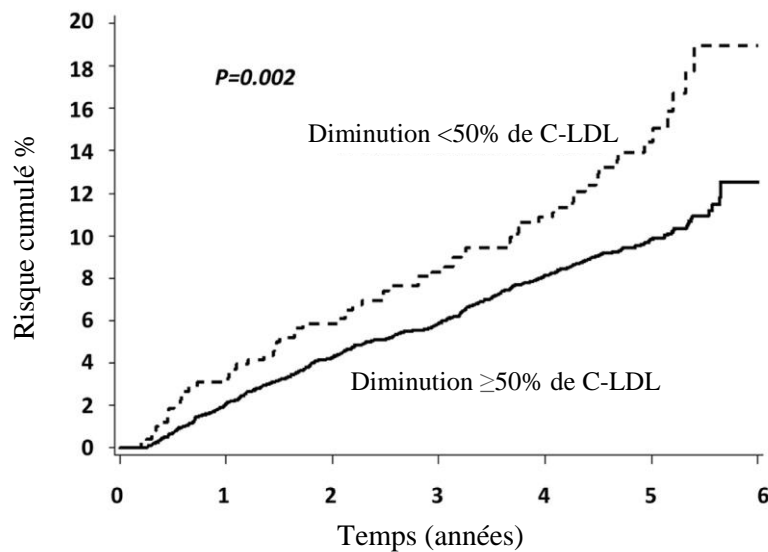


Figure 4. Risque de survenue d'un premier évènement cardiovasculaire en fonction du pourcentage de réduction de C-LDL (Bangalore *et al.*, 2016).

subir des transformations oxydatives, ou autres, et ne seront plus reconnues par leurs récepteurs cellulaires, mais plutôt par les récepteurs des macrophages qui vont les phagocyter pour former ensuite des cellules spumeuses, chargées de lipides (formation du strie lipidique) (figure 5). A cette étape, une réaction inflammatoire prend lieu avec comme conséquence recrutement de plus de cellules immunitaires et prolifération des cellules musculaires lisses venant de la media. Une fois que la réaction inflammatoire est amorcée, elle a tendance à s'amplifier pour au final former une chape fibro-musculaire qui isole le centre lipidique de la lumière vasculaire (Stapleton *et al.*, 2010 ; Brites *et al.*, 2017).

Cependant, et bien que les LDL soient incriminées dans la physiopathologie cardiovasculaire, il ne suffit pas que leur taux soit élevé pour qu'elles en soient responsables. Hormis les conditions génétiques, certaines conditions sont nécessaires pour que les LDL soient athérogènes, comme par exemple : leur taille et leur densité (plus leur taille est faible et plus elles traversent facilement l'endothélium), leur modification irréversible, une inefficacité de leur épuration par les cellules de l'intima, une perte de l'élasticité des artères et leur dysfonctionnement (augmentation du cholestérol membranaire), et une perturbation de la fluidité sanguine et/ou du débit sanguin (Paul et Baudin, 2009 ; Stapleton *et al.*, 2010 ; Csonka *et al.*, 2016 ; Brites *et al.*, 2017).

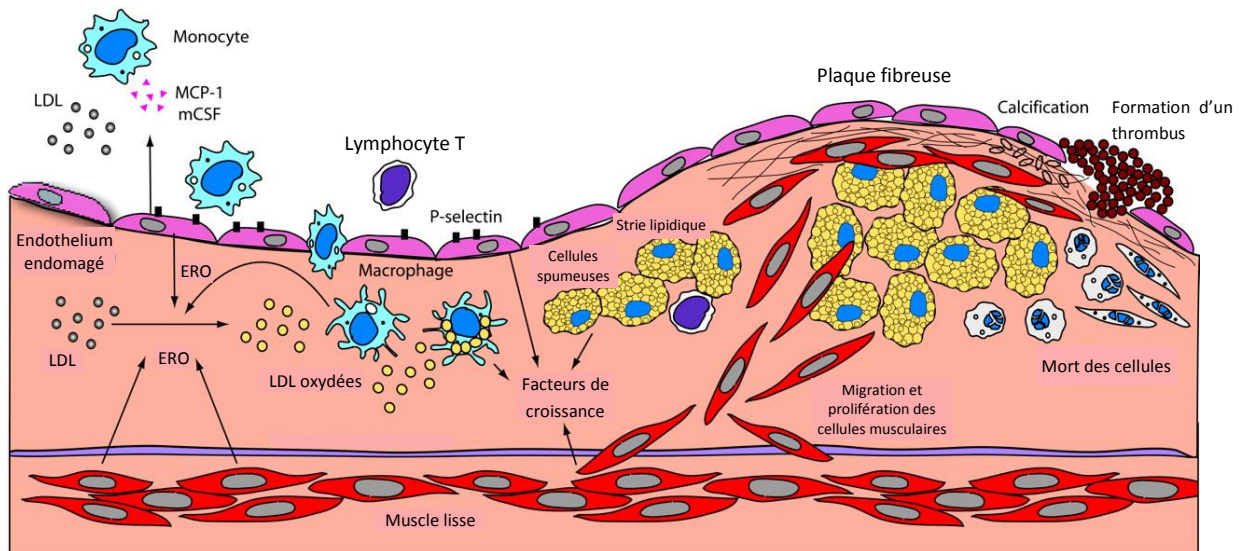


Figure 5. Athérogénicité des LDL oxydées (Madamanchi *et al.*, 2005b).

ERO : espèces réactives de l'oxygène, *MCP1* : monocyte chemoattractant protein 1, *mCSF* : macrophage colony-stimulating factor.

D'autre part, la concentration et la nature des LDL ne sont pas les seuls critères à prendre en considération pour évaluer le risque de développer de telles complications. En effet, plusieurs autres facteurs sont à prendre en compte pour "scorer" un risque cardiovasculaire, mais le plus signifiant reste le taux du cholestérol-HDL. Cette dernière (HDL) assure l'efflux du cholestérol des cellules périphériques pour qu'il soit acheminé vers le foie. De plus, elle possède des propriétés antioxydantes, antithrombotiques et anti-inflammatoires vis-à-vis des facteurs de l'athérosclérose (figure 6), sans oublier qu'elles constituent la seule issue qu'ont les cellules spumeuses pour se débarrasser de leur cholestérol en excès (Paul et Baudin, 2009 ; Stapleton *et al.*, 2010).

II.1.3. Rôle hypocholestérolémiant des hydrolysats de protéines de légumineuses

Dans des travaux comme ceux de Zhong *et al.*, (2007a), Yust *et al.*, (2012), Marques *et al.*, (2015), et Chale *et al.*, (2016), on a pu mettre en évidence, *in vitro*, les propriétés hypocholestérolémiants d'hydrolysats de protéines de légumineuses. Selon ces chercheurs, les hydrolysats de pois mascate (*Mucuna pruriens*), du dolique, du pois chiche et du soja diminuent la solubilisation micellaire du cholestérol et diminuent son absorption au niveau intestinal. Dans le travail de Barbana *et al.*, (2011), qui compare la fixation des acides biliaires par la farine de lentille, son concentré protéique et les hydrolysats de ses protéines, il est noté que les hydrolysats montrent une meilleure propriété de fixation des acides biliaires.

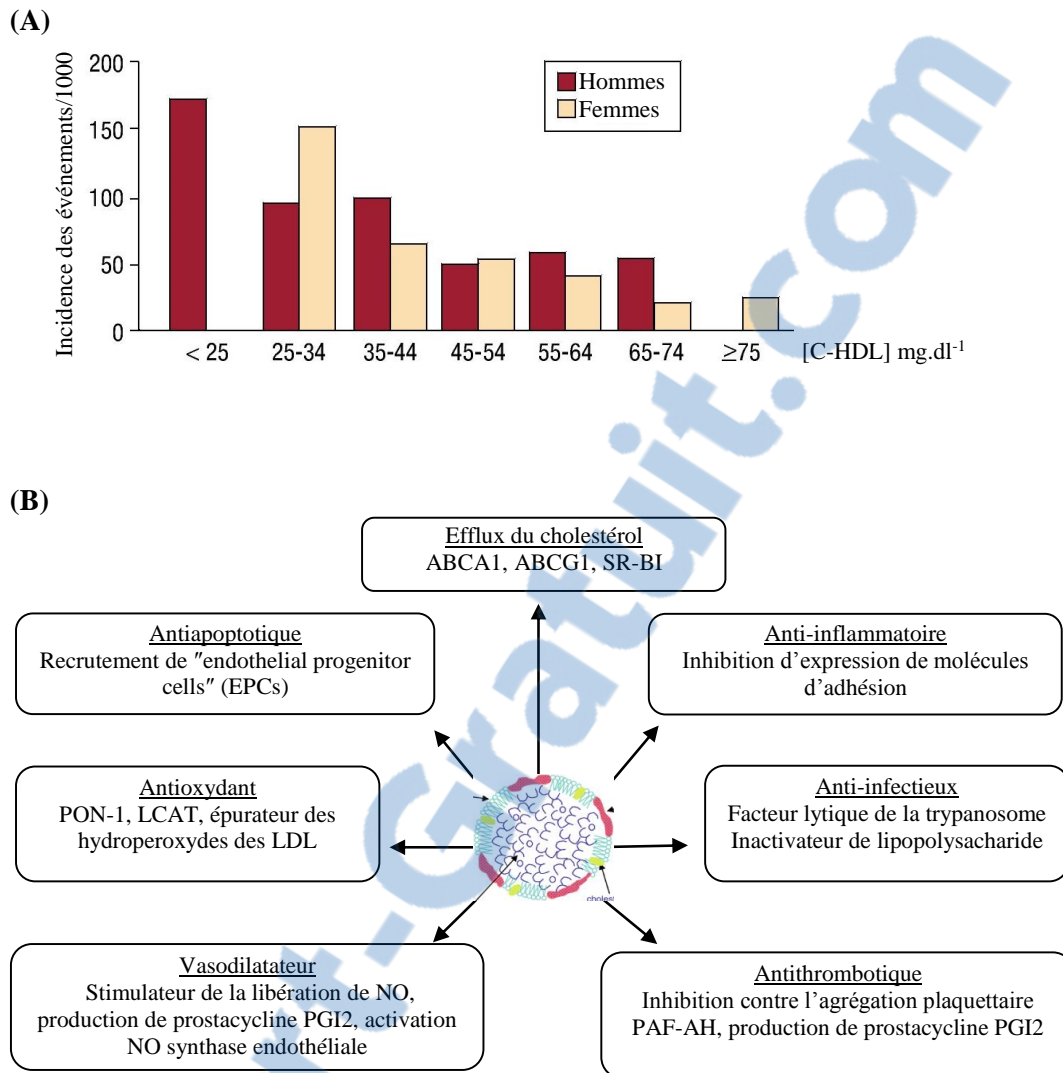


Figure 6. Rôle cardioprotecteur des HDL.

(A) Relation entre les taux plasmatiques des HDL et l'incidence des événements cardiovasculaires selon l'étude Framingham (Badimón et Ibáñez, 2010)

(B) Propriétés associées aux HDL (Hafiane et Genest, 2013).

En culture cellulaire, Cho *et al.*, (2007), et Lammi *et al.*, (2014), ont remarqué une augmentation de l'expression des récepteurs de LDL (LDL-R) par les hydrolysats des protéines de soja et de lupin, respectivement. Lammi *et al.*, (2014), et Marques *et al.*, (2015), ont aussi noté une inhibition de l'activité hydroxyméthylglutaryl coenzyme A (HMGCoA) réductase par les hydrolysats du lupin et du dolique. Ces observations ont permis d'expliquer en partie certains résultats obtenus *in vivo*.

En effet, ces mêmes observations ont été constatées dans certaines études qui voulaient reproduire ces tests chez le modèle animal. Zhong *et al.*, (2007a), ont remarqué que l'hydrolysate de soja a montré une activité inhibitrice de la solubilisation micellaire du cholestérol *in vitro*. Ceci les a conduits à traiter des souris hypercholestérolémiques (HC) avec cet hydrolysate, et les résultats obtenus confirmaient les observations *in vitro*. De même, Chalé *et al.*, (2016), ont constaté que l'hydrolysate de protéines de *Mucuna pruriens*, administré par voie intrapéritonéale à des rates diabétiques, diminue les concentrations sériques du cholestérol et des TG.

En introduisant des protéines de soja et leur hydrolysate dans un régime hypercholestérolémiant donné à des rats, ces derniers présentaient des valeurs plus faibles de CT, C-LDL, TG et des indices d'athérogénicités, comparés aux rats HC (Yang *et al.*, 2007). Cette étude rapporte aussi que les teneurs hépatiques en CT et TG sont de même diminuées chez les rats traités. Ces résultats sont probablement la conséquence d'une diminution de la solubilisation micellaire du cholestérol et de son absorption intestinale traduite par sa forte excrétion dans les fèces. Dans cette étude, ces chercheurs n'ont pas noté de différence dans l'action hypolipémiante entre les protéines et l'hydrolysate. Zhang *et al.*, (2016), sont parvenus aux mêmes résultats avec une autre protéine végétale ; il s'agit des protéines du son du riz, et comme les chercheurs précédents, ils ont noté une forte excrétion fécale du cholestérol et des acides biliaires chez le groupe de souris recevant un régime hypercholestérolémiant supplémenté en hydrolysate. De plus, ils ont constaté une diminution de l'expression des gènes exprimant pour les enzymes de synthèse du cholestérol et l'augmentation de ceux responsables de la synthèse des acides biliaires et de l'efflux du cholestérol.

Dans l'étude de Yahia *et al.*, (2017), des rats consommant une alimentation riche en cholestérol et recevant par gavage un hydrolysate de pois chiche ont vu leur activité LCAT sérique augmenter, et leur profil des lipoprotéines s'améliorer en faveur du transport inverse du cholestérol. Les résultats de cette recherche ont aussi indiqué que l'hydrolysate de pois chiche favorise l'élimination du cholestérol plutôt que son stockage hépatique.

En revanche, d'après l'étude réalisée par León-Espinosa *et al.*, (2016), l'hydrolysate des protéines de la fève ne diminue pas significativement les teneurs sériques en cholestérol chez des souris soumises à un régime HC. De même, Kapravelou *et al.*, (2013), ont rapporté que l'hydrolysate de protéines du lupin ne corrige pas les teneurs sériques en cholestérol chez des rats hypercholestérolémiques, et ce en dépit de son action hypotriglycéridémiante,.

Vu sa richesse en protéines dont la nature, selon Niknam *et al.*, (2004), se rapproche de celle du soja, le fenugrec peut constituer un produit bioactif à usage nutraceutique. A notre connaissance, l'une des rares études ayant étudié l'effet hypolipémiant des protéines de fenugrec est celle réalisée en culture cellulaire par Vijayakumar *et al.*, (2010), qui ont isolé une protéine thermostable ayant un pouvoir hypolipémiant, à partir des grains de cette plante.

II.2. Propriété antioxydante d'hydrolysats et de peptides de légumineuses

II.2.1. Qu'est-ce qu'un état de stress oxydant ?

Durant les différents processus et réactions qui se déroulent dans les différents compartiments cellulaires, il se peut qu'il y ait production de certaines molécules pro-oxydantes connues pour leur forte réactivité, appelées espèces réactives. En parallèle, la cellule dispose d'un ensemble de mécanismes (enzymatiques et non enzymatiques) qui lui permet de contrôler la production de ces pro-oxydants et de les maintenir à leur niveau basal, on parle ici des antioxydants. L'état de cet équilibre entre les pro- et antioxydants représente le statut redox. Quand la cellule ne contrôle plus la présence excessive des pro-oxydants, que ce soit en conséquence à une surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et/ou de l'azote (ERN), ou que ce soit à un déficit en antioxydants, cet équilibre se rompt et on parle donc d'un stress oxydant ; situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies (Charles *et al.*, 2010 ; Csonka *et al.*, 2016).

II.2.2. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une molécule chimique ou biologique qui possède un électron libre, non apparié, sur sa couche externe. Cet électron, étant seul et très réactif, a tendance à s'apparier avec un autre électron qu'il peut en procurer facilement des molécules biologiques : protéines, lipides, acides nucléiques, glucides, vitamines et oligoéléments. Ces molécules vont ensuite changer de propriétés telles représentées dans le tableau 3 (Valko *et al.*, 2007 ; Carochio et Ferreira, 2013). En plus, ces molécules, devenues elles même des radicaux libres, vont commencer à générer et à propager cette attaque radicalaire ; c'est ce qu'on appelle la réaction en chaînes, jusqu'à aboutir à des produits finaux irréversibles (Fontaine *et al.*, 2002).

Tableau III. Cibles moléculaires des radicaux libres et conséquences biologiques (Carocho et Ferreira, 2013).

Molécule cible	Effet moléculaire	Quelques conséquences biologiques
Protéines	Carbonylation ou nitration des protéines Changement de conformation tertiaire ou quaternaire, dégradation...etc.	Non reconnaissance des apolipoprotéines par les récepteurs membranaires, perte de l'activité des enzymes, dégénérescence et/ou fragmentation des protéines de structure, reconnaissance par le système immunitaire. Changement des propriétés fonctionnelles.
Lipides	Peroxydation des doubles liaisons Formation de dérivés toxiques (malondialdéhyde, hydroperoxydes, hydroxynonenal).	Perturbation de la structure et de la fluidité membranaire, non reconnaissance par les enzymes de dégradation, élimination par les macrophages, adhésion sur la paroi endothéliale, propagation de l'oxydation vers d'autres molécules. Changement de texture ou rancissement des lipides (<i>technologie des aliments</i>).
Acides nucléiques	Oxydation des bases nucléotidiques Coupure de la double hélice d'ADN.	Mutation, génération de formes mutagènes, synthèse d'enzymes inactives ou de protéines non fonctionnelles (ex. maladie de dégénérescence musculaire), maladies auto-immunes.
Glucides	Glycation des protéines. Réaction de Maillard.	Fragilité de la paroi vasculaire et de la rétine. Brunissement (<i>technologie des aliments</i>).

Bien qu'ils semblent néfastes, les RL sont synthétisés régulièrement par les organismes vivants et par divers mécanismes physiologiques à des niveaux basaux (ex. O_2^- dans la chaîne respiration mitochondriale ou par certaines enzymes, le H_2O_2 et le $HClO^-$ dans les cellules immunitaires, le NO surtout dans le système vasculaire, la signalisation cellulaire...etc.), et généralement leur niveau de production est contrôlé grâce à tout un système qu'on appelle système antioxydant (figure 7). Cependant, dans certains cas (inflammation, effort physique intense, tabagisme, désordre métabolique, malnutrition...), l'organisme en produit d'avantage créant ainsi un état de stress oxydant, et d'autres espèces encore plus réactives peuvent être générées (ex. le peroxy-nitrite $ONOO^-$ et le radical hydroxyle OH^-) (Valko *et al.*, 2007 ; Defraigne et Pincemail, 2008 ; Charles *et al.*, 2010).

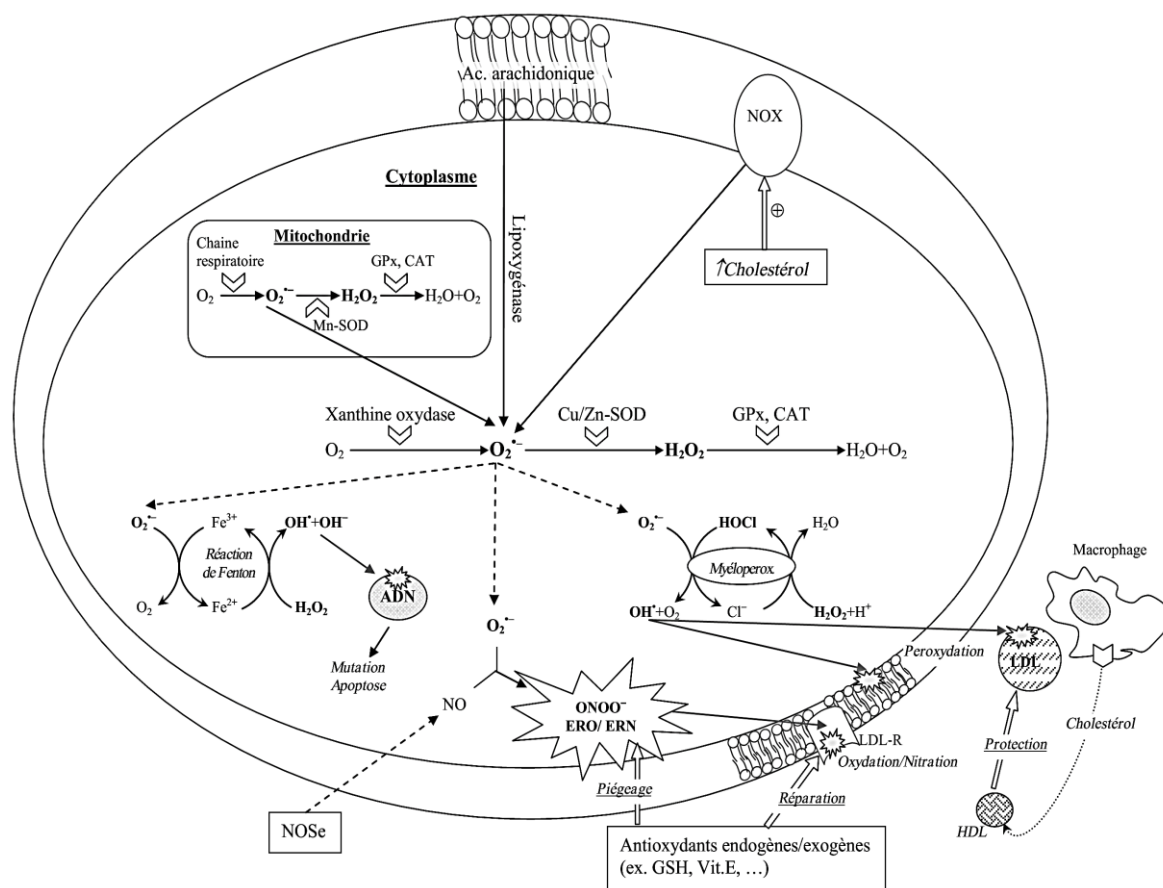


Figure 7. Source, métabolisme et devenir des radicaux libres dans les cellules vasculaires (Madamanchi *et al.*, 2005a ; Csonka *et al.*, 2016).

GSH : glutathion, GPx : glutathion peroxydase, CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase, NOS : NO synthase, NOX : NADPH oxydase, ERO/ERN : espèces réactives de l'oxygène/de l'azote (en gras).

D'autres facteurs peuvent aussi générer des radicaux libres non pas dans les organismes vivants seulement mais aussi dans des molécules biologiques entrant dans la composition des produits alimentaires ou cosmétiques, modifiant ainsi leurs propriétés organoleptiques, fonctionnelles...etc. Citons comme exemple : une température très élevée, une exposition aux rayons ionisants (RX, UV, R δ), la pollution, une exposition prolongée à l'oxygène ou à l'ozone, ... (Thorat *et al.*, 2013).

II.2.3. Implication du stress oxydant dans l'athérosclérose

Il y a un consensus sur le fait que l'hypercholestérolémie est associée d'une part à une augmentation du stress oxydant au niveau cardiaque et des cellules vasculaires *via* l'activation

du NADPH oxydase et de la xanthine oxydase (les principales sources du radical superoxyde), et d'autre part à l'inhibition de l'activité des enzymes antioxydantes (Stapleton *et al.*, 2010 ; Csonka *et al.*, 2016). De plus, Csonka *et al.*, (2007), ont remarqué que les LDL des sujets hypercholestérolémiques sont plus susceptibles à la peroxydation, comparées à celles des personnes non dyslipidémiques. Par ailleurs, le stress oxydant intervient dans toutes les phases du développement de l'athérosclérose. Tout d'abord, l'oxydation des LDL tient une place centrale dans l'initiation de la plaque athérome (figure 5). Les LDL oxydées ne sont plus reconnues par le récepteur à l'apo B et elles deviennent toxiques vis-à-vis des cellules endothéliales ; elles stimulent la production de médiateurs proinflammatoires et la différenciation des macrophages en cellules spumeuses. Elles présentent aussi des effets thrombogènes et mitogènes sur les cellules musculaires lisses (Paul et Baudin, 2009).

L'oxydation des LDL affecte aussi bien la partie lipidique que l'apoprotéine B. Il faut dire que l'un des dommages oxydatifs des lipoprotéines les mieux étudiés est celui touchant la fraction lipidique. La peroxydation des lipides est très facile à se produire ; les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée du radical hydroxyle, et puisque la réaction d'oxydation se fait en cascade, ceci pourrait aussi affecter la fraction protéique (apo B). Les radicaux libres responsables de cette oxydation peuvent prendre naissance à plusieurs niveaux, à commencer dans la circulation sanguine qui est un milieu très oxygéné, dans les cellules vasculaires *via* différentes enzymes (figure 7) et dans les cellules immunitaires recrutées en réponse à ce stress. Ceci a pour conséquence une non reconnaissance des LDL oxydées par leur récepteur, et leur oxydation s'accroît suite à la production de médiateurs pro-inflammatoires, et une différenciation des macrophages en cellules spumeuses. Ceci favorise de plus en plus la production des radicaux libres et l'amplification de la réaction oxydante (Holtzman, 2007 ; Paul et Baudin, 2009).

L'oxydation peut aussi toucher les phospholipides de la membrane cytoplasmique des cellules vasculaires diminuant ainsi leur fluidité et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs (Valko *et al.*, 2007). Les lipides oxydés peuvent aussi activer directement les plaquettes (Paul et Baudin, 2009). Enfin, le stress oxydant peut également aboutir à la mort cellulaire (Holtzman, 2007).

II.2.4. Les différents systèmes de défense antioxydante

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à de faibles concentrations par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation

de ce dernier. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi qu'à des petites molécules hydro ou liposolubles (Fontaine *et al.*, 2002).

On distingue également les antioxydants naturels et synthétiques (figure 8). Pour les industriels, les antioxydants synthétiques sont préférés à ceux naturels pour des raisons économiques (coût réduit, grande disponibilité, résistance au processus technologiques et grande efficacité). Cependant, quand il s'agit de la santé publique, ce sont les antioxydants naturels qui sont préférés vu qu'ils présentent moins, voire pas d'effets secondaires, et ils sont mieux tolérés par l'organisme (Hilton, 1989 ; Thorat *et al.*, 2013).

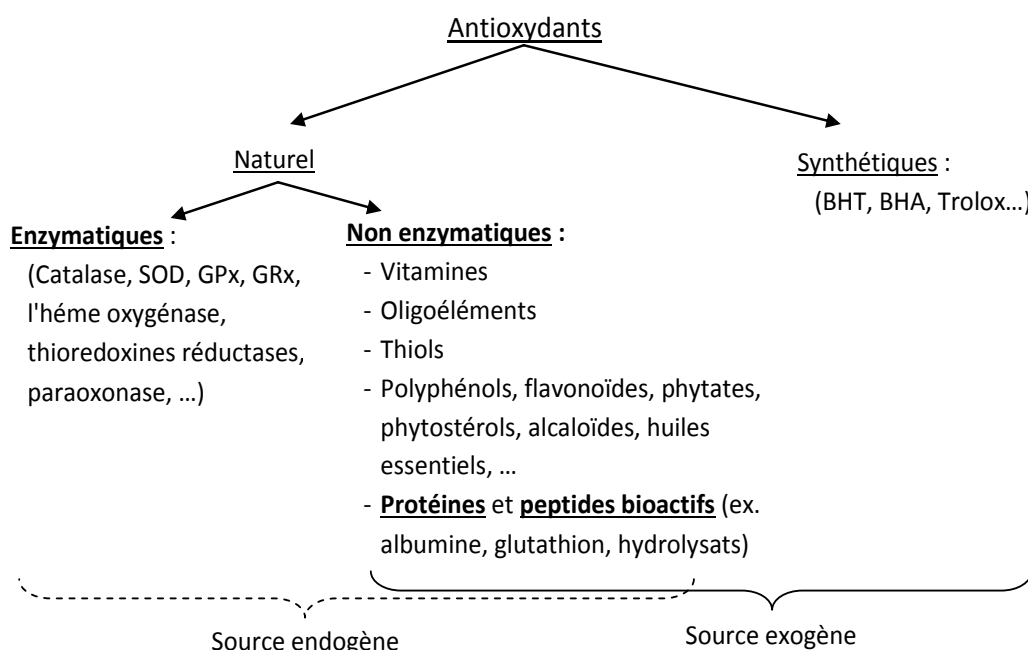


Figure 8. Les différents types d'antioxydants (Carocho et Ferreira, 2013 ; Thorat *et al.*, 2013).

BHA : butylhydroxyanisole ; *BHT* : butylhydroxytoluène ; *GPx* : Glutathion peroxydase ; *GRed* : Glutathion réductase ; *SOD* : superoxyde dismutase.

A l'échelle physiologique, les HDL jouent également un rôle antioxydant en prévenant l'oxydation des LDL *via* les différentes enzymes antioxydantes qu'elles transportent avec elles : LCAT, "platelet activating factor acetylhydrolase" (PAF-AH), sélénium-glutathion peroxydase et paraoxonase (PON1) (Hafiane et Genest, 2013).

En revanche, le glutathion (GSH) est l'antioxydant non enzymatique le plus puissant et le plus abondant dans la plupart des cellules. Il se trouve en fortes quantités (la concentration cellulaire est de l'ordre du mM) et participe dans la détoxification des peroxydes, ainsi que dans la régénération de certains antioxydants (α -tocophérol et l'acide ascorbique). Il assure aussi, avec la thiorédoxine, le maintien des fonctions sulfhydriles des résidus cystéines dans les protéines sous leur forme réduite ce qui prévient la formation des ponts disulfures (Holtzman, 2007 ; Valko *et al.*, 2007 ; Samaranayaka et Li-Chan, 2011).

II.2.5. Rôle antioxydant de protéines et d'hydrolysats de légumineuses

On attribue également certaines propriétés antioxydantes aux protéines et à leurs hydrolysats. Plusieurs études *in vitro* ont identifié des peptides antioxydants de légumineuses. Setti *et al.*, (2017), rapportent que les propriétés antioxydantes des protéines de fenugrec semblent augmenter après leur fermentation. Pareil, Sbroggio *et al.*, (2016), ont noté que l'activité antioxydante, *in vitro*, des protéines de l'okara (produit dérivé du soja) augmente après leur hydrolyse avec Alcalase et Flavourzyme. De plus, cette activité est positivement corrélée avec le DH, en particulier avec l'Alcalase (endoprotéase alcaline) qu'avec la Flavourzyme (exoprotéase neutre). Abu-Salem *et al.*, (2013), ont aussi noté dans leur travaux que les peptides de soja, ayant un poids moléculaire faible, ont une meilleure propriété antioxydante, comparés aux peptides ayant un poids moléculaire élevé. Cette relation entre le DH et l'activité antioxydante est aussi observée avec les hydrolysats de protéines de pois chiche et de sésame (Yust *et al.*, 2012 ; Amza *et al.*, 2013).

Par contre, Yust *et al.*, (2012), ont plutôt noté que l'activité protectrice contre la décoloration du β -carotène n'est pas absolument dépendante du DH, puisqu'après un certain seuil, cette relation devient réversible. Hwang *et al.*, (2010), sont parvenus aux mêmes résultats en hydrolysant les protéines d'arachides par différentes enzymes dont l'Espérase, ce qui démontre que l'activité biologique d'un peptide ne dépend pas seulement de sa taille. Cette dernière étude a aussi indiqué que l'hydrolysat obtenu avec Espérase a une activité antioxydante plus importante, par rapport à d'autres hydrolysats obtenus avec d'autres enzymes.

L'activité antioxydante des hydrolysats de protéines d'origine végétale a même été étudiée en cultures cellulaires. Nous citons ici un exemple d'un travail dans lequel Zhu et ses collaborateurs, (2013), ont mis en évidence l'effet protecteur d'un hydrolysat de protéines de germe de blé contre la cytotoxicité des cellules PC12 exposées au peroxyde d'hydrogène. Les

résultats ont indiqué que le prétraitement des cellules avec l'hydrolysate augmente significativement la défense antioxydante intracellulaire.

Étant donné qu'un hydrolysate est formé d'un ensemble hétérogène de peptides, et dont l'activité biologique peut varier d'un peptide à l'autre, de nombreuses tentatives sont réalisées pour l'isolement, la purification et l'identification des peptides avec l'activité biologique désirée. Parmi ces techniques, on cite l'ultrafiltration, la chromatographie d'exclusion de taille, la chromatographie par échange d'ions ou encore la chromatographie en phase inverse. Ces procédés peuvent séparer les biopeptides dans les hydrolysats de protéines selon leur propriétés physico-chimiques telles que leur taille, leur charge ou leur caractère hydrophobe (Zou *et al.*, 2016 ; Nasri, 2017).

Même s'il existe un nombre important d'articles mettant en évidence les propriétés antioxydantes des protéines hydrolysées, leur quasi-majorité relève surtout de l'étude *in vitro*. En effet, un nombre très limité de chercheurs s'est engagé dans l'étude *in vivo* des propriétés antioxydantes des protéines (Chakrabarti et Wu, 2016). Dans le peu d'études qui existe, on retrouve le travail de Yang *et al.*, (2008a), qui ont noté que la défense antioxydante plasmatique, cardiaque et aortique ne diffère pas entre deux groupes de rats spontanément hypertendus dont l'un est traité avec un hydrolysate de protéines de soja. Néanmoins, une diminution significative des teneurs tissulaires en TBARS est enregistrée chez le groupe traité.

Dans une autre étude, Girgih *et al.*, (2014), citent avoir observé une augmentation des activités superoxyde dismutase et catalase plasmatiques, accompagnée d'une diminution des niveaux des peroxydes, chez des rats spontanément hypertendus consommant une protéine hydrolysée d'une plante appelée chanvre (en Anglais : *industrial hemp seed*). Enfin, dans un travail plus récent (Yahia *et al.*, 2017), un apport journalier, pendant un mois, de protéines de pois chiche hydrolysées a amélioré la défense antioxydante chez des rats hypercholestérolémiques. Les résultats ont indiqué une diminution des teneurs sériques et des lipoprotéines en hydroperoxydes, ainsi qu'une stimulation des activités paraoxonase et glutathion peroxydase sériques chez ces rats.

III. Mécanismes d'action des peptides

III.1. Mécanismes d'action *in vitro*

En ce qui concerne l'activité antioxydante des antioxydants, y compris les peptides bioactifs, il est établi qu'ils peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation des ERO

(antioxydants primaires, ex. superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, inhibition des lipo-oxygénase) ou en épurant les ERO après leur formation (antioxydants secondaires, ex. PON1) (Fontaine *et al.*, 2002). Ces derniers (antioxydants secondaires) assurent plusieurs rôles (Hilton, 1989 ; Tandon *et al.*, 2005 ; Defraigne et Pincemail, 2008) :

- Prévention des molécules biologiques contre l'attaque radicalaire en piégeant ou en diminuant la réactivité des molécules oxydantes (ex. polyphénols) ;
- Réparation des molécules affectées par les pro-oxydants (ex. enzymes de réparation de l'ADN), inhibition de la propagation de l'oxydation en stoppant la réaction en chaîne et prévenir une quelconque détérioration ultérieure (ex. vitamine E) ;
- Dégradation et/ou élimination des molécules oxydées (ex. PON1).

Pour les enzymes antioxydantes, il est bien connu qu'elles font intervenir leur site actif pour exercer leurs fonctions. Cependant, pour les antioxydants non enzymatiques, comme les peptides, les mécanismes expliquant leurs activités sont multiples, mais ils peuvent être résumés en trois mécanismes présentés dans le tableau 4. Certains auteurs proposent même une liaison directe entre l'antioxydant et la molécule oxydable pour l'empêcher de réagir avec l'oxydant (Hilton, 1989), ou pour la rendre soluble pour qu'elle soit facilement excrétable.

Tableau IV. Mécanismes d'action des antioxydants non enzymatiques (Alam *et al.*, 2013 ; Apak *et al.*, 2013 ; Zou *et al.*, 2016).

Mécanisme	Test utilisé pour sa mise en évidence
Transfert d'un hydrogène $R^{\bullet} + AOxH \rightarrow RH + AOx^{\bullet}$	$DPPH^{\bullet} + \text{donneur de } H^+ \rightarrow DPPH, H^+$ Décoloration du β -carotène
Transfert d'un électron $R^{\bullet} + AOxH = R^{-} + AOx^{\bullet} + H^+$	FRAP ($2Fe(CN)_6^{3-} + AOxH \rightarrow 2Fe(CN)_6^{4-} + AOx^{\bullet} + H^+$) Folin-Ciocalteu
Chélation ou entrave	Chélation du fer ferrique

R^{\bullet} : molécule radicalaire ; AOx : antioxydant.

En ce qui concerne les propriétés antimicellaire, *in vitro*, des protéines et des peptides, certains auteurs suggèrent que c'est grâce au caractère hydrophobe de certains d'entre eux. En effet, cette caractéristique leur permet d'interagir avec les acides biliaires et le cholestérol pour

inhiber la solubilisation de ce dernier (Guerin *et al.*, 2016). Des études ont montré également que cette hydrophobicité donnait aux hydrolysats de protéines une propriété de rétention des lipides (Kanu *et al.*, 2009 ; Feyzi *et al.*, 2015).

III.2. Mode d'action des peptides *in vivo*

Bien que de nombreux travaux aient confirmé *in vitro* l'activité biologique des peptides bioactifs, il est difficile d'extrapoler ses résultats aux conditions physiologiques. En effet, étant donné que les peptides sont sujets à une dégradation et à une modification dans l'estomac, l'intestin, le système vasculaire et le foie, par conséquent, les peptides doivent pouvoir surmonter ces barrières et atteindre leurs cibles sous une forme active pour exercer leurs activités (Sarmadi et Ismail, 2010). Selon Lemes *et al.*, (2016), et Agyei *et al.*, (2018), des méthodes comme l'encapsulation, la lipo- ou la polyéthylène-glycolo conjugaison des peptides, ou leur agrafage aux hydrocarbures peuvent protéger contre la digestion des peptides au niveau gastro-intestinal. Ces procédés peuvent même augmenter la biodisponibilité des peptides dans le sang.

Pour ce qui est des mécanismes d'action, on sait maintenant que les molécules hypocholestérolémiantes peuvent exercer leur effets soit en inhibant l'absorption intestinale du cholestérol et des acides biliaires, soit en modulant l'expression ou l'activité de certaines enzymes et récepteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol et son transport (Chen *et al.*, 2011). Ces mécanismes s'appliquent également pour les protéines et les peptides bioactifs qui, eux aussi, exercent leur effet hypocholestérolémiant soit au niveau systémique soit au niveau intestinal (figure 9). Le premier mécanisme consiste à ce que le peptide traverse la barrière intestinale vers la circulation sanguine où il pourra exercer son action (Möller *et al.*, 2008). Ce phénomène concerne surtout les di- et les tri-peptides. Cependant, après avoir été absorbés par les entérocytes, les peptides peuvent subir une hydrolyse intracellulaire. Mais, des études ont confirmé qu'un certain nombre de peptides peut échapper à cette hydrolyse (Erdmann *et al.*, 2006 ; Sato *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2018). Le second mécanisme concerne les peptides à longue chaîne qui ne peuvent être absorbés et qui agissent directement au niveau intestinal (González-Ortega *et al.*, 2015). Ces derniers agissent généralement *via* l'inhibition de l'absorption du cholestérol en diminuant la formation de micelles.

Néanmoins, d'après González-Ortega *et al.*, (2015), certains auteurs suggèrent qu'une faible partie des peptides bioactifs à chaînes plus au moins longues arrive comme même à passer la barrière intestinale sans subir de dégradation (en raison de la saturation des transporteurs

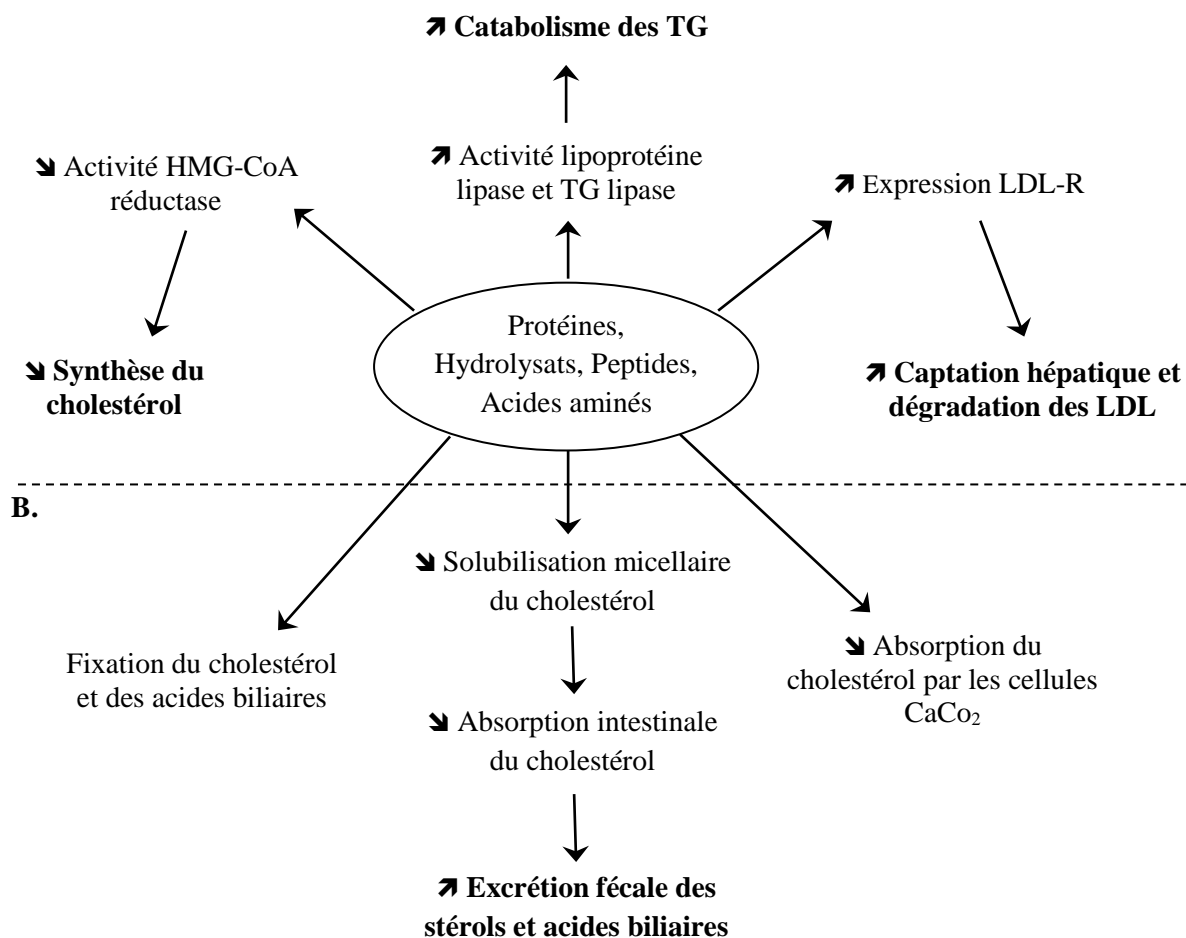


Figure 9. Mécanismes d'action des peptides, hydrolysats et protéines hypocholestérolémiantes (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2014).

(A) Régulation post absorptive (B) Régulation entéro-hépatique.

NB : Un peptide ou une protéine peut agir selon un ou plusieurs de ces mécanismes.

peptidiques et/ou résistance de certains peptides aux enzymes digestives). D'après Sarmadi et Ismail, (2010), et Wang *et al.*, (2019), ces peptides sont absorbés selon des processus physiologiques normaux différents de la voie régulière de transport des peptides (paracellulaire pour les peptides hydrophiles, diffusion passive pour les peptides hydrophobes, *via* un transporteur basolatéral pour les peptides courts résistants aux peptidases intracellulaires, endocytose pour les peptides très polaires à longues chaînes et *via* le système lymphatique). Cette hypothèse est confirmée dans une étude récente réalisée par Zhang *et al.*, (2018), en culture cellulaire.

Bien que la concentration de ces peptides, après leur absorption, soit généralement très faible pour être considérée comme importante de point de vue nutritionnel, elle est suffisamment importante pour exercer des effets biologiques au niveau tissulaire (figure 10). Par ailleurs, il est possible que l'activité biologique *in vivo* d'un peptide puisse être supérieure à l'activité observée *in vitro*, probablement après action de protéases gastro-intestinales (Sarmadi et Ismail, 2010 ; Nasri, 2017 ; Nwachukwu et Aluko, 2019).

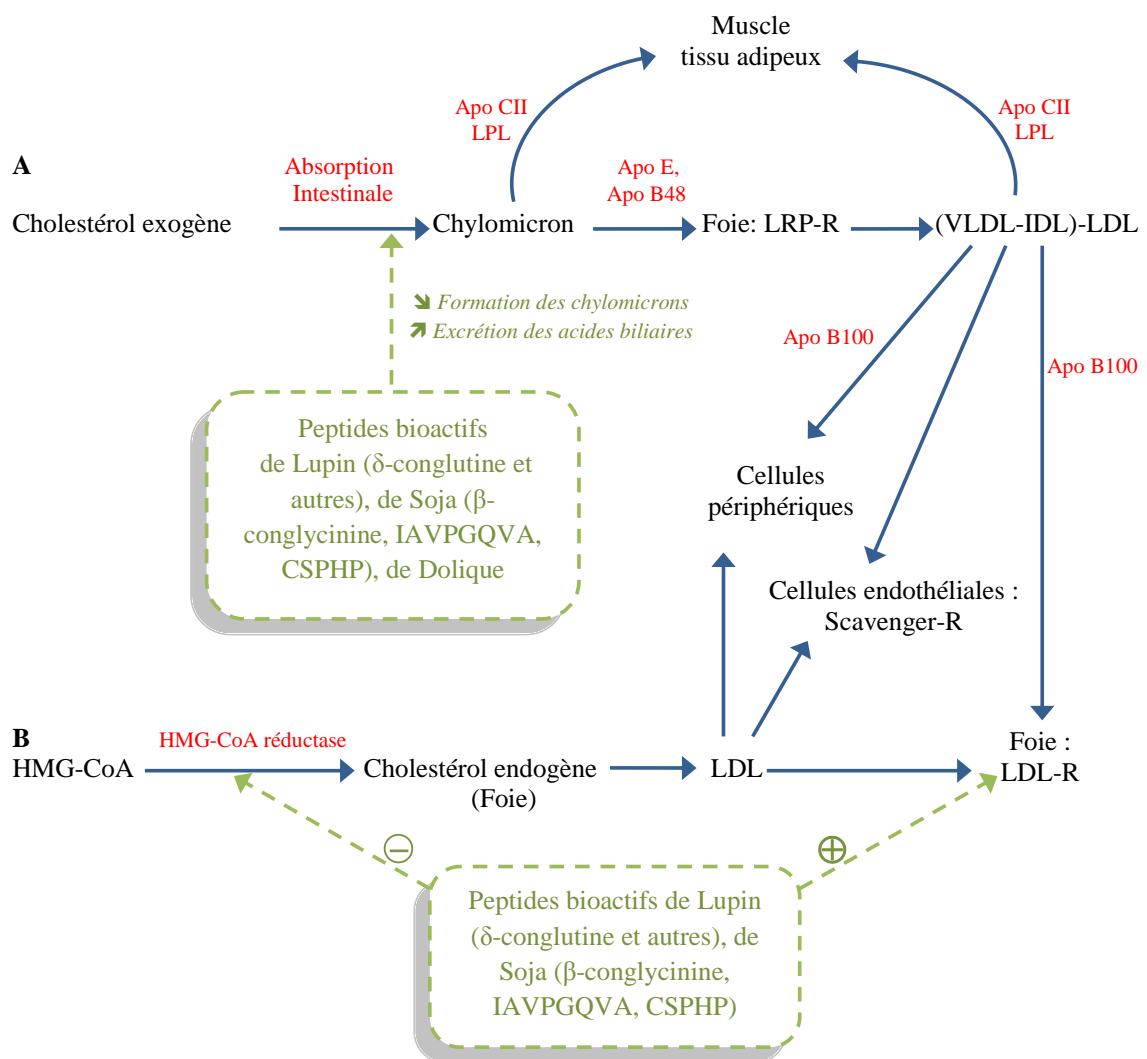


Figure 10. Exemples de peptides bioactifs de certaines légumineuses et leurs mécanismes d'action hypocholestérolémiant (Cicero *et al.*, 2016).

(A) Régulation entéro-hépatique (B) Régulation post absorptive.

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A ; APO : apolipoprotéine ; LDL-R : récepteur de LDL ; LRP-R : LDL-R Related Protein Receptor (récepteur de VLDL) ; LPL : Lipoprotéine Lipase.

IV. Fenugrec

Le fenugrec (*Trigonella graecum foenum*), ou “*el’helba*” en arabe, est une légumineuse cultivée un peu partout dans le monde. Ses grains constituent une source très riche en lipides, fibres, vitamines et minéraux. Elle est aussi riche en protéines (28%) (El Nasri et El Tinay, 2007 ; Feyzi *et al.*, 2015). Le fenugrec est utilisé comme condiment, mais surtout pour ses vertus thérapeutiques. En effet, on utilisait cette plante dans la médecine traditionnelle dans le traitement du diabète, des plaies, arthrites, désordres digestives, bronchites, amaigrissement...etc. Aujourd’hui, plusieurs travaux sont réalisés pour mettre en évidence de nouvelles applications thérapeutiques de cette légumineuse telles que le traitement contre le cancer, les dyslipidémies, l’inflammation, le stress oxydant et les infections (Wani et Kumar, 2016).

Dans la prévention cardiovasculaire, plusieurs travaux ont confirmé que les grains du fenugrec possèdent des propriétés cardioprotectrices. Dans une étude réalisée par Mukthamba et Srinivasan, (2015), des rats ayant consommé une alimentation hypercholestérolémiante (HC) et additionnée de 10% de grains de fenugrec ont supporté au mieux une induction d’infarctus du myocarde. Ceci s’est traduit par une diminution de l’activité sérique de la lactate-déshydrogénase (LDH), des transaminases, ainsi que les concentrations du cholestérol et des TG sériques et hépatiques. Reddy et Srinivasan, (2011), sont parvenus aux mêmes résultats en incorporant 12% de grains de fenugrec dans un régime HC donné à des souris. En plus, ils ont constaté que le fenugrec empêche la formation des lithiases biliaires. Ces souris présentaient aussi de faibles niveaux d’oxydation et une augmentation des teneurs en molécules antioxydantes au niveau hépatique. Dans une autre étude, (Ramadan *et al.*, 2011), la consommation de la farine de fenugrec a atténué, chez le rat diabétique, les complications du syndrome métabolique, à savoir l’hyperglycémie, l’hyperlipidémie, les indices d’athérogénicité, l’altération des fonctions hépatiques et le stress oxydant. Tandis que Elmnan *et al.*, (2012), ont remarqué que l’effet hypocholestérolémiant des grains de fenugrec donné à des rates Wistar est dose-dépendant.

Les mécanismes par lesquels les grains de cette légumineuse interviennent dans la régulation du métabolisme du cholestérol sont multiples. Reddy et Srinivasan, (2011), suggèrent une activation des enzymes de conversion du cholestérol en acides biliaires. Muraki *et al.*, (2011), suggèrent que cette légumineuse favorise l’excrétion fécale du cholestérol et l’inhibition de son absorption intestinale. Les auteurs soutiennent aussi l’idée d’une inhibition

de l'oxydation des LDL et des lipides au niveau des tissus cibles de l'athérosclérose (Mukthamba et Srinivasan, 2016). Tandis que pour la molécule qui en est responsable, la question reste sans réponse probante.

Cependant, et malgré ses diverses vertus, la consommation de cette plante reste très limitée dans certaines régions du monde (Fæste *et al.*, 2009), et pour la valoriser, des chercheurs ont tenté d'isoler ses composés actifs, tels que les composés hydro- ou organosolubles (Subhashini *et al.*, 2011 ; Belguith-Hadriche *et al.*, 2013), l'huile (Abd El Rahman, 2014), les fibres (Madhava Naidu *et al.*, 2011) et le 4-hydroxy-isoleucine (Hari et Mohan, 2014). Ces travaux ont tous montré des résultats prometteurs. Cependant, étant donné que les grains de cette plante soient riches en protéines, elle peut constituer une source potentielle de peptides bioactifs qui peuvent être utilisés à des fins nutraceutiques, d'où le but fixé dans ce travail.

Matériel
et Méthodes

I. Préparation du matériel biologique

I.1. Matériel biologique

Le Fenugrec, du nom latin *Trigonella foenum graecum*, est une plante très connue pour ses vertus. Il est aussi connu sous d'autres appellations comme *methi* en Inde, *trigonelle* ou *Sénegré* dans les pays francophones, ou encore *el'helba* dans les pays arabes (Nathiya *et al.*, 2014). C'est une plante légumineuse riche en protéines mais plutôt utilisée comme condiment, à des fins thérapeutiques ou même destinée à l'alimentation du bétail (Pavlovskaya et Nesterova, 2013).

Les grains de fenugrec utilisés dans ce protocole sont achetés dans un marché local (Tiaret, Ouest algérien). Ils sont nettoyés, moulus puis tamisés pour obtenir une poudre fine (farine) qui est ensuite délipidée au Soxhlet (*Labotech LT-6, Allemagne*) avec du *n*-hexane (*Biochem Chemopharma, Royaume-Uni*).

I.2. Préparation de l'isolat de protéines de fenugrec

Les protéines de fenugrec (PF) sont extraites par précipitation au pH isoélectrique (Boye *et al.*, 2010). La farine de fenugrec délipidée est mise en suspension dans l'eau distillée à un rapport 1:20 (p/v), sous agitation continue, et le pH du mélange est ensuite ramené à 10 avec du NaOH (1N). Après 30 minutes d'incubation sous agitation, cette suspension est centrifugée à 2000g pendant 30 min à 4°C. Les protéines dans le surnageant sont récupérées par précipitation à pH 4.5 (HCl 2N), suivie d'une centrifugation (3000g, 30 min). Le culot est ensuite récupéré après deux lavages successifs à l'eau distillée. Les protéines ainsi obtenues sont alors lyophilisées et conservées à 4°C comme isolat de protéines de fenugrec (IPF).

I.3. Préparation des hydrolysats des protéines de fenugrec

L'hydrolyse des protéines de fenugrec est réalisée selon la technique du pH-stat (Adler-Nissen, 1982) qui consiste à effectuer une hydrolyse enzymatique des protéines dans un milieu non tamponné, par l'ajout continu de soude afin de maintenir le pH de la réaction constant au cours de l'hydrolyse. Ceci permet de suivre le degré d'hydrolyse (DH) en temps réel. Deux hydrolysats sont préparés moyennant deux endopeptidases :

- PFHE : PF hydrolysées avec Espérase® 0.8L (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) (pH 9 ; 50°C).
- PFHP : PF hydrolysées avec Purafect® 2000E (*Genencor International, Etats-Unis*) (pH 10 ; 50°C).

L'IPF est d'abord solubilisé dans de l'eau distillée à raison de 50 g/L. La température et le pH de la solution sont ensuite ajustés selon les recommandations du fournisseur de chaque enzyme. Après stabilisation du pH, l'enzyme est ajoutée au mélange avec un rapport enzyme/substrat de 5 U.mg⁻¹. Le produit de l'hydrolyse est continuellement titré par une solution de soude (2N) pour maintenir le pH constant jusqu'à ce que la réaction n'évolue plus. La cinétique de l'hydrolyse est suivie par le calcul du DH.

En fin de l'hydrolyse, la solution d'hydrolysats est chauffée à 90°C pendant 10 min afin d'inactiver l'enzyme. Après refroidissement, la solution est centrifugée à 5000g pendant 15 min, et le surnageant contenant l'hydrolysats est lyophilisé et conservé à l'abri de l'humidité.

Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse, défini comme le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques coupées (h) et le nombre total de liaisons peptidiques de la protéine ($h_{tot}=7,8 \text{ meq.g}^{-1}$), est calculé à partir de la quantité de base (NaOH) ajoutée au milieu réactionnel durant l'hydrolyse, selon la formule :

$$\text{DH (\%)} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{V_B \times N_B}{mp} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

où : V_B est le volume de base (en litre) ajouté, N_B est la normalité de la base, mp est la masse de la protéine (en kg), et α est le facteur de dissociation des groupements $\alpha\text{-NH}_2$ libérés durant l'hydrolyse (dans cette étude $\alpha=1$; tableau annexe).

II. Analyse qualitative des protéines et des hydrolysats

II.1. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes en gel polyacrylamide

Une électrophorèse des échantillons en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE) est réalisée selon la technique de Laemmli, (1970). Une solution d'isolat protéique ou d'hydrolysats à une concentration de 3 mg.ml⁻¹ est préparée dans l'eau distillée, puis mélangée à un rapport 1/4 (v/v) avec un tampon de dénaturation (composé de 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 2% SDS, 15% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol et 0,002% du bleu de bromophénol). Les échantillons sont ensuite chauffés pendant 5 min à 90°C puis déposés dans un gel de SDS-PAGE composé d'un gel de concentration à 5% et d'un gel de séparation à 20%. La migration est réalisée à température ambiante dans un champ électrique de -133 Volts (*Consort E132, Belgique*) en présence de tampon de migration (50 mM Tris, 384 mM glycine et 0.1% SDS). Après

migration, les bandes protéiques sont visualisées par coloration au bleu de Coomassie R-250 (*Bio-Rad Laboratories, Mexique*) à 0,025% dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (15/5/80 ; v/v/v), puis lavage avec un mélange de méthanol/eau/acide acétique (5/4/1 ; v/v/v).

II.2. Analyse de la composition chimique

La composition chimique de l'isolat et des hydrolysats des protéines est analysée selon les méthodes officielles pour l'analyse des denrées alimentaire AOAC (Horwitz, 2000) : séchage à 105°C pour la teneur en eau ; incinération à 550°C pour les teneurs en cendres ; délipidation au soxhlet moyennant le *n*-hexane pour les teneurs en lipides, traitement acide pour les teneurs en fibres et Kjeldhal ($N \times 6,25$) pour les teneurs en protéines.

Les teneurs en différents minéraux sont déterminées par spectrométrie d'émission atomique (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*). 1 g d'échantillon est dissout dans 1 ml d'acide nitrique (70%) et chauffé jusqu'à hydrolyse complète. Ensuite, la solution est transférée dans une fiole puis diluée avec l'eau distillée (Q.S.P. 10 ml). Enfin, elle est analysée dans un spectrophotomètre à flamme (*Perkin Elmer 4300DV, Etats-Unis*).

II.3. Analyse de la composition en acides aminés

L'analyse des acides aminés est effectuée par HPLC en phase inverse sur un système Agilent 1100 (*Agilent Technologies, Etats-Unis*) après leur dérivatisation par l'O-phthalaldéhyde (OPA) et le chloroformate 9-fluorénylméthyl (FMOC). Le principe repose sur le fait que dans un milieu alcalin (pH 10.4), des dérivés fluorescents sont formés à partir de l'OPA, du 2-mercapto-éthanol (*Agilent PN5061-3335, Etats-Unis*) et du groupement amine primaire de l'acide aminé (Soufleros et Bertrand, 1998). Les acides aminés secondaires sont dérivatisés en présence du FMOC (*Agilent PN5061-3337, Etats-Unis*) pour donner des dérivés hautement fluorescents (Godel *et al.*, 1992 ; Soufleros et Bertrand, 1998). Les acides aminés sont séparés selon leur polarité.

50 µl d'échantillon (1 mg.ml⁻¹) sont transférés dans un tube, séchés puis hydrolysés avec du HCl 6N (200 µl) à 110°C pendant 24h, en présence de 1% (p/v) de phénol (pour prévenir la chloration de la tyrosine). Pour l'analyse du tryptophane, l'hydrolyse se fait avec 10 ml de NaOH 4N à 100°C pendant 4h. Le pH de la solution est ensuite neutralisé. Ensuite, 100 µl du produit d'hydrolyse sont filtrés, *via* un filtre à membrane en acétate de cellulose 0,45 µm, et injectés dans une colonne *Agilent Zorbax Eclipse-AAA (Etats-Unis)* (4,6×150 mm, 3,5 µm). Une dérivatisation précolonne est automatiquement réalisée par le chromatographe. L'éluant A

contient 40 mM NaH_2PO_4 (pH 7.8), alors que l'éluant B contient un mélange d'acétonitrile, de méthanol et d'eau distillée 45/45/10 (v/v/v). La température de la colonne est fixée à 40°C et le débit à 2 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. En sortie de la colonne, la fluorescence est mesurée grâce à un détecteur fluorimétrique (VWD-G1314B, Agilent série 1200, Etats-Unis) ; à 340/450 nm excitation/émission entre 0 et 15 min pour les acides aminés primaires et à 266/305 nm excitation/émission après 15 min pour les acides aminés secondaires. La norvaline et la sarcosine (Agilent PN5062-2478, Etats-Unis) sont utilisées comme standard internes.

II.4. Fractionnement des hydrolysats de fenugrec

Les hydrolysats des protéines de fenugrec sont fractionnés par ultrafiltration (UF) baromembranaire frontale sur des membranes en triacétate de cellulose aux seuils de coupure de 30, 10 et 5 kDa, successivement. 50 ml d'une solution d'hydrolysat (1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) sont introduits dans une cellule d'ultrafiltration (Millipore Amicon Stirred Cell 8050, Etats-Unis : photo) en commençant l'UF par le plus grand seuil de coupure : 30 kDa, jusqu'à ce que la majeure partie de la solution soit filtrée (environ 40 ml). On obtient ainsi deux fractions (>30 kDa dans le retentât et <30 kDa dans le filtrat). Ensuite, la cellule d'UF est lavée avec l'eau ultra pure et la membrane 30 kDa est remplacée par celle de 10 kDa. Le filtrat de la première étape est réintroduit dans la cellule d'UF et l'opération est répétée encore une fois, et ainsi de suite avec la membrane à 5 kDa. Ainsi, à la fin des opérations, on obtient quatre fractions : >30, entre 10-30, entre 5-10 et <5 kDa. Les fractions sont lyophilisées, pesées et enfin testées pour leurs propriétés antioxydantes. Les étapes de l'ultrafiltration sont présentées dans la figure 11.



Photo. Dispositif de l'ultrafiltration avec la cellule Millipore Amicon™.

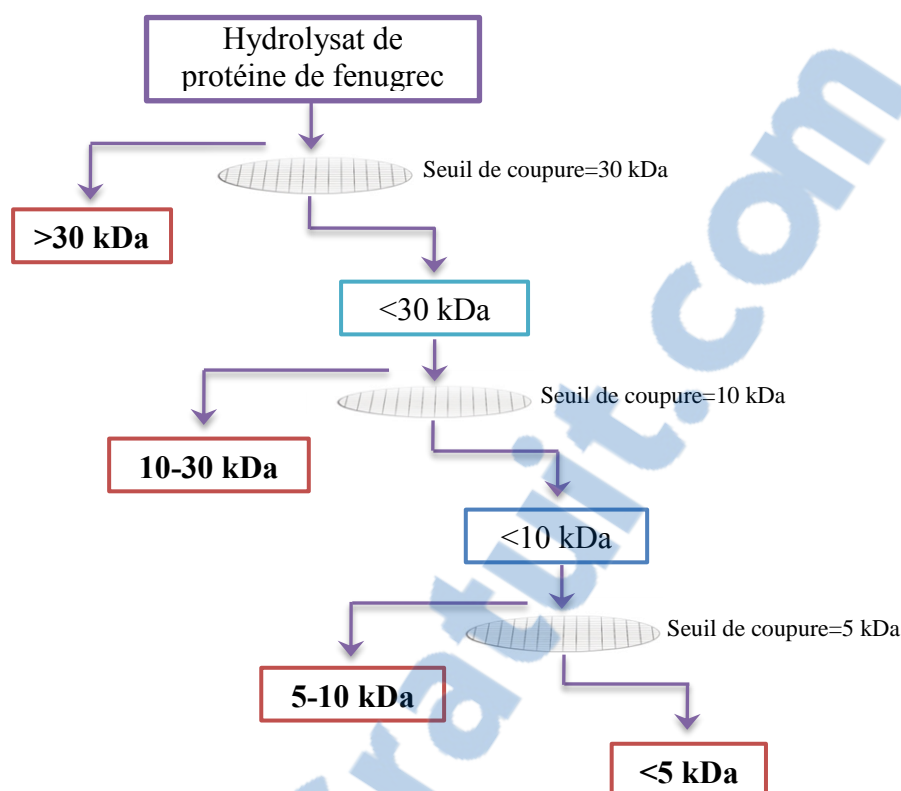


Figure 11. Diagramme représentatif des différentes étapes de fractionnement des hydrolysats des protéines de fenugrec par ultrafiltrations successives.

III. Activité antioxydante des protéines et des hydrolysats de fenugrec *in vitro*

III.1. Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire de l'isolat et des hydrolysats des protéines de fenugrec est mesurée selon la méthode décrite par Jridi *et al.*, (2014). Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre et stable, de couleur violette foncée. Cet essai est basé sur la réduction du DPPH par un antioxydant donneur d'hydrogène et qui est accompagnée d'un virement de couleur du violet au jaune pâle. Cette réduction peut être mesurée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Dans des eppendorfs, 500 µl d'échantillon à tester (à différentes concentrations) ou de butyle hydroxyanisole (BHA) sont incubés avec 375 µl d'éthanol pur et 125 µl d'une solution de DPPH (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) à 0,02 mM dans l'éthanol pur. Un blanc (500 µl d'échantillon et 500 µl d'éthanol) est préparé pour chaque concentration. Un témoin est préparé en remplaçant l'échantillon par l'eau ultrapure.

Les tubes sont incubés pendant 1h, à l'obscurité, et l'absorbance est ensuite mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est calculée comme suit :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \left(1 - \frac{DO_{\text{éch.}} - DO_{\text{blanc}}}{DO_{\text{témoin}}}\right) \times 100$$

III.2. Test du pouvoir réducteur (*ferric reducing antioxidant power ; FRAP*)

Le pouvoir réducteur de l'isolat et des hydrolysats des protéines de fenugrec est déterminé selon la méthode de Oyaizu, (1986). Le principe du test repose sur le fait qu'en présence d'un agent réducteur, l'ion ferricyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ est réduit en ferrocyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ et réagit par la suite avec l'ion Fe^{3+} (du FeCl_3) pour donner le bleu de Prusse ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$). L'absorbance de ce dernier est mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à un fort pouvoir réducteur de l'antioxydant.

0,5 ml d'échantillon à différentes concentrations est incubé avec 1,25 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6.6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium à 10 g.l^{-1} (*Normapur, France*) pendant 30 minutes à 50°C . Après, 1,25 ml d'acide trichloroacétique (10%) est ajouté et le tout est centrifugé 10 min à $3000g$. 1,25 ml de surnageant est repris et mélangé avec 1,25 ml d'eau bi-distillée et 0,25 ml de FeCl_3 (1 g.l^{-1}). Après une incubation de 10 minutes, l'absorbance est mesurée à 700 nm.

III.3. Test de protection contre la décoloration du β -carotène

Cet essai est réalisé selon la méthode décrite par Koleva *et al.*, (2002), avec quelques modifications apportées par Jridi *et al.*, (2014). Ce test met en évidence la propriété d'un antioxydant à protéger un substrat auto-oxydable et non sa réaction direct avec l'oxydant (Prieto *et al.*, 2012). La technique est basée sur le principe de l'oxydation de l'acide linoléique par la chaleur ce qui va entraîner avec elle une oxydation et une décoloration du β -carotène. La présence d'un antioxydant inhibe cette décoloration (Alam *et al.*, 2013).

Une solution de β -carotène (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) fraîchement préparée (2 mg dissous dans 1 ml chloroforme) est mélangée avec $20 \mu\text{l}$ d'acide linoléique et $200 \mu\text{l}$ de Tween 40. Le tout est séché à 40°C au moyen d'un évaporateur rotatif puis repris dans 100 ml d'eau bi-distillée. Une solution blanc est préparée dans les mêmes conditions sans β -carotène.

2,5 ml de solution du β -carotène ou du blanc sont ajoutés à 500 μ l d'échantillon ou BHA, à différentes concentrations, et sont incubés pendant 2 heures à 50°C dans un bain marie. Un témoin est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'échantillon par le solvant.

L'absorbance est mesurée à 470 nm au début et à la fin de l'incubation. L'activité antioxydante est calculée comme suit :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = \left(1 - \frac{(\text{DO}_0 \text{ éch.} - \text{DO}_0 \text{ blanc}) - (\text{DO}_2 \text{ éch.} - \text{DO}_2 \text{ blanc})}{\text{DO}_0 \text{ témoin} - \text{DO}_2 \text{ témoin}} \right) \times 100$$

où DO_0 est l'absorbance avant l'incubation et DO_2 après l'incubation 2 heures.

III.4. Protection contre l'oxydation de l'ADN

La propriété des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats à protéger contre l'oxydation de l'ADN par les radicaux hydroxyles est évaluée selon la méthode décrite par Jridi *et al.*, (2014), utilisant le plasmide pCRII TOPO DNA (*invitrogen*). 10 μ l d'une solution de l'isolat ou d'hydrolysat de protéines de fenugrec (2 mg.ml⁻¹) sont pré-incubés avec 0,5 μ g d'ADN plasmidique pendant 10 min à 37°C. Ensuite, 10 μ l de réactif de Fenton (30 mM de H₂O₂, 50 μ M d'acide ascorbique et 80 μ M de FeCl₃) sont ajoutés à la solution et incubés pendant 5 min à 37°C. Après l'ajout de 5 μ l de tampon de dépôt, les plasmides sont séparés par électrophorèse (*Enduro Gel XL, Labnet, Etats-Unis*) dans un gel d'agarose à 1% (p/v) contenant du bromure d'éthidium.

Un témoin positif (en absence d'antioxydant) et un témoin négatif (plasmide sans réactif de Fenton) sont également préparés. Les différentes formes du plasmide sont visualisées par la lumière ultraviolette. Le gel est scanné et analysé grâce à un logiciel dédié (*UVP BioDoc-it™ System, Etats-Unis*).

IV. Propriétés des protéines et des hydrolysats de fenugrec *in vivo*

IV.1. Animaux et protocole nutritionnel

Trente (30) rats mâles de souche Wistar (*institut pasteur, Alger*), pesant 184 \pm 7 g, sont répartis en cinq groupes de 6 rats chacun ; quatre groupes consommant un régime hypercholestérolémiant (HC), contenant 1% de cholestérol alimentaire et 0,5% d'acide cholique, et un groupe témoin (T) consommant le même régime mais sans cholestérol ou acide cholique (tableau 5).

Tableau V. Composition du régime donné aux rats (g.100 g⁻¹ de régime).

<i>Ingrédients</i>	<i>Régime sans cholestérol</i>	<i>Régime hypercholestérolémiant</i>
Caséine ¹	20	20
Huile de table ²	5	5
Cellulose ³	5	5
Saccharose ⁴	4	4
Mélange minéral ⁵	4	4
Mélange vitaminique ⁶	2	2
L-Méthionine ⁷	0,3	0,3
Amidon de maïs ⁸	59,7	58,2
Cholestérol ⁹	-	1
Acide cholique ⁹	-	0,5

La valeur énergétique du régime est égale à 1,6 MJ pour 100 g de régime.

(1) Caséine de lait bovin, Sigma-life science, Etats-Unis (2) Elio Cévitral (80% soja et 20% tournesol), Bejaïa, Algérie (3) Agar, Liofilchem, Italie (4) Skor Cévitral, Bejaïa, Algérie (5) Mx SAFE 205B, Augy, France (6) Vit SAFE 200, Augy, France (7) Biochem Chemopharma, Canada (8) Maghnia Starch, Tlemcen, Algérie (9) Sigma-life science, Etats-Unis.

La composition détaillée du régime est indiquée dans l'annexe.

En parallèle, chaque groupe reçoit, par gavage, 2 ml d'une solution contenant un des produits suivants, à raison de 1 g.kg⁻¹ du poids de l'animal :

- Les groupes T et HC reçoivent de la caséine (Sigma-life science, Etats-Unis).
- Le groupe IPF reçoit l'isolat de protéines de fenugrec.
- Le groupe PFHP reçoit les protéines de fenugrec hydrolysées avec la Purafect.
- Le groupe PFHE reçoit les protéines de fenugrec hydrolysées avec l'Espérase.

Les animaux sont traités conformément aux conseils pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire (Council of European Communities, 1987). L'eau et la nourriture sont données *ad libitum* durant toute l'expérience. Les animaux sont pesés deux fois par semaine, avant le gavage, et la quantité de nourriture ingérée est estimée quotidiennement.

Le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) est calculé comme suit :

$$\text{REN} = \frac{\text{Gain de poids (g)}}{\text{nourriture ingérée pour obtenir ce gain (g)}}$$

Entre le 21^{ème} et le 27^{ème} jour de l'expérience, les rats sont placés dans des cages à métabolisme et les fèces sont récupérées quotidiennement, débarrassées de toute nourriture, séchées dans une étuve à 50°C, pesées puis conservées à -20°C.

IV.2. Prélèvement du sang et des organes

Après 28 jours du protocole, et après une nuit de jeûne, les rats sont sacrifiés après anesthésie par injection intrapéritonéale d'une solution de pentobarbital sodique à raison de 60 mg.kg⁻¹ de poids corporel. Le sang est récupéré, par ponction aortique, dans des tubes secs, puis centrifugé (2000g, 20 min à 4°C). Le sérum ainsi obtenu est aliquoté dans des eppendorfs. Le foie, le cœur et l'aorte sont prélevés, rincés avec une solution glacée de NaCl à 0,9%, séchés, pesés et aliquotés. Tous les échantillons sont conservés à -40°C.

IV.3. Séparation des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont séparées par "*Fast Protein Liquide Chromatography*" (FPLC) qui est une chromatographie d'exclusion de taille (*Äkta-FPLC*, *Amersham Pharmacia Biotech*, *Espagne*) selon la méthode décrite par Hubáček *et al.*, (2008). Les sérums de chaque groupe sont poolés puis 150 µl sont injectés dans une colonne *Superose™ 6-10/300 GL* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, *Espagne*). Les échantillons sont élués par du PBS (tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM ; pH 7.4) avec un débit de 0,3 ml.min⁻¹ pour une pression de 0,57 MPa. La densité optique de l'éluât est suivie à 280 nm. Les fractions obtenues sont analysées pour leur teneur en cholestérol, en phospholipides, en apolipoprotéine AI et pour la propriété antioxydante des HDL.

IV.4. Dosages biochimiques au niveau sérique

IV.4.1. Mesure des activités transaminases

L'activité sérique de l'aspartate aminotransférase (ASAT) et de l'alanine aminotransférase (ALAT), est évaluée par le suivi, à 340 nm, de la vitesse d'oxydation du NADH, H⁺ en présence des substrats de chaque enzyme (*kit Spinreact*, *Espagne*). L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre lecteur de plaques (*Zenyth 200*, *Biochrom Ltd.*, *Japan*).

IV.4.2. Teneurs sériques en glucose, en acide urique et en albumine

Les teneurs sériques en glucose et en acide urique sont déterminées par méthode enzymatique colorimétrique, avec des kits (*Spinreact, Espagne*). Après oxydation du substrat par l'enzyme correspondante : glucose-oxydase et uricase, respectivement, il y a production de H_2O_2 qui réagit par la suite avec le couple phénol/4-aminophénazone (4-AF) dans une réaction catalysée par la peroxydase. Le chromogène formé par cette réaction (quinone imine) est mesuré à 505 nm, sur le spectrophotomètre lecteur de plaques, *Zenyth 200*.

Les concentrations sériques en albumine sont mesurées par méthode colorimétrique, au vert de bromocrésol (BCG) (*kit Biolabo, France*), sur un spectrophotomètre lecteur de plaques, *Zenyth 200*. Le principe de la méthode repose sur la réaction du vert de bromocrésol, en milieu tamponné à pH 4.2, avec l'albumine pour former un complexe coloré dont l'absorbance est mesurée à 630 nm.

IV.5. Dosage des lipides sériques, hépatiques et fécaux

Les teneurs en lipides sont déterminées directement sur le sérum ou après leur extraction des tissus et des fèces par la technique de Folch *et al.*, (1957).

IV.5.1. Extraction des lipides tissulaires

Le tissu est tout d'abord homogénéisé avec 20 volumes d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Après un temps de contact (1 h), 1 volume d'une solution de PBS est ajouté, puis l'homogénat est centrifugé (1600g, 20 min à 4°C). La phase du chloroforme (inférieure) est récupérée, séchée, pesée puis reprise dans l'isopropanol.

IV.5.2. Dosage des lipides

Les concentrations des différents lipides sont déterminées par méthodes enzymatiques colorimétriques par l'usage de kits. Tous les dosages sont basés sur un même principe ; le dosage spectrophotométrique d'un chromogène (la quinone imine) produit par la réaction de *Trinder*, dont le principe de la réaction est comme suit :



Le H_2O_2 , substrat de la réaction, est produit par différents systèmes enzymatiques, spécifiques pour chaque substrat à doser :

- Cholestérol total (CT) ; cholestérol estérase - cholestérol oxydase (*kit Spinreact, Espagne*).
- Cholestérol libre (CL) ; cholestérol oxydase (*kit Biolabo, France*).
- Triglycérides (TG) ; lipase - glycérol kinase - glycérol oxydase (*kit Spinreact, Espagne*).
- Phospholipides (PL) ; phospholipase D - choline oxydase (*kit Cypress, Belgique*).

L'absorbance du chromogène est mesurée à 505 nm, sur le spectrophotomètre *Zenyth 200* lecteur de plaques. Des standards correspondants à chaque substrat sont utilisés comme références dans les calculs des concentrations. La concentration des esters de cholestérol (CE) est obtenue par différence : $EC = CT - CL$.

IV.6. Analyse des lipoprotéines

IV.6.1. Dosage du cholestérol et des phospholipides au niveau des fractions

Les teneurs des lipoprotéines en CT et en PL sont déterminées par méthodes enzymatiques fluorimétriques en utilisant l'Amplex rouge (*Molecular Probes by Life Technologies, Etats-Unis*). Le dosage est basé sur le même principe du dosage enzymatique colorimétrique cité précédemment pour ces lipides à la différence que l'indicateur est substitué par le 10-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (Amplex rouge). En présence d'une peroxydase (*Sigma life sciences, Etats-Unis*), le H_2O_2 oxyde l'Amplex rouge en un composé fluorescent ; la Résorufine (longueurs d'ondes d'excitation = 560 nm et d'émission = 584 nm), mesurée par un fluorimètre (*Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detectors, Etats-Unis*).

IV.6.2. Teneurs en apolipoprotéines

Les apolipoprotéines (apo) AI, AIV et B sont mesurées par méthode immuno-enzymatique (ELISA indirecte) sur des microplaques Maxisorp (*Nunc. Thermo Fisher, Danemark*). Le principe de la technique consiste à fixer l'antigène à mettre en évidence sur un support, à qui on ajoute un anticorps qui lui est spécifique (anticorps primaire). Un deuxième anticorps, dirigé contre le premier (anti-anticorps ou anticorps secondaire), conjugué à une enzyme est ensuite ajouté. L'addition d'un substrat spécifique à l'enzyme utilisée produit une coloration dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'antigène étudié.

100 µl de sérum ou de fraction de HDL, convenablement dilués dans un tampon de bicarbonate (0,2 M ; pH 9.6), sont déposés dans chaque puits et incubés toute une nuit à 4°C. Après, les molécules non adhérentes à la plaque sont éliminées et 200 µl d'une solution de blocage sont ajoutés et laissés pendant 30 min à température ambiante. Après 3 lavages avec le tampon Tris salin contenant 0,2% de TWEEN®-20 (TBST : Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM ; pH 8.0), 100 µl d'une solution d'anticorps primaire dilué, spécifique à l'apo analysée, sont ajoutés et incubés 1,5 h à 37°C. Les anticorps primaires utilisés dans ce dosage sont :

- IgG anti apo AI de rat, générées chez le lapin (*Biodesign, Saco, Etats-Unis*).
- IgG anti apo AIV de rat, générées chez la chèvre (*Santa Cruz Biotechnology, Etats-Unis*).
- IgG anti apo B de rat, générées chez le lapin (*Biodesign, Saco, Etats-Unis*).

Après incubation de l'anticorps primaire, les puits sont lavés 3 fois avec le TBST. Ensuite, 100 µl anticorps conjugué à la phosphatase alcaline, dirigé contre l'anticorps primaire, sont ajoutés à chaque puits et incubés 1,5 h à 37°C. Les anticorps secondaires sont :

- Immunoglobuline anti IgG de lapin (*sigma life science, Etats-Unis*).
- Immunoglobuline anti IgG de chèvre (*sigma life science, Etats-Unis*).

Après un lavage de la plaque avec le TBST, 200 µl d'une solution de p-nitrophényl phosphate à 0,1% (dans un tampon de diéthanolamine 0,5 mM contenant 10% de MgCl₂ ; pH 9.8) sont ajoutés et incubés 20 min à 37°C. La lecture de l'absorbance est faite à 405 nm dans un lecteur de plaques *Beckman Coulter, DTX 880*.

IV.7. Evaluation du statut redox

IV.7.1.Préparation des homogénats tissulaires

Dans un homogénéiseur (*IKA Ultra-Turrax T25 basic, Werke, Allemagne*), environ 50 à 100 mg de foie, de cœur ou d'aorte sont homogénéisés avec 10 volumes de TBS (tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM ; pH 7.4). Le mélange est ensuite centrifugé 15 min à 2000g et à 4°C. Des aliquotes de surnageant sont prélevées dans des tubes Eppendorfs et conservées à -40°C.

IV.7.2.Teneurs tissulaires en protéines

Les teneurs tissulaires en protéines sont mesurées par la technique de Lowry, (1951). En milieu alcalin, les ions Cu²⁺ se fixent (en présence de tartrate) sur les liaisons peptidiques ce qui conduit à leur réduction en Cu⁺. Les ions Cu⁺ et les radicaux Trp, Tyr et Cys réduisent

ensuite le complexe acide phosphotungstique/acide phosphomolybdique du réactif Folin-Ciocalteu (couleur jaune) pour donner une couleur bleue mesurable à 750 nm.

IV.7.3. Teneurs en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS)

Le principe de la technique repose sur le fait que les molécules de malondialdéhyde (MDA) soient libérées par hydrolyse acide à chaud et réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe de couleur rose (mesurable à 535 nm).

L'homogénat est mélangé avec une solution glacée d'acide trichloroacétique à 20% (1/2, v/v) et centrifugé à 2000g pendant 20 min à 4°C. Dans des tubes en verre hermétiquement fermés, un volume du surnageant est mélangé avec le même volume (1/1, v/v) d'une solution de HCl 0,1N saturée en TBA (0,3%) et contenant 2% de BHT, préalablement dilué dans l'éthanol (le pH de la solution est ajusté à 2.5). Le tout est incubé dans un bain Marie à 95°C (Rice-Evans *et al.*, 1991). Après 60 min d'incubation, les tubes sont refroidis et le contenu des tubes est repris pour la lecture de la densité optique. La concentration des TBARS est calculée selon la loi de Beer-Lamber, avec : $\varepsilon = 156 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

IV.7.4. Evaluation de la défense antioxydante

a. Propriété antioxydante des HDL

La susceptibilité des VLDL à l'oxydation, et le potentiel des HDL à prévenir cette oxydation chez les rats, traités ou non avec l'isolat protéique ou avec les hydrolysats, sont mesurés selon la méthode de Navab *et al.*, (2001), utilisant le 2',7'-dichloro-dihydrofluoresceine (DCF) comme marqueur d'oxydation.

1 volume de fractions VLDL (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cholestérol) et 1 volume de fractions HDL (4 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de cholestérol) sont mélangés avec 1/2 volume d'une solution d'azide de sodium (0,12%) et 1/2 volume d'une solution de DCF-diacétate (80 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ préparé dans du NaOH). Le tout est incubé 3 heures à 37°C et la fluorescence du DCF est ensuite mesurée (485 nm d'excitation et 535 nm d'émission). Un blanc sans lipoprotéines est préparé dans les mêmes conditions.

La propriété antioxydante des HDL est calculée comme suit :

$$\text{Propriété antioxydante (\%)} = \left(1 - \frac{\text{fluorescence DCF en présence des HDL}}{\text{fluorescence DCF en absence des HDL}}\right) \times 100$$

Pour l'analyse de la susceptibilité des VLDL à l'oxydation, les échantillons sont traités dans les mêmes conditions, mais sans HDL. Les échantillons sont analysés en "duplicate".

b. Dosage des groupements thiols au niveau tissulaire

Le dosage des thiols est basée sur la réaction d'oxydation des groupements -SH avec l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) (*Sigma Aldrich, Etats-Unis*), libérant ainsi de l'acide 5-thio 2-nitrobenzoïque (TNB) de couleur jaune qui absorbe à 412 nm (Sedlak et Lindsay, 1968). La concentration est calculée au moyen du coefficient d'absorption molaire : $\epsilon = 14,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Eyer *et al.*, 2003).

c. Activité Arylestérase (aryldialkylphosphatase ; EC 3.1.8.1)

La paraoxonase (PON1) possède une activité arylestérase qui peut hydrolyser l'acétate de phényle en phénol. La vitesse d'apparition du phénol peut être suivie à 270 nm à 25°C. Un volume de sérum est ajouté à 1 ml d'une solution tris/HCl (20 mM ; pH 8.0) contenant 4 mM d'acétate de phényle et 1 mM de CaCl₂. L'activité enzymatique est calculée avec le coefficient d'extinction molaire du phénol ($\epsilon = 1310 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), et elle est exprimée en U.ml⁻¹ (Eckerson *et al.*, 1983). Une unité paraoxonase correspond à la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 µmol.ml⁻¹ d'acétate de phényle par minute.

d. Activité Glutathion Réductase (EC 1.6.4.2)

L'activité glutathion réductase (GSSG-Red) est déterminée par une méthode enzymatique colorimétrique, en suivant la cinétique d'oxydation du NADPH à 340 nm en présence du glutathion oxydé (*kit Cayman, Etats-Unis*). Une unité de cette enzyme est définie comme la quantité d'enzyme capable d'oxyder 1 µM de NADPH par minute.

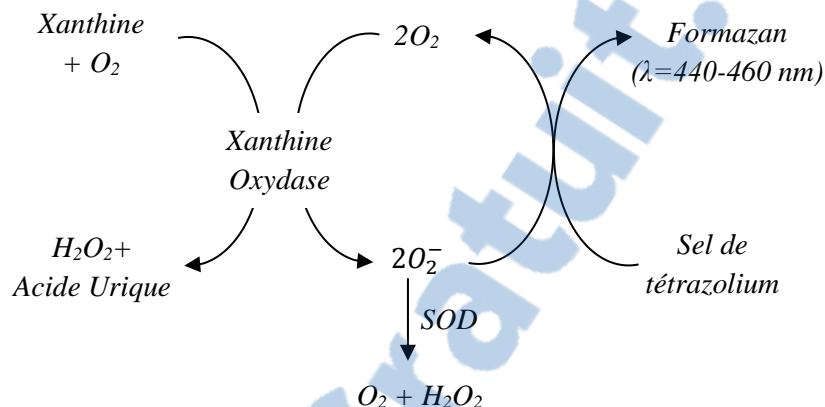


e. Activité Catalase (EC 1.11.1.6)

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en dioxygène. Pour la mesurer, il suffit de suivre la décroissance de la densité optique, à 240 nm, d'une solution de H₂O₂ à 10 mM en présence de l'échantillon à tester. Une unité catalase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la décomposition de 1 µmole de H₂O₂ par minute, et elle est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire : $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Aebi, 1984).

f. Activité Superoxyde Dismutase (EC 1.15.1.1)

L'activité superoxyde dismutase (SOD) est mesurée par une méthode colorimétrique (*Kit Cayman, Etats-Unis*) qui utilise le sel de tétrazolium pour détecter les radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase. Une unité SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour la dismutation de 50% du radical superoxyde.



V. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart type (ET). Après analyse de la Variance (Anova à un facteur), la classification des moyennes est effectuée par le test LSD-Fisher (*Logiciel Statistica, Version 6.1, Stat soft 2004*). Les moyennes portant des lettres ou signes distincts sont significativement différentes à $P \leq 0,05$.

Résultats

I. Caractérisation de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec

L'extraction des protéines de fenugrec par précipitation au point isoélectrique dans les conditions citées a permis d'obtenir un isolat protéique d'une pureté de 80% (tableau 6).

Tableau VI. Composition chimique des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats.

%	IPF	PFHP	PFHE
Protéines	80,3±1,8 ^c	89,9±0,2 ^b	92,3±0,5 ^a
Lipides	8,4±0,3 ^a	2,8±0,2 ^c	3,3±0,4 ^b
Fibres	4,3±0,3 ^a	3,0±0,1 ^b	2,0±0,1 ^c
Humidité	2,7±0,4 ^a	1,0±0,1 ^b	1,1±0,1 ^b
Cendres	2,2±0,6	1,8±0,2	1,3±0,3
Glucides*	2,1	1,5	< 1

*: Teneur calculée par différence.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des lettres distinctes (a,b,c) sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

I.1. Cinétique et degré d'hydrolyse

Le suivi de l'hydrolyse de l'isolat protéique, *via* le calcul du degré d'hydrolyse, a donné deux profils différents selon l'enzyme utilisée. Comme il est montré dans la figure 12, la cinétique d'hydrolyse avec les deux enzymes est caractérisée par une phase initiale très rapide. Cependant, cette phase initiale d'hydrolyse en présence de l'Espérase prend plus de temps pour atteindre le plateau, comparée à celle de la Purafect (60 min *vs.* 15 min, respectivement). De plus, avec un même rapport E/S, le degré d'hydrolyse obtenu avec l'Espérase (DH=19%) est largement supérieur à celui de la Purafect (DH=9%).

I.2. Profil électrophorétique de l'isolat et des hydrolysats des protéines (figure 13)

Le profil électrophorétique en conditions dénaturantes de l'isolat de protéines de fenugrec (colonne A), analysé par une SDS-PAGE, se caractérise par la présence de six bandes. Après hydrolyse, les bandes 1, 2, 3 et 4 ont disparu avec l'Espérase, alors qu'avec la Purafect la bande 3 subsiste, mais elle est moins dense. Par ailleurs, les bandes 5 et 6 présentes dans l'isolat protéique (A) se retrouvent également dans les hydrolysats (B et C) mais avec une plus forte densité.

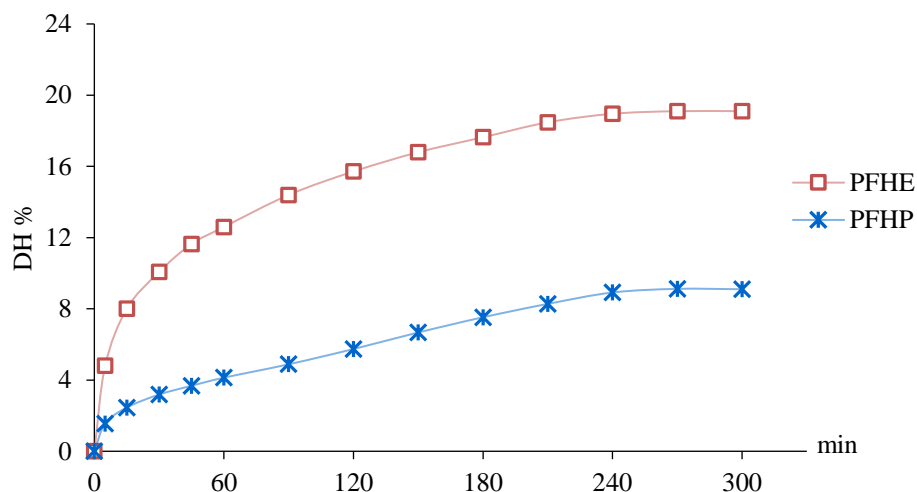


Figure 12. Courbe de la cinétique d'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect.

E/S=5 U.mg⁻¹ protéine, [protéines]=5%.

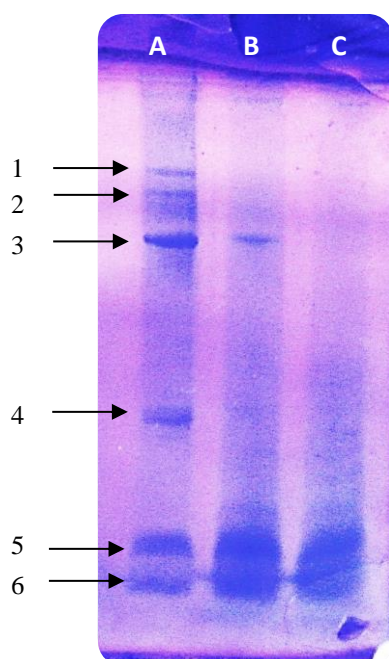


Figure 13. Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (20%) de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.

(A) IPF, (B) PFHP, (C) PFHE

I.3. Répartition des protides en fonction de leur poids moléculaire (figure 14)

Comparées aux PFHP (DH=9%), PFHE (DH=19%) contiennent moins de protides de poids moléculaire (PM) >30 kDa (68% vs. 42%, respectivement), et plus de protides de PM compris entre 10-30 kDa et particulièrement pour la fraction <5 kDa qui en contient 3,5-fois plus.

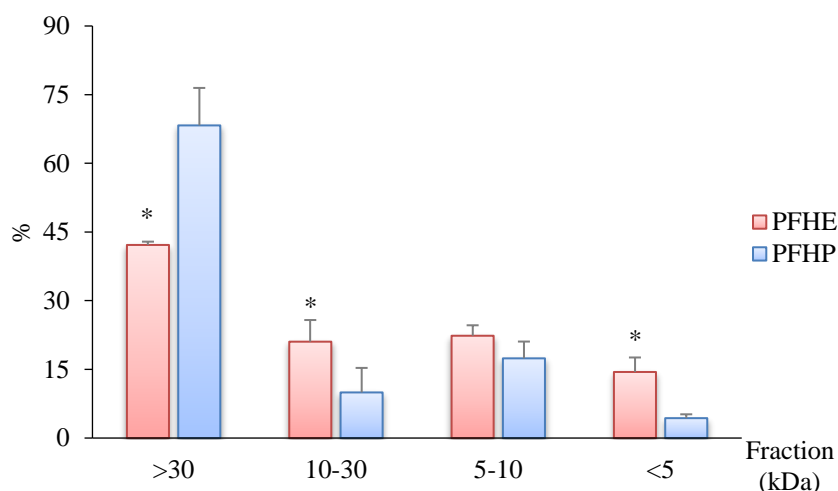


Figure 14. Distribution, exprimé en pourcentage pondéral, des protides issus de l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase (PFHE) et la Purafect (PFHP).

$$\text{Pourcentage pondéral de la fraction (\%)} = \frac{\text{masse pondérale de la fraction}}{\text{somme des masses pondérales des fractions}}$$

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant un signe sont significativement différentes à $P \leq 0,05$ (* : PFHE vs. PFHP).

I.4. Composition chimique et composition en acides aminés

La composition chimique, ainsi que la composition en acides aminés des protéines de fenugrec, hydrolysées ou non, sont résumées dans les tableaux 6, 7 et 8. Les teneurs de l'IPF en protéines sont augmentées après hydrolyse (92,3% dans PFHE et 89,9% dans PFHP vs. 80,3% dans IPF).

A l'exception des teneurs en protéines, celles de tous les autres constituants sont diminuées après hydrolyse avec les deux enzymes. En effet, les teneurs en fibres, en hydrates de carbone, en eau et particulièrement en lipides sont diminuées dans les hydrolysats comparés à l'IPF. Ces derniers (lipides) sont, respectivement, 2,5- et 3-fois plus faibles dans les PFHE et les PFHP comparées à l'IPF.

Les teneurs en acides aminés (AA) (tableau 7) indiquent que les protéines de fenugrec sont principalement constituées d'AA diacides (Asp+Glu) en plus de la leucine et du tryptophane. En parallèle, les AA soufrés sont les moins abondants.

Tableau VII. Composition en acides aminés de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.

%	IPF	PFHP	PFHE
Cys	0,7±0,1 ^b	0,8±0,1 ^b	0,9±0,0 ^a
Met	0,8±0,1 ^b	1,0±0,0 ^a	1,0±0,0 ^a
Asp/Asn	11,4±0,1	11,2±0,0	12,6±0,3 ^a
Thr	3,6±0,1 ^c	4,7±0,0 ^a	3,9±0,1 ^b
Ser	5,0±0,2 ^a	3,9±0,1 ^b	3,9±0,1 ^b
Glu/Gln	12,7±0,4 ^b	14,0±0,1 ^a	14,3±0,2 ^a
Pro	3,9±0,1 ^a	3,5±0,0 ^b	3,2±0,2 ^c
Gly	3,5±0,2	3,8±0,1	3,5±0,1
Ala	5,9±0,2	5,8±0,1	5,9±0,2
Val	6,1±0,2 ^a	5,2±0,1 ^b	5,0±0,1 ^b
Ile	6,5±0,2 ^a	5,7±0,2 ^b	6,0±0,0 ^b
Leu	9,6±0,1 ^c	11,1±0,1 ^a	10,0±0,2 ^b
Tyr	2,7±0,3	3,1±0,0	2,9±0,2
Phe	3,5±0,1 ^a	3,4±0,0 ^{ab}	3,2±0,0 ^b
Lys	5,6±0,3	5,7±0,2	5,8±0,0
His	3,1±0,2 ^a	2,5±0,1 ^b	2,7±0,1 ^b
Trp	11,6±0,2 ^a	10,3±0,0 ^c	11,1±0,1 ^b
Arg	4,2±0,1	3,9±0,1	4,0±0,2
AAH	51,4	49,4	49,0
AAE/AAT	0,47	0,46	0,47
AAA	17,9	16,8	17,2
AACP	12,9	12,5	12,2
AACN	24,1	25,2	26,9

AAH : acide aminés hydrophobes (Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, Pro, Met, Cys) ;

AAE : acides aminés essentiels (Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, Ile) ;

AAT : acides aminés totaux.

AAA : acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) ;

AACP : acides aminés chargés positivement (Arg, His, Lys) ;

AACN : acides aminés chargés négativement (Asp, Glu).

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des lettres distinctes (a,b,c) sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

Après hydrolyse, il y a eu une faible augmentation des acides aminés soufrés (Cys+Met) ($P=0,03$). Il est aussi noté une augmentation des teneurs en Glu+Asp, thréonine et leucine après hydrolyse des protéines, tandis que la sérine, la proline, la valine, l'isoleucine, l'histidine et le tryptophane sont diminués. Le changement le plus important est celui de l'acide glutamique qui est augmenté de 2,8% après hydrolyse avec l'Espérase. En outre, l'hydrolyse des protéines de fenugrec n'a pas modifié le rapport AA essentiels/AA totaux, et les teneurs en AA hydrophobes.

Le potassium, les sulfures et le phosphore représentent les éléments inorganiques les plus abondants dans l'isolat des protéines, tandis que le sélénium et le sodium sont les moins abondants (tableau 8). Les concentrations des ions analysés sont diminuées après l'hydrolyse, à l'exception du sodium, qui est respectivement 3,2- et 3,8-fois plus élevé dans les PFHE et les PFHP vs. l'IPF. Tandis que le sélénium est resté inchangé.

Tableau VIII. Teneurs en minéraux de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.

	IPF	PFHP	PFHE
Potassium (mg.100 g ⁻¹)	1495±04 ^a	986±05 ^c	1001±01 ^b
Sulfures (µg.g ⁻¹)	2168±94 ^a	1128±05 ^c	1268±48 ^b
Phosphore (µg.g ⁻¹)	2994±22 ^a	1933±07 ^b	1927±11 ^b
Magnésium (µg.g ⁻¹)	1326±45 ^a	1013±04 ^b	985±09 ^c
Calcium (µg.g ⁻¹)	915±10 ^a	636±02 ^b	502±14 ^c
Sodium (µg.g ⁻¹)	32±0,4 ^c	122±04 ^a	110±03 ^b
Sélénium (µg.kg ⁻¹)	50±03	53±01	52±01

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des lettres distinctes (a,b,c) sont significativement différentes ($P\leq0,05$).

II. Propriété antioxydante *in vitro* de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec

II.1. Propriété de piégeage du radical DPPH

Les résultats présentés dans la figure 15 montrent que l'activité inhibitrice du radical DPPH par l'IPF est concentration dépendante. Après l'hydrolyse des protéines, cette activité augmente et atteint 100% avec les 4 mg.ml⁻¹ de PFHE. La CI₅₀, qui exprime la concentration de l'antioxydant nécessaire pour inhiber 50% de DPPH, est égale à 0,75 mg.ml⁻¹ pour les PFHE et 3 mg.ml⁻¹ pour l'IPF et les PFHP.

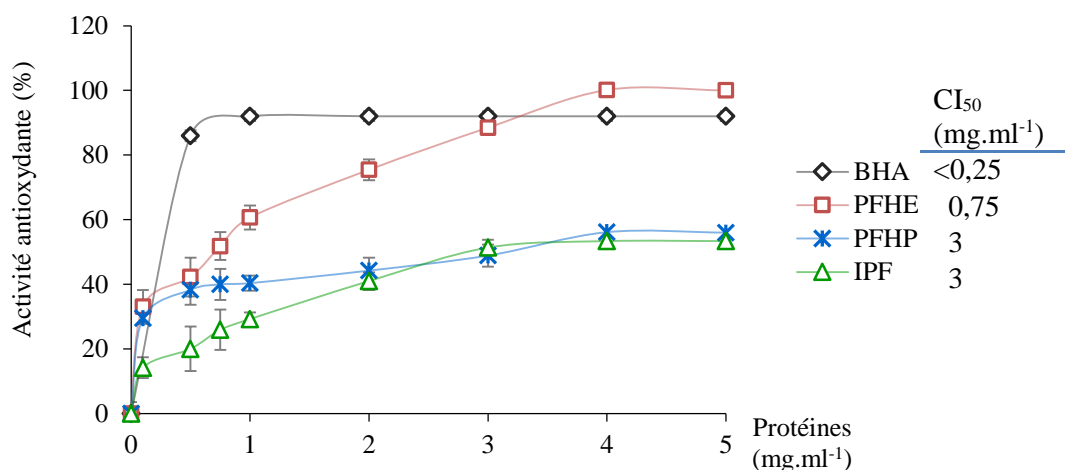


Figure 15. Pouvoir inhibiteur du radical DPPH par l'isolat et les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 3 échantillons.

Après fractionnement, les résultats montrent que les fractions >30, 5-10 et <5 kDa des PFHE ont une activité antioxydante (AOx) supérieure à 50% (figure 16). Cette activité est similaire à celle de leur hydrolysats et au BHT. Pour ce qui est des PFHP, c'est la fraction <5 kDa qui présente l'activité la plus intéressante et dont la valeur est 1,6-fois plus élevée comparée à celle de son hydrolysats.

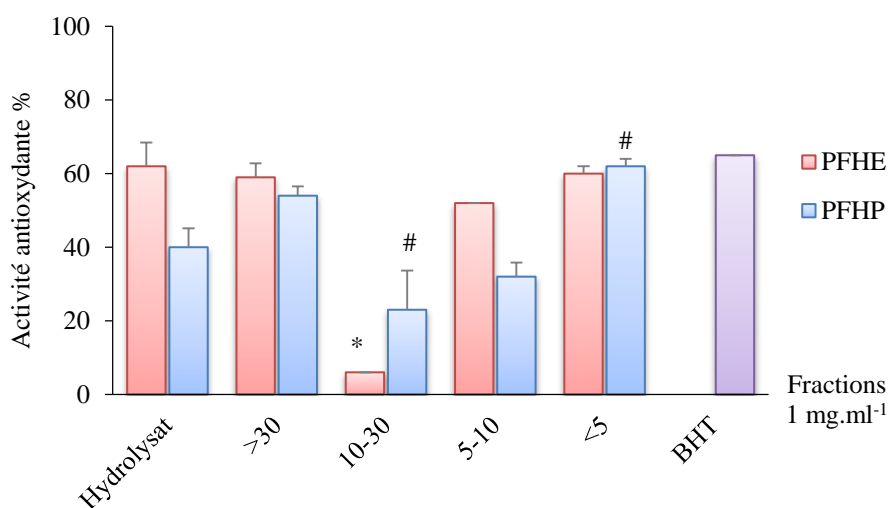


Figure 16. Pouvoir inhibiteur du radical DPPH par les différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes distincts sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : fractions PFHE vs. hydrolysats PFHE ;

: fractions PFHP vs. hydrolysats PFHP.

II.2. Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP)

D'après les résultats de la figure 17, le pouvoir réducteur de l'ion ferrique augmente avec la concentration de l'isolat et des hydrolysats des protéines de fenugrec. Les hydrolysats montrent un meilleur pouvoir réducteur de l'ion Fe^{3+} , comparés à l'isolat des protéines. A faibles concentrations (0,1 et 0,25 mg.ml^{-1}), les PFHE ont un pouvoir réducteur des ions ferriques plus efficace que celui des PFHP. A une concentration de 0,25 mg.ml^{-1} , le FRAP des PFHE est 2,4- et 2,1-fois plus élevé comparé à celui de l'IPF et des PFHP, respectivement.

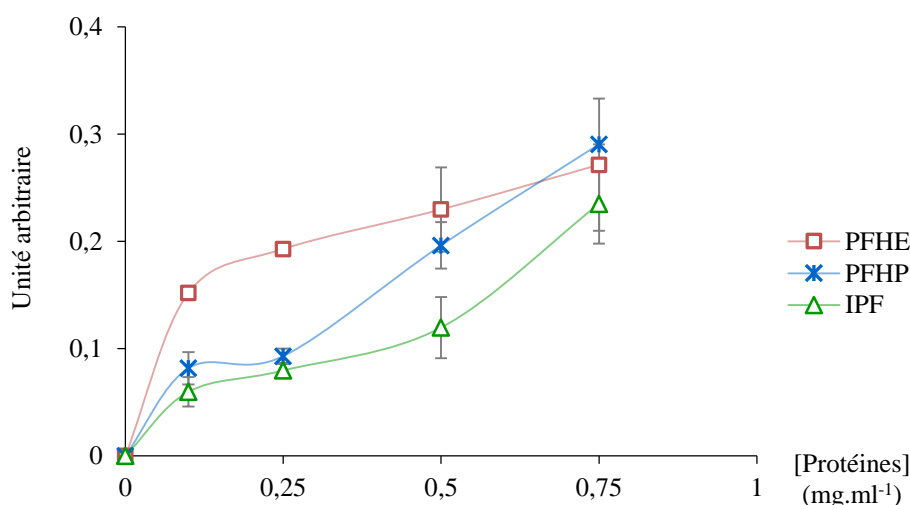


Figure 17. Pouvoir réducteur de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET de 3 échantillons.

Après fractionnement, ce sont les fractions >30 kDa et <5 kDa des PFHP qui montrent le pouvoir réducteur le plus important comparées à leur hydrolysats (figure 18).

II.3. Pouvoir inhibiteur de la décoloration du β -carotène

Comparée à celle de l'IPF, l'activité inhibitrice de la décoloration du β -carotène est plus élevée avec les hydrolysats pour toutes les concentrations, avec un CI_{50} de l'ordre de 0,1 et 0,14 mg.ml^{-1} pour les PFHP et les PFHE, respectivement, contre 0,36 mg.ml^{-1} pour IPF. Pour des concentrations élevées, le pouvoir antioxydant des deux hydrolysats devient similaire à celui du BHA (figure 19).

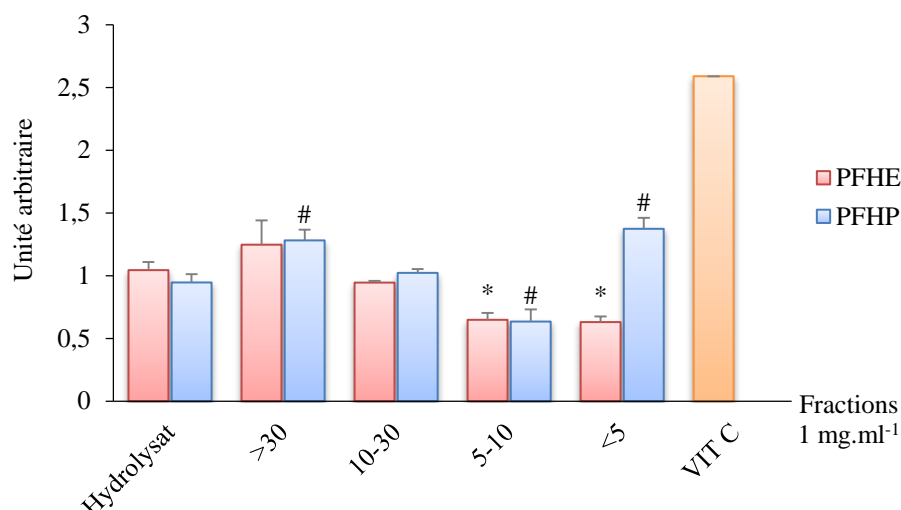


Figure 18. Pouvoir réducteur des différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes distincts sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : fractions PFHE vs. hydrolysate PFHE ;

: fractions PFHP vs. hydrolysate PFHP.

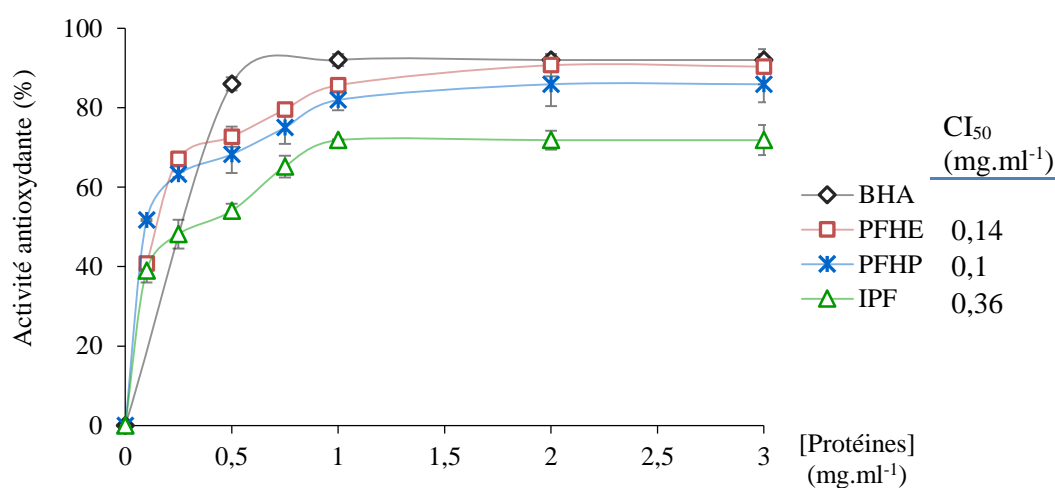


Figure 19. Pouvoir inhibiteur de la décoloration du β -carotène par l'isolat et les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET de 3 échantillons.

II.4. Protection contre la dégradation oxydative de l'ADN

Dans la colonne A du gel d'agarose (figure 20), qui représente la migration d'un ADN plasmidique sans aucun traitement, il y a apparition de deux bandes distinctes. En revanche, lorsque le plasmide est incubé avec le réactif Fenton (B, C), les deux bandes disparaissent totalement pour ne laisser apparaître qu'une légère bande intermédiaire et une large bande d'une intensité légère parcourant le long de la colonne.

Lorsque le plasmide est incubé avec le réactif de Fenton en présence de l'IPF (D), on assiste à une conservation des deux bandes du plasmide. Cependant, la bande supérieure semble plus dense comparée à celle du témoin dans la colonne (A). De plus, une troisième bande apparaît dans la colonne entre les formes circulaire et superenroulée. Lorsque le plasmide est incubé en présence des deux hydrolysats, le profil de migration devient identique au plasmide natif.

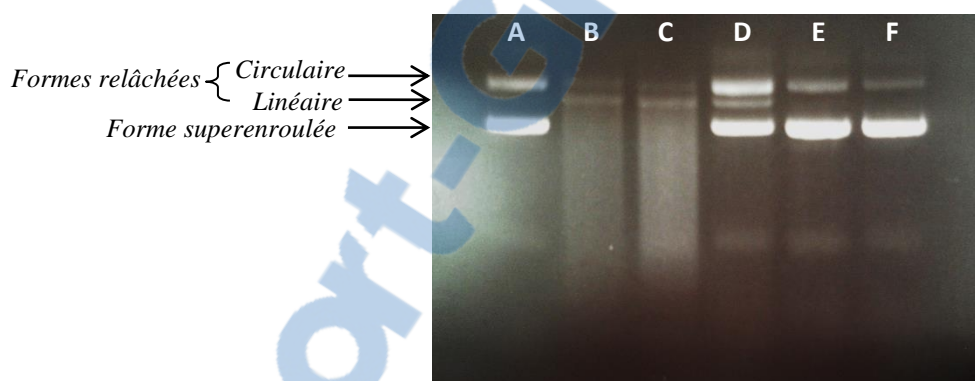


Figure 20. Pouvoir protecteur de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec contre la dégradation oxydative de l'ADN.

(A) : plasmide natif pCRIITMTOPODNA (0.5 µg) ; (B, C) : plasmides incubés avec le réactif de Fenton à 37°C ; (D, E, F) : plasmides incubés avec le réactif de Fenton, à 37°C, en présence de 1 mg.ml⁻¹ de IPF, PFHE ou PFHP, respectivement.

III. Propriétés *in vivo* de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec

III.1. Influence de l'apport en isolat et en hydrolysats de protéines de fenugrec sur les rapports nutritionnels, l'évolution du poids corporel et le poids relatif des organes

Après 28 jours d'expérimentation, la nourriture ingérée, ainsi que le rapport d'efficacité nutritionnelle, sont restés inchangés chez tous les groupes de rats (tableau 9).

Tableau IX. Effet de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec sur la prise alimentaire, le rapport d'efficacité nutritionnelle (REN) et l'excrétion fécale du cholestérol.

	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
Nourriture ingérée (g.jour ⁻¹)	17±02	19±04	22±05	19±05	20±03
REN	0,13	0,12±0,05	0,08±0,00	0,12±0,01	0,11±0,03
Cholestérol fécal (mg.g ⁻¹ feces)	1,8±0,3	19,3±5,8*	50,6±6,9*#	17,6±1,5*	21,6±8,3*

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

Comparés aux rats témoins, les rats HC présentaient une excrétion fécale du cholestérol 10,7-fois plus élevée. Cette excrétion est plus importante chez le groupe IPF où elle est 2,6-fois plus élevée par rapport à celle du groupe HC, tandis que chez les autres groupes (PFHP et PFHE comparés aux rats HC), elle est restée similaire (tableau 9).

Le poids des animaux a évolué de manière harmonieuse durant la période de l'expérimentation. Cependant, aucune différence significative de poids n'est relevée entre les différents groupes de l'expérience (figure 21).

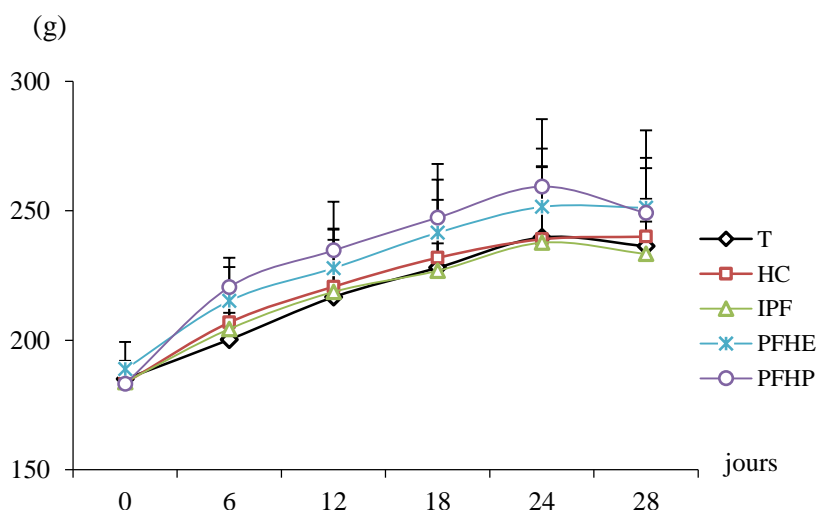


Figure 21. Evolution du poids des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe.

Le poids relatif du foie est 1,3-fois plus élevé chez tous les groupes consommant le régime hypercholestérolémiant comparés au groupe témoin. Cependant, aucune différence significative dans le poids relatif du cœur ou du tissu adipeux n'est notée (tableau 10).

Tableau X. Poids relatif du foie, du cœur et du tissu adipeux chez des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

%	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
Foie	2,79±0,12	3,73±0,23*	3,81±0,20*	3,66±0,27*	3,76±0,23*
Cœur	0,33±0,01	0,31±0,04	0,33±0,03	0,32±0,03	0,32±0,02
Tissu adipeux épididymaire	1,63±0,24	1,51±0,29	1,38±0,15	1,23±0,19	1,36±0,20

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

$$\text{Poids relatif d'un organe} = \frac{\text{poids de l'organe}}{\text{poids corporel de l'animal}} \times 100.$$

III.2. Paramètres biochimiques sériques (Tableau 11)

Les résultats montrent que la glycémie des rats soumis au régime hypercholestérolémiant est augmentée de 34% %. Par contre, chez le groupe IPF vs. HC, la glycémie a diminuée de 25%.

Les teneurs sériques en albumine et en thiols sont restées inchangées entre les groupes, alors que les teneurs en acide urique sont significativement augmentées chez le groupe HC vs. T. Comparé au groupe HC, il n'y a pas de différence des teneurs sériques en acide urique chez les groupes IPF et PFHE, tandis que chez le groupe PFHP, l'acide urique est significativement augmenté de 11%.

Les activités ASAT et ALAT des rats HC ne présentent aucune différence significative comparées à celles du groupe T. En revanche, l'activité ASAT est significativement diminuée chez les groupes IPF et PFHE (47 U.l⁻¹) comparés au groupe HC (70 U.l⁻¹). Par ailleurs, l'activité ALAT est restée inchangée entre les groupes.

Tableau XI. Paramètres biochimiques sériques et activités des transaminases chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
Glycémie (g.l ⁻¹)	0,59±0,04	0,90±0,11*	0,67±0,09 [#]	0,88±0,12*	0,68±0,14
Albumine (g.l ⁻¹)	26±04	28±03	28±03	27±04	24±03
Thiols (mM)	0,19±0,06	0,49±0,26	0,32±0,13	0,44±0,17	0,37±0,12
Acide urique (μM)	125±09	153±08*	159±10*	171±16* [#]	158±14*
ASAT (U.l ⁻¹)	58±09	70±07	47±06 [#]	72±11	47±07 [#]
ALAT (U.l ⁻¹)	20±03	23±05	27±07	26±07	29±08

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

III.3. Teneurs sériques en lipides (figure 22)

Comparée aux valeurs du groupe témoin, la cholestérolémie et la triglycéridémie chez le groupe HC sont significativement augmentées de 4,4- et 1,6-fois, respectivement. Chez les animaux recevant un apport journalier de 200 mg de l'IPF pendant 28 jours, le CT a diminué de 55% par rapport au groupe HC, et a atteint des valeurs similaires à celles du groupe témoin. De même, chez les animaux recevant PFHE vs. HC, le CT est diminué de 34%. Cette diminution de la cholestérolémie reflète une diminution du cholestérol libre (-34%) et des esters de cholestérol (-60%) chez le groupe IPF, alors que chez le groupe PFHE, seul les esters de cholestérol sont diminués (-38%).

Par rapport au groupe HC, les TG sériques sont 1,2-fois plus faibles chez le groupe IPF. D'autre part, les PL sont également diminués de 1,4-fois au niveau sérique chez le groupe IPF vs. HC. Cependant, aucune différence significative n'est notée pour les TG et les PL chez les groupes traités avec les hydrolysats comparés au groupe HC non traité.

III.4. Répartition du cholestérol et des phospholipides dans les lipoprotéines

Chez le groupe témoin, la majeure partie du cholestérol sérique est transportée par les HDL, alors que chez le groupe HC, il est surtout porté par les VLDL. Chez les rats IPF et PFHE,

le cholestérol-VLDL (C-VLDL) est diminué, par rapport au groupe HC. Cette diminution est plus importante chez le groupe IPF. Lorsque le groupe PFHE est comparé à HC, on note une légère augmentation du C-HDL (figure 23).

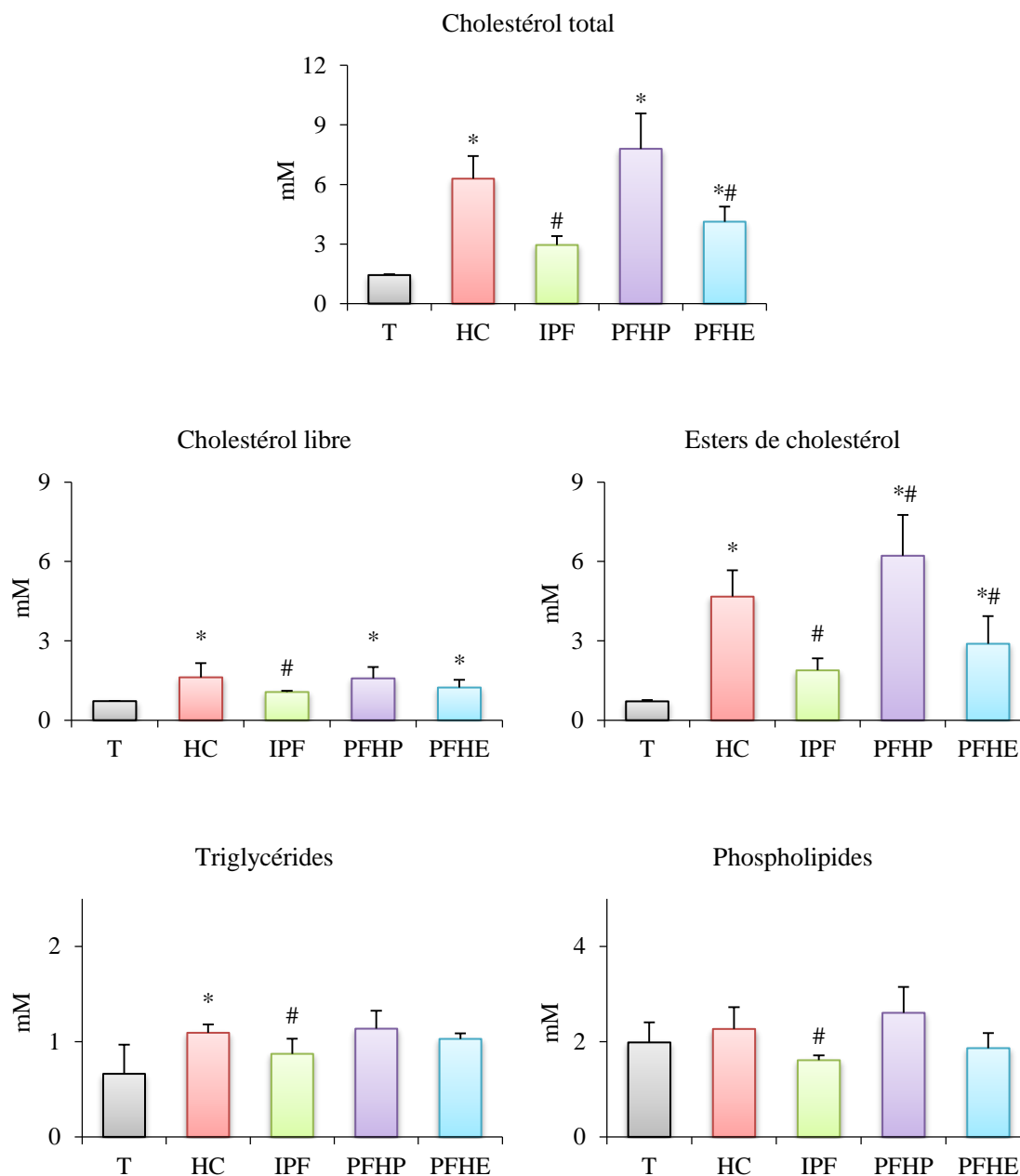


Figure 22. Teneurs en lipides sériques chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

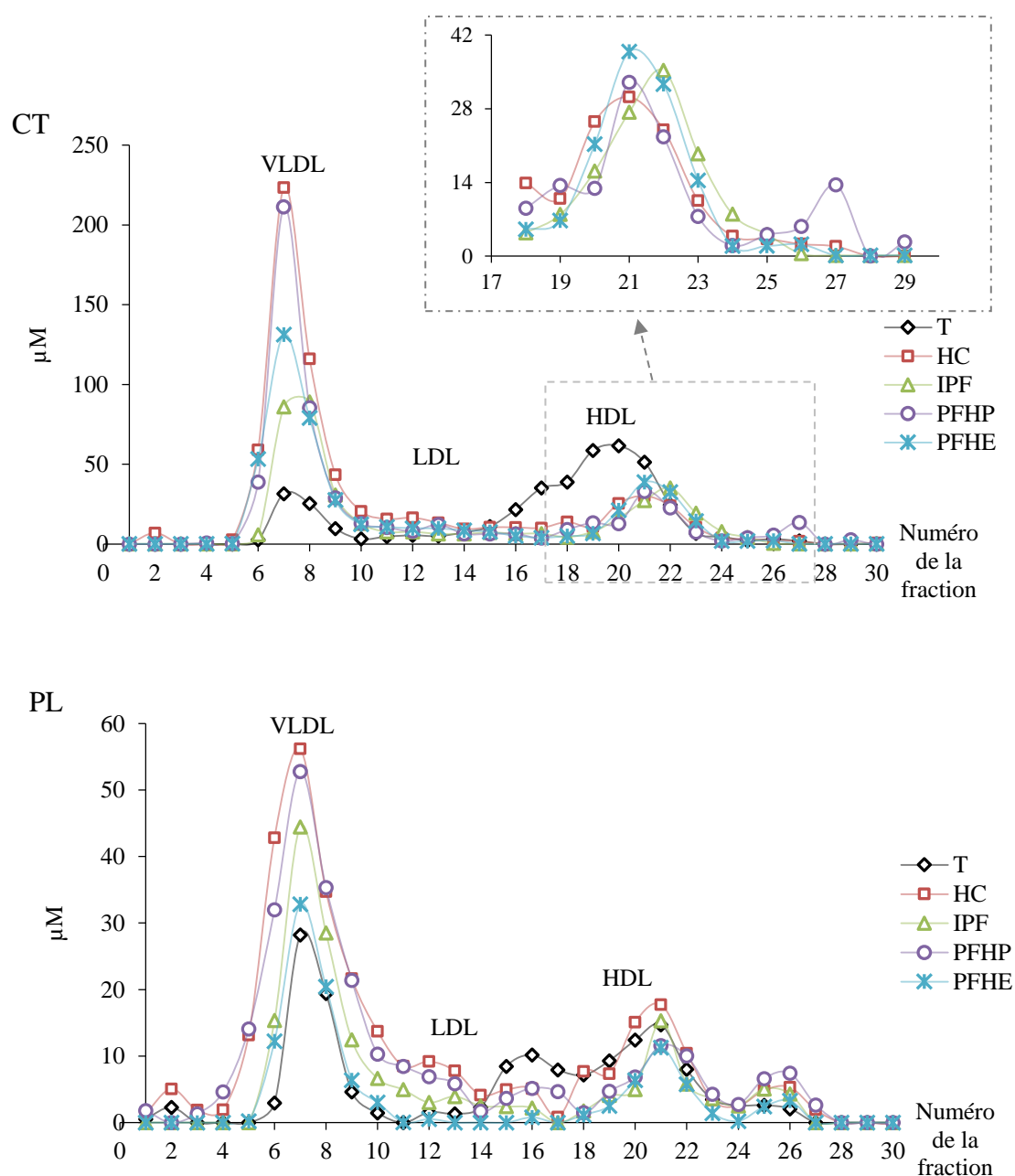


Figure 23. Répartition du cholestérol (CT) et des phospholipides (PL) dans les différentes fractions des lipoprotéines des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Chaque profil représente le résultat d'un pool de 6 sérums de rats de chaque groupe.

Les phospholipides sont principalement transportés par les VLDL chez tous les groupes. Les plus fortes valeurs sont notées chez les rats HC. Par comparaison aux rats HC, les PL-VLDL sont diminués chez les rats IPF et PFHE. Chez le groupe PFHE, les valeurs se rapprochent de ceux des rats T. Pour la fraction HDL, il y a eu une diminution des PL chez les groupes traités vs. HC (figure 23).

III.5. Teneurs sériques en apolipoprotéines AI, AIV et B

Aucune différence significative dans les teneurs sériques en apo AI et B n'est observée entre les groupes HC et T, ni même entre les groupes traités et HC (figure 24). La distribution de l'apo AI dans les HDL montre une diminution de cette apolipoprotéine dans les HDL de diamètre large chez les rats IPF comparés au groupe témoin. En revanche, une diminution de 20% des teneurs sériques en apo AIV est notée chez le groupe IPF vs. HC.

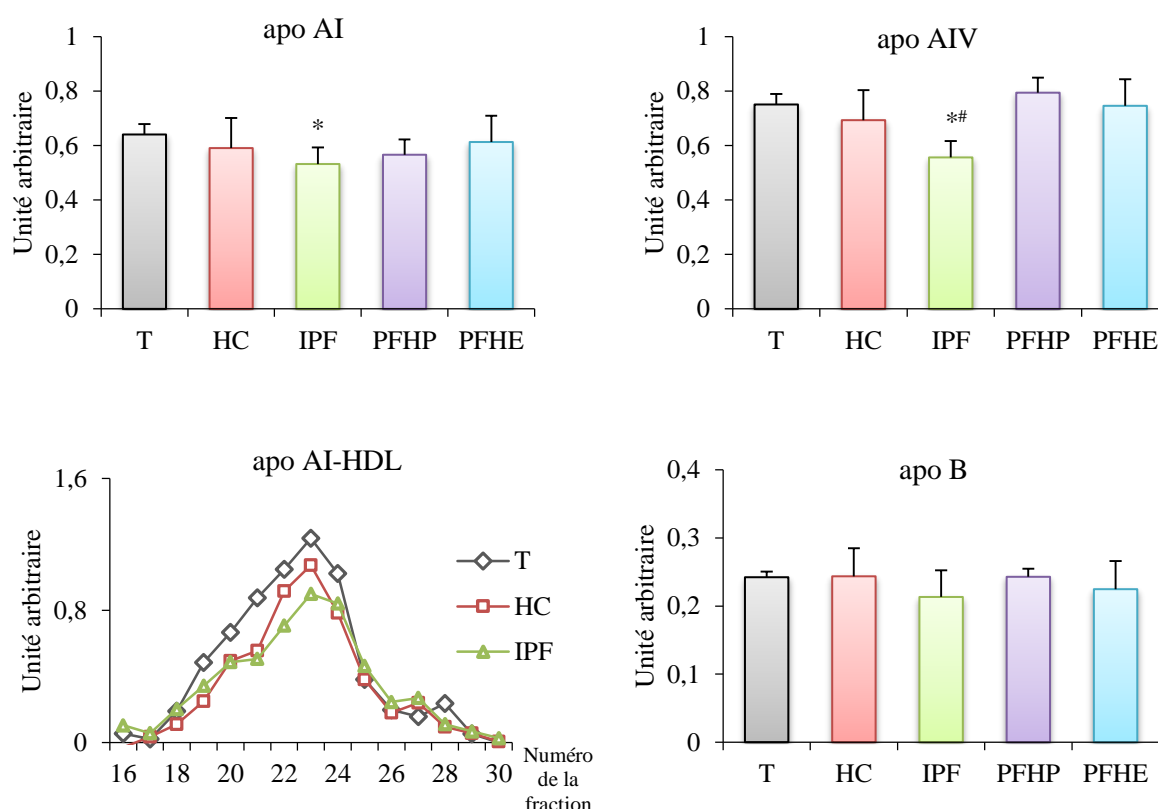


Figure 24. Teneurs en apolipoprotéines AI, AIV et B chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

III.6. Rapports d'athérogénicité

D'après le tableau 12, le rapport d'athérogénicité C-(VLDL+LDL)/C-HDL est augmenté de 10,8-fois chez le groupe HC comparé au groupe témoin.

Chez le groupe IPF, ce rapport est 49% plus faible, par comparaison au groupe HC. Chez les groupe PFHP et PFHE, l'indice C-(VLDL+LDL)/C-HDL est respectivement 1,2- et 1,4-fois plus faible comparés aux groupe HC.

Le rapport apo B/apo AI est resté similaire chez tous les groupes.

Tableau XII. Rapports d'athérogénicités chez les rats traités ou non avec l'isolat et les hydrolysats de protéines de fenugrec.

	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
C-(VLDL+LDL)/C-HDL	0,3	3,7	1,9	3,1	2,6
PL-VLDL/C-VLDL	0,7	0,4	0,5	0,5	0,2
apo B/apo AI	0,38±0,07	0,43±0,10	0,40±0,04	0,43±0,10	0,35±0,05

Les rapports C-(VLDL+LDL)/C-HDL et PL-VLDL/C-VLDL représentent les résultats d'un pool de 6 sérums de rats par groupe. Le rapport apo B/apo AI est exprimé sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*.

III.7. Teneurs en lipides du foie et de l'aorte (tableau 13)

En comparaison avec le groupe T, le régime HC a produit une augmentation des teneurs en lipides totaux hépatiques de 270%. Ceci résulte des teneurs en CT et de TG qui sont augmentées, respectivement, de 7- et 3-foischez le groupe HC vs. T.

Les teneurs hépatiques en lipides totaux et en cholestérol sont restées inchangées chez les rats IPF et PFHE vs. HC. Par rapport au groupe HC, le CL est augmenté chez le groupe IPF, alors que les EC sont diminués chez le groupe PFHP.

Les teneurs hépatiques en TG sont diminuées chez les animaux IPF vs. HC, cependant, cette différence reste statistiquement non significative ($P=0,07$). Par ailleurs, la diminution des TG hépatiques est significative ($P=0,03$) chez les animaux recevant les protéines hydrolysées (-28%) comparés au groupe HC.

Les teneurs du foie en phospholipides sont également augmentées par le régime HC (1,5-fois). Ces teneurs sont plus ou moins diminuées chez les rats IPF, cependant elles restent non significatives ($P=0,076$). Par contre, l'isolat et les hydrolysats des protéines de fenugrec n'ont eu aucun effet sur les taux des PL hépatiques, aux valeurs HC.

Tableau XIII. Teneurs en lipides (par g de tissu) au niveau hépatique et aortique chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
<u>Foie</u>					
Lipides totaux (mg/g)	71±06	193±21*	225±18*	184±33*	198±25*
CT (μmol/g)	9,5±0,7	67,0±10,6*	75,0±10,0*	50,9±6,7*#	76,2±9,3*
CL (μmol/g)	2,7±1,8	7,1±1,7*	9,0±1,9*#	7,3±1,0*	5,8±0,9*
CE (μmol/g)	6,8±1,3	59,9±9,4*	64,4±4,7*	43,6±7,0*#	70,3±10,7*
TG (μmol/g)	6,5±1,1	20,0±2,8*	15,7±5,0*	14,1±2,1*#	14,7±2,9*#
PL (μmol/g)	34,0±5,5	52,5±6,2*	47,4±8,3	64,5±15,3*	51,8±4,9*
<u>Aorte</u>					
CT (μmol/g)	2,3±0,4	2,4±0,1	1,4±0,5#	2,4±0,5	1,7±0,1#
PL (μmol/g)	11,1±1,7	17,5±3,0*	12,4±0,5#	19,2±0,8*	14,8±1,1*

CT : cholestérol total ; CL : cholestérol libre ; EC : Esters de cholestérol ; TG : triglycérides ; PL : phospholipides.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

Au niveau de l'aorte, aucune différence significative n'est notée dans les concentrations du cholestérol entre les groupes HC et T, alors que chez les groupes IPF et PFHE vs. HC, les teneurs de l'aorte en cholestérol sont diminuées de 42% et 29%, respectivement.

Les teneurs en phospholipides dans l'aorte sont 1,6-fois plus élevées chez le groupe HC vs. groupe T. Chez les rats IPF, ces valeurs sont 1,4-fois diminuées comparées à celles du groupe HC.

III.8. Activité antioxydante *in vivo* de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec

III.8.1. Propriété antioxydante des HDL

D'après la figure 25, les VLDL du groupe HC présentent une plus forte susceptibilité à l'oxydation, par rapport au groupe T. Cependant, seul le groupe IPF a une susceptibilité d'oxydation des VLDL très faible comparé aux autres rats consommant le régime HC, et qui est similaire à celle du groupe témoin.

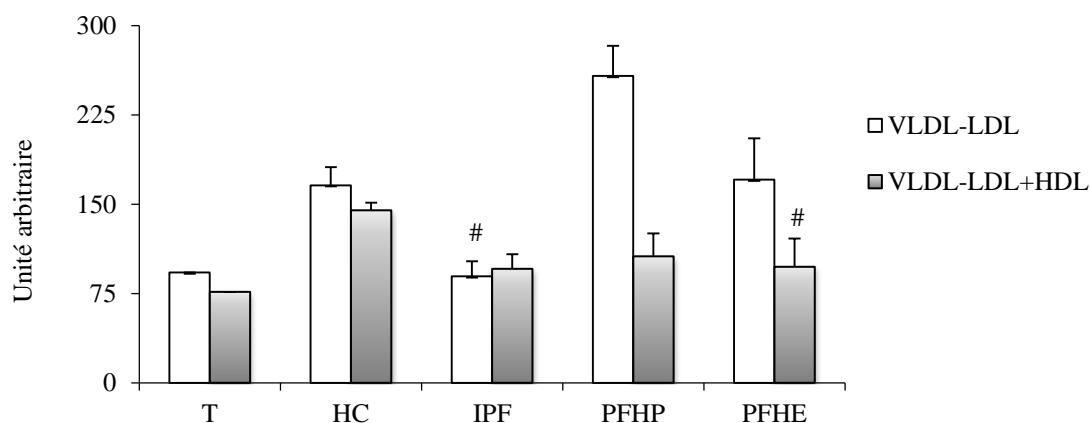


Figure 25. Propriété antioxydante des HDL des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ET de deux essais. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P\leq 0,05$).

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

Comparé aux valeurs HC, le taux d'oxydation des VLDL en présence des HDL est significativement diminué chez les groupes IPF et PFHE ($P\leq 0,05$), tandis que chez le groupe PFHP, cette diminution n'est pas statistiquement significative ($P=0,08$). La propriété antioxydante des HDL, calculée en pourcentage d'inhibition de l'oxydation des VLDL en présence des HDL, est égale à 13% seulement chez le groupe HC, alors qu'elle atteint les 59% et 43%, respectivement, chez les groupes PFHP et PFHE.

III.8.2. Activité arylestérase sérique

Les résultats de la figure 26 montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans l'activité paraoxonase entre les groupes HC et T. Par contre, cette activité est significativement augmentée de 20% chez les groupes ayant reçu les hydrolysats de fenugrec comparés au groupe HC.

III.8.3. Mesure du niveau d'oxydation dans les tissus

Les concentrations des TBARS sont restées inchangées au niveau hépatique chez le groupe HC par rapport au groupe témoin, mais aussi entre les groupes traités et le groupe HC, excepté les rats PFHE dont les valeurs sont significativement diminuées ($4,7 \text{ nmol.g}^{-1}$ vs. $8,6 \text{ nmol.g}^{-1}$ de foie, respectivement chez les rats PFHE et HC) (figure 27).

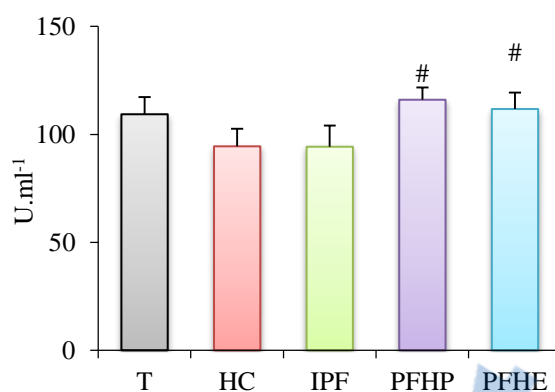


Figure 26. Activité arylestérase (paraoxonase) sérique chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

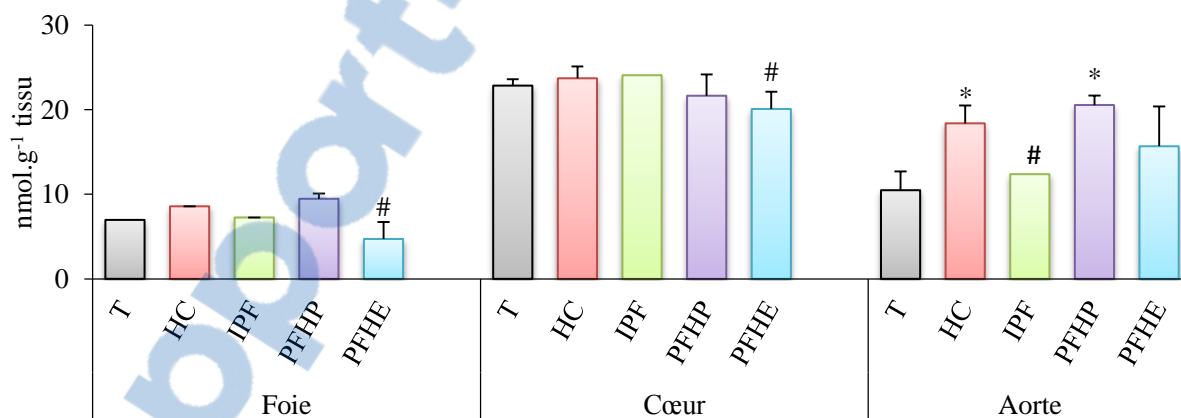


Figure 27. Teneurs en TBARS au niveau hépatique, cardiaque et aortique chez des rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

Au niveau du cœur, les teneurs en TBARS sont diminuées chez le groupe PFHE comparé au groupe HC (20,1 nmol.g⁻¹ vs. 23,7 nmol.g⁻¹ de cœur, respectivement).

Au niveau de l'aorte, les teneurs en TBARS sont 1,7-fois plus élevées chez les rats HC vs. T. En revanche, chez les rats traités avec l'IPF, ces teneurs sont 1,5-fois plus faibles comparées à celles du groupe HC. Il n'y a pas de différence entre les groupes recevant les hydrolysats et le groupe HC.

Les teneurs en TBARS dans l'aorte sont positivement corrélées avec la cholestérolémie et les teneurs sériques en esters de cholestérol ($r=0,71$; $P=0,002$), ainsi qu'avec les teneurs tissulaires en phospholipides ($r=0,83$; $P=0,005$) (figure 28).

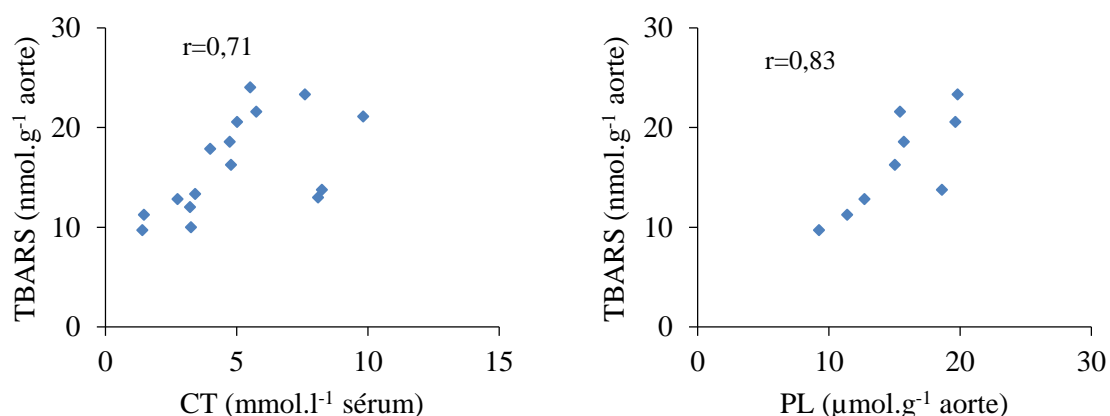


Figure 28. Corrélation entre les teneurs en TBARS dans l'aorte, la cholestérolémie (CT) et les phospholipides (PL) de l'aorte chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

Calculée selon le coefficient de corrélation de rang de Spearman.

III.8.4. Défenses antioxydantes au niveau tissulaire

a. Teneurs en protéines et en thiols au niveau tissulaire (tableau 14)

Excepté une diminution des concentrations hépatiques des protéines, notée chez les groupes IPF et PFHE comparés au groupe T (-20%), il n'y a pas de différence significative des teneurs en protéines tissulaires entre les différents groupes.

Les teneurs tissulaires en thiols chez les rats HC ne présentent aucune différence significative avec le groupe témoin. Chez les rats traités avec les hydrolysats, ces teneurs sont significativement augmentées au niveau hépatique et cardiaque.

Tableau XIV. Teneurs tissulaires en protéines et en groupement thiols chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
<u>Protéines (mg.g⁻¹)</u>					
Foie	150±14	127±20	112±25*	118±31	110±18*
Cœur	63±12	72±8	74±11	71±11	77±15
Aorte	22±06	26±04	20±03	24±06	27±06
<u>Thiols (μmol.g⁻¹)</u>					
Foie	1,95±0,02	1,82±0,40	2,35±0,40	2,67±0,44* [#]	2,55±0,27 [#]
Cœur	4,53±0,03	4,59±0,62	3,32±0,43* [#]	6,02±0,25* [#]	7,72±0,15* [#]
Aorte	2,38±0,26	2,22±0,47	2,65±0,60	1,97±0,24	1,79±0,33*

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE vs. T ;

: IPF, PFHP et PFHE vs. HC.

Au niveau de l'aorte, seules les PFHE ont diminué les teneurs en thiols (-25%) par rapport aux valeurs témoins. Par ailleurs, les teneurs en thiols au niveau cardiaque sont négativement corrélées avec leurs teneurs en TBARS ($r = -0,63$, $P = 0,015$).

b. Activités des enzymes antioxydantes au niveau tissulaire (tableau 15)

• Au niveau du foie

L'activité SOD est 2,8-fois plus élevée chez le groupe HC, alors que celle de la GSSG-Red est diminuée de 40%, en comparaison avec les valeurs témoins. Par contre, l'activité catalase est restée inchangée.

Comparativement au groupe HC, l'activité SOD a augmenté de 1,3- et 1,4-fois chez le groupe IPF et les groupes traités avec les hydrolysats, respectivement. Les activités catalase et GSSG-Red ne montrent pas de différence significative chez les groupes traités vs. HC.

• Au niveau du cœur

L'activité SOD a diminué chez tous les groupes expérimentaux par rapport au groupe T, et particulièrement chez le groupe PFHE dont l'activité est diminuée de 28% par rapport aux rats HC.

Tableau XV. Activités des enzymes antioxydantes tissulaires chez les rats traités ou non avec l'isolat ou les hydrolysats de protéines de fenugrec.

<i>U.mg⁻¹ protéine</i>	T	HC	IPF	PFHP	PFHE	
Foie	SOD	3,4±1,0	9,7±2,7*	12,7±2,3* [#]	13,2±2,2* [#]	13,5±1,8* [#]
	Catalase	917±31	974±127	1163±255	1025±72	1172±128
	GSSG-Red	13,3±4,2	7,4±1,2*	7,5±2,3*	8,8±0,6*	9,6±2,4*
Cœur	SOD	56,4±10,9	45,7±5,8*	42,5±6,8*	46,5±5,6	33,0±1,5* [#]
	Catalase	26,8±3,9	24,5±3,0	27,1±2,9	26,0±1,9	32,1±1,5 [#]
	GSSG-Red	4,1±1,6	2,3±0,6	2,5±1,4	3,4±1,1	3,7±0,7
Aorte	SOD	60,2±9,2	44,9±7,9	77,8±10,9 [#]	65,0±15,2 [#]	53,4±7,8
	Catalase	8,8±1,9	13,4±4,8*	20,4±2,3* [#]	13,5±1,7*	13,4±1,8*
	GSSG-Red	6,1±2,0	5,9±0,4	7,0±1,6	9,6±2,5 [#]	7,0±3,1

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne±ET de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est réalisée par le test *LSD-Fisher*. Les moyennes portant des signes sont significativement différentes ($P \leq 0,05$).

* : HC, IPF, PFHP et PFHE *vs.* T ;

: IPF, PFHP et PFHE *vs.* HC.

Les activités catalase et glutathion réductase sont restées similaires chez les différents groupes expérimentaux, à l'exception du groupe PFHE où l'activité catalase a augmenté de 31% *vs.* groupe HC.

- **Au niveau de l'aorte**

Les rats HC ont montré une élévation de l'activité catalase, par rapport au groupe T. Par ailleurs, les activités des enzymes SOD et GSSG-Red sont restées inchangées chez HC *vs.* T.

Chez le groupe IPF *vs.* HC, les activités catalase et SOD sont respectivement 1,5- et 1,7-fois plus élevées, tandis que l'activité GSSG-Red est restée inchangée. Chez le groupe PFHP, les activités SOD et GSSG-Red sont respectivement 1,4- et 1,6-fois plus élevées comparées aux activités enregistrées chez le groupe HC.

Discussion

Les protéines et les hydrolysats, de par leurs propriétés bioactives, peuvent constituer des produits fonctionnels et nutraceutiques. A cet effet, on s'est intéressé dans ce travail à étudier certaines propriétés bioactives des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats, et à expliquer par quels mécanismes agissent-ils.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les caractéristiques des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats par une analyse physicochimique, et une étude *in vitro* de leurs propriétés antioxydantes.

La qualité d'un hydrolysat dépend d'un certain nombre de paramètres : l'enzyme utilisée, les conditions d'hydrolyse, la nature du substrat, le rapport enzyme/substrat et le degré d'hydrolyse. Ce dernier exprime le nombre de liaisons peptidiques clivées par rapport aux liaisons peptidiques totales dans la protéine. Il renseigne également sur la taille des peptides libérés et la spécificité du catalyseur (Nasri, 2017 ; Nwachukwu et Aluko, 2019). Dans ce travail, l'isolat de protéines de fenugrec a fait l'objet d'une hydrolyse poussée au moyen de deux enzymes ; la Purafect ou l'Espérase. Ces deux enzymes ont donné deux profils d'hydrolyse différents. En effet, même si la cinétique de l'hydrolyse a montré une phase initiale très rapide pour les deux enzymes avant d'atteindre un plateau, cette phase dure plus longtemps avec l'Espérase et a permis de produire un hydrolysat avec un degré d'hydrolyse supérieur à celui de la Purafect. Ceci suggère une présence plus importante de protides de faible poids moléculaire dans les PFHE comparées aux PFHP.

Cette différence entre les deux cinétiques d'hydrolyse pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes. Notamment, la spécificité des enzymes vis-à-vis du substrat ; l'épuisement des sites accessibles pour l'enzyme ; la dénaturation des enzymes et/ou leur inhibition par les produits de l'hydrolyse (Guerard *et al.*, 2002). Néanmoins, les deux courbes restent typiques aux profils d'hydrolyse des protéines de légumineuses ou celles d'autres végétaux (Zhao *et al.*, 2012 ; León-Espinosa *et al.*, 2016 ; Sbroggio *et al.*, 2016).

Par ailleurs, nous avons étudié le profil électrophorétique dans des conditions dénaturantes, de l'isolat des protéines de fenugrec, avant et après hydrolyse. L'électrophorégramme de l'IPF montre la présence de six bandes qui correspondent à des PM différents. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Hřčková *et al.*, (2002), Surówka *et al.*, (2004), et Feyzi *et al.*, (2015), qui ont travaillé avec les hydrolysats de protéines du soja et du fenugrec. Ces auteurs rapportent qu'une électrophorèse dans des conditions dénaturantes d'isolats de protéines hydrosolubles de légumineuses est caractérisée par la présence de cinq

protéines de poids moléculaire élevé, correspondant aux sous unités α' , α et β - de la 7S globuline (β -conglycinine) et aux deux sous unités, acide et basique, de la 11S globuline (glycinine), et d'une bande de protides de faible poids moléculaire.

Lorsque l'IPF est hydrolysé avec la Purafect, la fraction β - de la sous-unité 7S (bande 3) n'a pas été complètement dégradée. En revanche, avec l'Espérase, toutes les fractions de la sous-unité 7S sont dégradées. Par ailleurs, la sous-unité 11S basique (bande 5) semble ne pas être hydrolysée par les deux enzymes. Hrčková *et al.*, (2002), et Surówka *et al.*, (2004), rapportent que les fractions de la sous-unité 7S sont hautement sensibles à l'action des enzymes protéolytiques, alors que la sous-unité 11S basique est caractérisée par sa résistance à la protéolyse. Les résultats montrent également la présence d'une large bande dense à la base du gel après hydrolyse des protéines. Cette bande résulterait probablement de la diminution du PM des protides et leur accumulation à la base du gel. Ces résultats sont en accord avec ceux rapporté par Hrčková *et al.*, (2002), et Surówka *et al.*, (2004).

Le degré d'hydrolyse peut renseigner sur la taille des protides. En effet, plus les liaisons peptidiques sont coupées, et plus le DH est élevé, et par conséquent la taille des protides diminue. De plus, selon Nasri, (2017), la taille des protides représente un paramètre essentiel dans leur bioactivité. Dans le but de confirmer cette relation taille-DH, un fractionnement par ultrafiltrations successives a été réalisé, afin d'étudier la répartition des protides selon leurs tailles. Comparé à la Purafect (DH=9%), les résultats montrent que l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase (DH=19%) produit plus de protides de faible taille et moins de protides longs.

Dans cette même partie de ce travail, nous avons étudié la composition physicochimique de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec. L'analyse des teneurs en protéines a montré que l'IPF a un degré de pureté important, dont la valeur est supérieure à celle obtenue par El Nasri et El Tinay, (2007), (74%). Mais, elle reste inférieure à celle obtenue par Feyzi *et al.*, (2015), (89%). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que ces deux auteurs ont utilisés des techniques d'extraction différentes de la nôtre. Par contre, avec une technique similaire à celle utilisée dans cette étude, Boye *et al.*, (2010), ont obtenu des isolats de protéines de légumineuses avec des degrés de pureté compris entre 63% et 81%, tandis que Kong *et al.*, (2008), ont pu préparer un isolat de protéines de soja avec 93% de teneur en protéines.

Après hydrolyse de l'IPF, les teneurs en protéines ont augmenté aussi bien dans les PFHE que dans les PFHP. Cependant, l'Espérase a permis d'obtenir un hydrolysats avec un taux de

protéines supérieur à celui obtenu avec la Purafect. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Taha *et al.*, (2014). Cette augmentation des teneurs en protéines résulterait probablement d'une solubilisation des peptides après hydrolyse, spécialement dans des conditions alcalines (Zhao *et al.*, 2012), et/ou d'une élimination des autres constituants. En effet, les molécules insolubles pourraient être éliminées dans un milieu alcalin (Kristinsson et Rasco, 2000).

La composition et la nature des acides aminés constitutifs des protéines et des hydrolysats déterminent en grande partie les propriétés bioactives de ces derniers (Maestri *et al.*, 2018). A cet effet, nous avons étudié la composition de l'isolat de protéines de fenugrec en acides aminés, avant et après hydrolyse. Les résultats montrent que l'hydrolyse n'a que très faiblement affecté la composition en acides aminés des protéines de fenugrec, en dépit d'une diminution des teneurs en certains acides aminés (Ser, Pro, Val, Ile et His). La diminution de ces AA pourrait s'expliquer par leur disparition dans la fraction non soluble de l'hydrolysate. Par contre, les teneurs en d'autres acides aminés ont augmenté (Thr, Glu et Leu), suggérant leur forte présence dans la fraction soluble de l'hydrolysate. Ajibola *et al.*, (2011), sont parvenus aux mêmes résultats. Par ailleurs, les teneurs en acides aminés soufrés (Cys+Met) sont augmentées dans les hydrolysats, comme noté par Jiménez-Ruiz *et al.*, (2013), et Taha *et al.*, (2014), ce qui pourrait améliorer leur qualité nutritionnel. La composition des protéines de fenugrec en acides aminés montre beaucoup de similitudes avec à celle rapportée par Feyzi *et al.*, (2015). De même, cette composition se rapproche aussi de celle obtenue avec d'autres légumineuses comme le soja (Hrčková *et al.*, 2002) ou le pois chiche (Yust *et al.*, 2012). Cependant, nous avons noté que les teneurs en tryptophane de nos préparations sont supérieures à celles obtenues par plusieurs études. Cette différence avec nos résultats serait due à la destruction de cet acide aminé par l'hydrolyse acide lors de leur dosage dans ces études (Yust *et al.*, 2004).

D'autre part, si les teneurs en acides aminés aromatiques et hydrophobes n'ont pas significativement changé entre l'isolat et les hydrolysats, ces valeurs sont supérieures à celles trouvées par d'autres auteurs (Pownall *et al.*, 2010 ; Yust *et al.*, 2012 ; Mundi et Aluko, 2014).

La présence d'autres molécules non protéiques dans les hydrolysats peut aussi influencer leurs propriétés biologiques. Dans la présente étude, la présence inattendue des lipides dans l'IPF (préalablement délipidé) a diminué après hydrolyse. Ceci suggère que ces lipides, piégés dans la séquence hydrophobe des protéines, ont probablement été libérés après hydrolyse des protéines, ou éliminés avec la fraction insoluble après centrifugation (Kristinsson et Rasco, 2000).

Les teneurs de l'IPF en certains ions ont également diminué après hydrolyse. Il est probable que ces ions ont été éliminés avec la fraction insoluble de l'hydrolysate, ou avec la fraction lipidique. En revanche, les concentrations en sodium ont augmenté après hydrolyse. D'après Yust *et al.*, (2012), la teneur en sodium augmente après hydrolyse en raison de l'ajout continu de la soude.

Nous avons également testé l'isolat et les hydrolysats pour leurs propriétés antioxydantes. Quatre tests *in vitro* ont été choisis pour évaluer cette activité antioxydante : le pouvoir inhibiteur du radical DPPH, le pouvoir réducteur de l'ion ferrique, le pouvoir inhibiteur de l'oxydation du β -carotène et l'effet protecteur contre la dégradation oxydative de l'ADN.

Les résultats ont montré que les hydrolysats possèdent une activité inhibitrice du DPPH plus importante que celle de l'isolat, et ce en dépit d'une composition en acides aminés similaire. Cette activité semble aussi dépendre du degré d'hydrolyse et/ou de la spécificité d'enzyme, comme l'ont montré Sbroggio *et al.*, (2016). En effet, l'Espérase (DH=19%) a produit un hydrolysate dont l'activité antioxydante est supérieure à celle de la Purafect (DH=9%).

Pour ce qui est du FRAP, les PFHE ont montré également un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'isolat. Ces résultats rejoignent ceux de Yust *et al.*, (2012), He *et al.*, (2013) et Sbroggio *et al.*, (2016), qui ont noté que l'hydrolyse des protéines de légumineuses améliore leur pouvoir réducteur, et que cette amélioration dépend de l'enzyme utilisée.

Par ailleurs, l'IPF et ses hydrolysats ont montré une importante activité inhibitrice de la décoloration du β -carotène, et qui est quasiment similaire à celle obtenue avec le BHA. Néanmoins, ce sont les hydrolysats qui ont montré la meilleure activité, comparés à l'IPF. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Yust *et al.*, (2012), qui ont noté que l'hydrolyse des protéines de pois chiche augmente l'activité protectrice contre la décoloration du β -carotène.

Cette efficacité antioxydante des hydrolysats comparés à l'isolat pourrait être expliquée par la libération de peptides biologiquement actifs. En effet, l'hydrolyse pourrait faire apparaître des peptides avec de nouvelles extrémités portant des acides aminés antioxydants et des fonctions libres pouvant interagir avec les radicaux libres (Das et Bhattacharjee, 2013).

Nous nous sommes ainsi proposé d'étudier l'activité antioxydante des différentes fractions des hydrolysats de fenugrec afin d'identifier la ou les fractions les plus actives. Les

résultats ont montré que l'activité antioxydante (anti-DPPH et FRAP) varie d'une fraction à l'autre. Cependant, nous n'avons pas trouvé de relation entre la taille et l'activité antioxydante des fractions, au moins pour les tests réalisés. En revanche, pour une même fraction, cette activité antioxydante diffère selon l'enzyme utilisée. Ces observations démontrent que l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la taille des protéides, mais probablement d'autres paramètres, comme il a été rapporté par Lemes *et al.*, (2016). Ces observations sont en accord avec les résultats de He *et al.*, (2013), et Mundi et Aluko, (2014). Mundi et Aluko, (2014), suggèrent que l'activité antioxydante dépend plus de l'hydrophobicité des acides aminés et des peptides que de leur taille. Par ailleurs, Maestri *et al.*, (2018), ont démontré qu'en plus de la taille des peptides, l'activité antioxydante des hydrolysats de soja dépend également de leur composition en acides aminés et leur position dans la séquence peptidique.

Cependant, les fractions des hydrolysats de fenugrec n'ont pas montré une différence importante de l'activité antioxydante comparées aux hydrolysats, d'où le choix de continuer à travailler avec les hydrolysats pour la suite de l'étude.

Nous nous sommes ainsi intéressés, dans cette étude, à étudier l'effet protecteur des protéines de fenugrec contre la dégradation oxydative de l'ADN. Selon Jridi *et al.*, (2014), les antioxydants ayant cette propriété sont considérés comme les plus efficaces dans la protection contre les maladies en relation avec le stress oxydant. En effet, l'ADN est une molécule très sensible à l'oxydation, qui peut subir des dommages oxydatifs par le radical OH^\bullet .

L'ADN plasmidique possède une forme en double hélice qui est enroulée sur elle-même, ce qui lui donne une forme compacte dite superenroulée. Si cette double hélice subit une lésion dans un des deux brins, par un radical libre (OH^\bullet), elle se relâche et prend une forme circulaire. Si cette lésion est importante, la forme circulaire est transformée en une forme linéaire (Golla et Bhimathati, 2014). En présence d'un antioxydant, le radical OH^\bullet (généré par le réactif de Fenton) est inhibé, ce qui pourrait protéger contre la dégradation de l'ADN.

Les résultats ont montré que l'IPF a partiellement protégé l'ADN plasmidique contre l'oxydation. En effet, même si la forme superenroulée du plasmide traité avec l'IPF est conservée, la forme circulaire apparaît plus dense comparée à celle du plasmide témoin, ce qui suggère une dégradation partielle de la forme superenroulée. De plus, l'IPF n'a pas empêché la dégradation du plasmide jusqu'à la forme linéaire. En revanche, les deux hydrolysats ont protégé efficacement contre la dégradation de l'ADN en maintenant sa forme native (plasmide

témoin). Ceci suggère que les hydrolysats PFHP et PFHE possèdent une activité antioxydante vis-à-vis du radical OH^\bullet .

A la lumière de ces résultats, on peut déduire que les protéines de fenugrec possèdent des propriétés antioxydantes, éventuellement en raison de leur richesse en acides aminés aromatiques et hydrophobes. Cette activité est améliorée après hydrolyse. Par ailleurs, l'Espérance a permis d'obtenir un hydrolysate avec un meilleur potentiel antioxydant, comparée à la Purafect, et ceci probablement en raison du degré d'hydrolyse élevé et/ou de la nature des peptides libérés par cette enzyme. Le fractionnement ne permet pas d'obtenir de fractions avec une activité antioxydante importante.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons étudié l'activité hypolipémiant et cardioprotectrice des protéines de fenugrec, chez le rat en situation d'hypercholestérolémie. Mais avant d'aborder cet objectif principal, nous avons d'abord testé si l'administration des protéines de fenugrec, hydrolysées ou non, n'affectent pas la qualité nutritionnelle du régime. L'analyse des paramètres anthropométriques et nutritionnels a montré que l'IPF et les hydrolysats ont permis une croissance pondérale normale et similaire chez tous les groupes d'animaux. Ceci suggère que l'IPF et ses deux hydrolysats, administrés à raison de 1 g.kg^{-1} de poids corporel, n'affectent pas l'efficacité nutritionnelle du régime administré aux rats. Bettzieche *et al.*, (2008), sont parvenus aux mêmes résultats avec un régime hypercholestérolémiant, supplémenté ou non avec 1 g de protéines de lupin ou de caséine. De même, Ferreira *et al.*, (2010), qui ont testé les protéines du niébé et du haricot rouge, à raison de 300 mg.kg^{-1} de poids corporel, ont remarqué que l'évolution du poids des rats hypercholestérolémiques n'est pas affectée. Des constatations similaires sont rapportées par Yang *et al.*, (2007), et Yahia *et al.*, (2017), respectivement avec les protéines et les hydrolysats de soja et de pois chiche.

Les résultats ont également montré que les rats soumis au régime HC ont un poids relatif du foie plus élevé par rapport aux rats témoins. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'augmentation du stockage des lipides par le foie, telle que constatée par le contenu élevé en lipides totaux dans cet organe. Par contre, aucun effet de l'isolat ou des hydrolysats sur le poids relatif des organes n'a été noté. Yang *et al.*, (2007), Ferreira *et al.*, (2010), et Yahia *et al.*, (2017), sont parvenus aux mêmes conclusions.

Il est bien établi qu'un apport élevé en cholestérol peut résulter en une perte de l'intégrité du foie mais aussi d'autres tissus cibles de l'athérosclérose (Kapravelou *et al.*, 2013 ; Lassoued

et al., 2014). Dans ce contexte, les protéines et les hydrolysats ont été testés pour leur effet protecteur contre la toxicité du cholestérol vis-à-vis du foie et du cœur, ainsi que pour leur innocuité. En effet, pour que l'isolat et les hydrolysats des protéines soient qualifiés comme molécules bioactives, ils doivent, d'une part, exercer un effet biologique bénéfique sur la santé, et d'autre part, ne pas causer d'effets potentiellement dommageables (Möller *et al.*, 2008). Parmi les marqueurs qui permettent d'évaluer l'intégrité des tissus hépatiques et cardiaques, les transaminases ASAT et ALAT sont les plus couramment utilisées (Shen *et al.*, 2015).

L'activité sérique de l'ASAT a augmenté chez le groupe HC vs. T. Cependant, cette augmentation reste non significative ($P=0,09$). En revanche, l'activité ALAT n'a pas changé entre les groupes. D'après Shen *et al.*, (2015), en absence d'une augmentation de l'ALAT, une augmentation isolée de l'ASAT sérique peut témoigner d'une atteinte cardiaque. En revanche, l'apport en IPF et en PFHE a corrigé l'activité élevée de l'ASAT chez le groupe HC. Ceci suggère que ces deux préparations pourraient avoir un effet cardioprotecteur. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Kapravelou *et al.*, (2013). Ces auteurs ont noté que l'hydrolysate de protéines de lupin diminue l'activité des transaminases sériques.

Par ailleurs, les niveaux plasmatiques de l'acide urique ont augmenté chez les rats soumis au régime HC. Ces teneurs élevées en acide urique sont probablement une réponse aux niveaux élevés de la xanthine oxydase, comme l'ont démontré Kostić *et al.*, (2015). En effet, un régime HC pourrait augmenter l'activité de la xanthine oxydase dans les érythrocytes et dans le plasma (Devrim *et al.*, 2008). Cependant, il semble que ni l'isolat de protéines de fenugrec, ni ses hydrolysats n'ont permis la correction de ce paramètre.

Avant d'aborder l'objectif principal de notre étude, nous avons également étudié les propriétés hypoglycémiantes des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats chez le rat HC, compte tenu de l'effet délétère de l'hyperglycémie sur le système cardiovasculaire. Les résultats indiquent que l'IPF a pu corriger les valeurs de la glycémie, qui étaient augmentées par le régime HC. Cependant, la valeur de la glycémie chez le groupe HC n'est pas considérée comme valeur indiquant une hyperglycémie chez le rat Wistar (Wang *et al.*, 2010b) pour déduire un potentiel hypoglycémiant de l'IPF.

Parmi les propriétés attribuées aux protéines et à leurs hydrolysats, on distingue l'activité hypocholestérolémiante. Cependant, le nombre d'études consacrées à mettre en évidence cette bioactivité, en particulier *in vivo*, est relativement limité (Maestri *et al.*, 2018). A cet effet, nous nous sommes fixé comme objectif principal de ce travail, d'étudier les propriétés

hypocholestérolémiantes de l'isolat de protéines de fenugrec et de ses hydrolysats, en évaluant leur impact sur le profil des lipides sériques, lipoprotéiques, hépatiques et au niveau de l'aorte, chez le rat consommant un régime hypercholestérolémiant.

L'apport en cholestérol s'est traduit par une importante augmentation de la cholestérolémie. Cette hypercholestérolémie a affecté les deux classes de lipoprotéines et ce en augmentant le taux du cholestérol transporté par les VLDL et en diminuant celui transporté par les HDL, comme le reflète le rapport d'athérogénicité C-(VLDL+LDL)/C-HDL élevé chez ce groupe. Ces résultats rejoignent ceux de Wang *et al.*, (2010a), et Ferreira *et al.*, (2015). Alors que Fassini *et al.*, (2011), et León-Espinosa *et al.*, (2016), ont noté une forte augmentation des teneurs en cholestérol dans les lipoprotéines à apo B sans diminution du C-HDL.

L'apport en IPF et en PFHE a remarquablement diminué les taux sériques du cholestérol total, et ses deux formes ; libre et estérifiée, en les rapprochant des valeurs du groupe témoin. Cette diminution de la cholestérolémie reflète essentiellement les faibles teneurs des VLDL en cholestérol chez les deux groupes IPF et PFHE, par rapport au groupe HC. Yang *et al.*, (2007), avec l'hydrolysat de protéines de soja, Xue *et al.*, (2012), avec l'hydrolysat de poids chiche, Ferreira *et al.*, (2015), avec les protéines du haricot rouge et du niébé, et Chale *et al.*, (2016), avec l'hydrolysat de protéines de *Mucuna pruriens*, sont parvenus aux mêmes résultats.

Le principal mécanisme de cet effet hypocholestérolémiant serait probablement l'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol et des lipides. En effet, même si les rats HC ont eu une excrétion fécale du cholestérol supérieure à celle du groupe témoin, cette excrétion est significativement inférieure à celle des rats traités avec l'IPF ($P \leq 0,001$). Ces résultats sont en accord avec les études de Ferreira *et al.*, (2015), et Mendonça *et al.*, (2009). Les protéines de fenugrec ont, probablement, inhibé la solubilisation micellaire du cholestérol dans l'intestin, ce qui aurait conduit à la suppression de son absorption intestinale. Il en résulterait donc une baisse de sa biodisponibilité au niveau hépatique, ce qui stimulerait probablement sa captation à partir du plasma et sa conversion en acides biliaires après activation de l'expression de la CYP7A1 (résultats non présentés).

En revanche, l'excrétion fécale du cholestérol chez le groupe PFHE n'a pas changé comparée chez le groupe HC. Les mêmes observations sont rapportées par Kapravelou *et al.*, (2013). Cependant, Yahia *et al.*, (2017), ont noté que des hydrolysats de protéines de poids chiche ont augmenté l'excrétion fécale. Cho *et al.*, (2007), rapportent que l'activité inhibitrice de la solubilisation micellaire du cholestérol, *in vitro*, diminue après hydrolyse. Ceci permet

d'émettre l'hypothèse que les PFHE agissent probablement selon un mécanisme autre que celui gastrointestinal pour exercer leur effet hypocholestérolémiant. Ce mécanisme pourrait faire intervenir les peptides qui échappent à l'hydrolyse digestive et qui pourraient traverser la barrière intestinale pour atteindre le flux sanguin puis le foie, où ils peuvent moduler l'expression et l'activité de certaines protéines (Ferreira *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2018).

Lammi *et al.*, (2014), ont noté dans leurs travaux en culture cellulaire, que l'hydrolysats des protéines de lupin augmente l'expression des LDL-R dans les hépatocytes. De même, Cho *et al.*, (2007), ont remarqué que l'activation de la transcription des LDL-R en culture cellulaire est positivement corrélée avec le degré d'hydrolyse des protéines de soja. Cependant, ces études n'ont pas été réalisées dans des conditions d'hypercholestérolémie, d'où il est difficile de les rapporter aux résultats de cette étude. De plus, les niveaux d'apo B inchangés chez les groupes traités écartent l'hypothèse de l'activation des LDL-R par les hydrolysats. L'explication serait en faveur de la captation sélective du cholestérol des lipoprotéines à apo B via les récepteurs SR-B1 (Trigatti *et al.*, 2000 ; Nieland *et al.*, 2005).

Les PFHP n'ont pas eu d'effet sur la cholestérolémie. Cette absence d'effet pourrait être due au faible DH obtenu avec cette enzyme. En effet, Yahia *et al.*, (2017), qui ont comparé l'effet hypocholestérolémiant de deux hydrolysats de pois chiche à différents DH, ont démontré que cette propriété dépend du degré d'hydrolyse.

Dans ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés aux HDL pour leur rôle cardioprotecteur. A cet effet, nous avons étudié l'effet de l'IPF et de leurs hydrolysats sur la fonctionnalité des HDL. Nous avons noté que le taux du cholestérol transporté par les HDL n'a pas significativement changé chez les rats IPF comparés aux rats HC, alors qu'il est légèrement augmenté avec les hydrolysats. Bettzieche *et al.*, (2008), Xue *et al.*, (2012), et León-Espinosa *et al.*, (2016), sont parvenus aux mêmes observations. Par contre, Yang *et al.*, (2007), Fassini *et al.*, (2011) et Ferreira *et al.*, (2015), ont noté une augmentation, alors que Mendonça *et al.*, (2009), et Yahia *et al.*, (2017), ont observé une diminution du C-HDL, suite à un apport en protéines ou en leurs hydrolysats. Il se pourrait que la nature des protéines et des hydrolysats utilisés dans ces études soit à l'origine des différences de leurs effets sur le métabolisme des HDL.

Suite à la diminution du cholestérol dans les lipoprotéines à apo B, et le C-HDL inchangé chez les groupes IPF et PFHE, il s'est résulté une diminution du rapport d'athérogénicité

C-(VLDL+LDL)/C-HDL, comparé chez le groupe HC. Ces résultats suggèrent que l'IPF et les PFHE pourraient exercer un rôle antiathérogène et cardioprotecteur.

Comparé au régime HC, ni l'isolat et ni les hydrolysats n'ont affecté les teneurs plasmatiques en apo AI. A l'exception des travaux réalisés dans notre laboratoire (Yahia *et al.*, 2017), qui ont noté que les hydrolysats de pois chiche n'ont pas modifié les valeurs d'apo AI, très peu de travaux se sont intéressés à l'effet des protéines de légumineuse ou végétales sur les niveaux des apolipoprotéines.

En revanche, le traitement des rats HC avec l'IPF a diminué l'apo AIV. Ces observations ne sont pas en accord avec celles de Yahia *et al.*, (2017), qui ont démontré que l'hydrolysat de pois chiche augmente les teneurs sériques en apo AIV chez les rats HC. L'apo AIV est principalement synthétisée par l'intestin, et à un moindre degré par le foie. Sa synthèse intestinale est stimulée par l'absorption des lipides (Wang *et al.*, 2015). Chez le rat à jeun, 50% de l'apo AIV plasmatique d'origine intestinale sont transférées aux molécules HDL (Duka *et al.*, 2013). Par conséquent, les concentrations de l'apo AIV en phase à jeun reflètent indirectement son métabolisme postprandial. A la lumière de ces données, et en les rapportant sur les résultats de ce travail, il pourrait être suggéré que la diminution de l'absorption des lipides serait à l'origine de la diminution des teneurs sériques en apo AIV.

Les résultats ont également montré que l'apport élevé en cholestérol a induit une hypertriglycémie chez le groupe non traité (HC). Les résultats de ce travail sont en accord avec ceux obtenus par Yang *et al.*, (2007), Ferreira *et al.*, (2010), et Fassini *et al.*, (2011). Cependant, Wang *et al.*, (2010a), et León-Espinosa *et al.*, (2016), ont plutôt noté une diminution de la triglycémie chez des rats soumis à un régime HC. Cette différence avec nos résultats pourrait s'expliquer par la différence de la qualité et de la quantité des lipides utilisés dans le régime (10% et 8,6%, respectivement, comparé à 5% dans ce travail) (Wang *et al.*, 2010a).

En revanche, l'IPF a permis de corriger les niveaux des TG sériques. Ceci s'expliquerait probablement par l'activation de la lipoprotéine lipase. En effet, Ferreira *et al.*, (2015), ont noté une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase chez des rats HC traités avec les protéines du Niébé. Bettzieche *et al.*, (2008), ont obtenu les mêmes résultats avec les protéines de lupin.

Un des objectifs de cette étude est de d'étudier si les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats peuvent protéger contre l'accumulation des lipides au niveau du foie, étant donné

son implication dans le métabolisme des lipides. En effet, le foie est un organe primordial dans le métabolisme du cholestérol. Il est l'organe qui maintient son homéostasie *via* : **a**) sa synthèse par la HMGCoA réductase ; **b**) sa sécrétion dans le sang sous forme de VLDL ; **c**) sa clairance de la circulation sanguine *via* les LDL-R ou les récepteur scavenger de classe B1 (SR-B1) ; **d**) son estérification et son stockage ; et **e**) son élimination (Yasser *et al.*, 2016).

Lorsque les rats ont été soumis au régime HC, les teneurs en cholestérol et en TG hépatiques ont augmenté. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Wang *et al.*, (2010a), qui ont démontré qu'un apport en cholestérol aboutit à une stimulation de l'activité acyl coenzyme A-cholestérol-acyltransférase (ACAT) et à une diminution de la β -oxydation au niveau hépatique.

Le traitement des rats HC avec les PFHP et les PFHE a significativement diminué les teneurs hépatiques en TG. Ces résultats rejoignent ceux de Yang *et al.*, (2007), Fassini *et al.*, (2011), et Kapravelou *et al.*, (2013). Ces faibles teneurs hépatiques en TG suggèrent l'activation de la β -oxydation *via* l'activation du "*Peroxisome proliferator-activated receptor alpha*" (PPAR α). En effet, il a été démontré, dans certains travaux, que certains peptides et hydrolysats de protéines modulent l'activité des récepteurs PPAR α au niveau hépatique (Udenigwe et Rouvinen-Watt, 2015).

Les résultats montrent également que l'apport en IPF et en PFHE n'a pas corrigé les teneurs hépatiques en cholestérol par rapport au groupe HC. Fassini *et al.*, (2011), sont parvenus aux mêmes résultats. En revanche, Ferreira *et al.*, (2015), et Kapravelou *et al.*, (2013), ont remarqué une diminution du taux des teneurs en cholestérol hépatique après la supplémentation en protéines et en hydrolysat de légumineuses. Bettzieche *et al.*, (2008), ont plutôt noté que les concentrations du CT hépatique chez les rats consommant les protéines de lupin ont augmenté, comparées à celles du groupe HC.

L'étude de l'effet protecteur de l'IPF et ses hydrolysats contre l'accumulation des lipides au niveau de l'aorte, a été également abordée dans ce travail, étant donné que l'aorte soit un tissu cible de l'athérosclérose. Le régime HC ne semble pas augmenter les teneurs tissulaires en cholestérol, mais augmente celles des PL, ce qui augmenterait ainsi le risque d'athérosclérose (Madamanchi *et al.*, 2005a ; Hafiane et Genest, 2013). En effet, l'oxydation des lipides, en particulier les résidus d'acyles gras dans les phospholipides, peut conduire à la formation de radicaux libres et aux dommages cellulaires (Hafiane et Genest, 2013). D'autre part, l'IPF et les PFHE ont pu diminuer les teneurs en cholestérol dans l'aorte. Les mêmes

résultats sont rapportés par Adams *et al.*, (2004), et Wilson *et al.*, (2007), qui ont travaillé avec les protéines et l'hydrolysate de soja sur des souris et des hamsters, respectivement. Cependant, vu le peu d'études qui traite l'impact d'un apport en hydrolysats ou en protéines de légumineuses sur les teneurs en lipides de l'aorte, particulièrement chez le modèle animal que nous avons étudié dans cette étude, il est difficile d'analyser les résultats de la présente étude. Cependant, il se pourrait que les faibles teneurs de l'aorte en CT et en PL chez ces groupes soient dues à la diminution du cholestérol et des PL dans la fraction athérogène de leurs lipoprotéines.

Les protéines de fenugrec et leur hydrolysate d'Espérance possèdent des propriétés hypocholestérolémiantes et antiathérogènes via leur pouvoir à diminuer la fraction athérogène des lipoprotéines. De plus, ils diminuent les concentrations des triglycérides hépatiques et les teneurs en cholestérol et en phospholipides de l'aorte. Les protéines de fenugrec sont également hypotriglycéridémiantes. Il se peut que les protéines, hydrolysées ou non avec l'Espérance, exercent leur effet hypolipémiant selon des mécanismes distincts. Par ailleurs, les propriétés hypocholestérolémiantes de l'isolat des protéines de fenugrec sont plus importantes que celles des protéines hydrolysées. En outre, les protéines hydrolysées avec la Purafect ne semblent pas avoir de propriétés hypocholestérolémiantes.

Il est bien établi que le stress oxydant est l'un des facteurs qui relie l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose où la fonctionnalité des HDL joue un rôle fondamental. Ce stress résulte d'une surproduction des radicaux libres et/ou d'une défense antioxydante déficiente conduisant à une oxydation des lipides (Yahia *et al.*, 2017). Dans l'objectif de tester si les protéines et les hydrolysats de fenugrec peuvent prévenir les effets oxydatifs causés par l'hypercholestérolémie, nous avons étudié la fonctionnalité des HDL, les marqueurs de l'oxydation, et les enzymes antioxydantes dans les tissus cibles de l'athérosclérose.

Les lipoprotéines à apo B sont connues pour leur forte susceptibilité à l'oxydation. En effet, les produits de la peroxydation lipidique, présents dans ces lipoprotéines, peuvent induire une réaction inflammatoire dans les cellules de la paroi artérielle, ce qui contribue au dysfonctionnement endothélial et à la mort des cellules endothéliales, étapes clés de l'initiation et de la progression des lésions athérosclérotiques. En revanche, les HDL jouent un rôle important dans la protection contre l'oxydation des lipoprotéines. Cette propriété est attribuée à certaines molécules qui sont transportées par cette particule (Hafiane et Genest, 2013). A cet

effet, nous avons évalué en premier lieu, la capacité des HDL à protéger les lipoprotéines athérogènes de l'oxydation.

Les résultats ont indiqué que les VLDL des rats IPF, incubées sans HDL, sont moins sensibles à l'oxydation comparées à celles des rats HC. En revanche, celles des groupes PFHP et PFHE sont plus susceptibles à l'oxydation. Ces résultats ne peuvent pas être expliqués par une différence des teneurs en phospholipides dans ces lipoprotéines. En effet, pour les mêmes quantités de cholestérol, le contenu en PL est sensiblement le même (PFHP), voire même plus faible (PFHE), par rapport au groupe HC. Il se pourrait que cette forte oxydabilité soit due à la nature des lipides transportés par les lipoprotéines plutôt qu'au contenu en PL.

Lorsque les VLDL sont incubées en présence de leurs HDL correspondantes, les résultats ont montré une importante diminution de l'oxydation chez les groupes PFHP et PFHE par rapport au groupe non traité (HC). Yahia *et al.*, (2017), sont parvenus aux mêmes résultats. Cette propriété antioxydante élevée des HDL pourrait être attribuée à une augmentation de l'activité de leurs molécules et enzymes antioxydantes. En effet, la paraoxonase, portée par les HDL, dont l'activité a été stimulée par les hydrolysats, peut inhiber la formation des phospholipides oxydés dans les lipoprotéines athérogène (Hafiane et Genest, 2013). De même, Yahia *et al.*, (2017), ont noté une augmentation de l'activité PON1 chez le rat HC traité avec l'hydrolysate de pois chiche.

Cependant, il est difficile de déterminer si cette augmentation de l'activité PON1 est modulée par les hydrolysats ou par la forte oxydabilité des VLDL. Néanmoins, Aviram *et al.*, (1999), rapportent que l'activité paraoxonase est inhibée par les fortes teneurs en LDL oxydées. Ces résultats permettent de suggérer que les hydrolysats ont permis de lever cette inhibition de la paraoxonase.

L'hypercholestérolémie peut également provoquer un stress oxydant au niveau de certains tissus cibles. Dans le but d'étudier l'effet du traitement des rats HC avec l'IPF et les hydrolysats sur le statut redox au niveau tissulaire, un marqueur de l'oxydation, ainsi que les activités de certaines enzymes antioxydantes ont été explorés au niveau des organes cibles, à savoir le foie, le cœur et l'aorte.

Le régime hypercholestérolémiant n'a pas modifié significativement les niveaux des TBARS hépatiques et cardiaques, comparé au régime témoin. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Ben Khaled *et al.*, (2012), et Ktari *et al.*, (2015), qui ont démontré que ce

type de régime augmente l'oxydation au niveau hépatique. La période de l'expérimentation, qui est deux fois plus longue que celle de cette étude, pourrait expliquer cette différence dans les résultats.

Lorsque les rats HC sont traités avec les PFHE, une diminution des niveaux des TBARS hépatiques et cardiaques est observée. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de Yang *et al.*, (2008b), qui ont noté une diminution des teneurs en MDA cardiaques après apport en hydrolysats de protéines de soja. De même, Ktari *et al.*, (2015), et Ben Khaled *et al.*, (2012), ont noté une diminution des teneurs en TBARS hépatiques, en particulier avec les hydrolysats des protéines de poisson comparés aux protéines brutes. Ces auteurs expliquent ces résultats par une action antioxydante directe des peptides vis-à-vis des ERO. En effet, Zhang *et al.*, (2018), ont noté que certains peptides ont pu être retrouvés dans le pôle basal des cellules intestinales en culture. De plus, Yahia *et al.*, (2017), ont observé une baisse de l'oxydation des lipides chez des rat traités avec des protéines de pois chiche hydrolysées à 17%, mais pas avec celles hydrolysées à 8%, ce qui suggère qu'il existe une relation entre degré d'hydrolyse des protéines et effet antioxydant *in vivo*, comme le montre l'absence d'effet des PFHP (DH=8%) sur les TBARS tissulaires.

Au niveau cardiaque, la diminution des TBARS chez le groupe traité avec les PFHE pourrait également s'expliquer par les fortes teneurs en thiols dans ce tissu, d'où la corrélation négative ($r = -0,63$, $P = 0,015$) entre ces deux paramètres.

Au niveau de l'aorte, les TBARS ont augmenté chez le groupe HC, comparé au T. Cette conséquence délétère du cholestérol au niveau de l'aorte a été également notée dans l'étude d'Olorunnisola *et al.*, (2012). Lorsque ces rats HC sont traités avec l'IPF, une diminution des niveaux des TBARS est notée. Ceci pourrait être dû aux faibles teneurs tissulaires en PL chez ce groupe comparé au groupe HC. En effet, il existe une corrélation positive entre les teneurs en TBARS et celles en PL dans ce tissu. Selon Shahidi et Zhong, (2005), les acides gras insaturés dans les phospholipides, et en partie dans les esters de cholestérol, sont des substrats susceptibles d'être oxydables.

Par ailleurs, les résultats ont également montré une corrélation positive entre la cholestérolémie et les concentrations tissulaires des TBARS au niveau de l'aorte. Il se pourrait que les faibles teneurs des VLDL-LDL en cholestérol, ainsi que l'important potentiel antioxydant des HDL, chez le groupe PFHE, et en particulier chez le groupe IPF, ont probablement réduit les taux des LDL oxydées, ce qui aurait diminué par conséquent la

signalisation oxydante dans les cellules vasculaires, telle que suggéré par Negre-Salvayre *et al.*, (2006).

L'hypercholestérolémie n'est pas seulement impliquée dans l'augmentation du niveau de l'oxydation et de la production des radicaux libres, mais elle est aussi responsable d'une perturbation du système antioxydant. Au niveau hépatique, les résultats montrent que le régime HC a fortement augmenté l'activité SOD. Ceci serait dû à une accumulation des lipides qui, par conséquent, augmenterait la production des ERO, comme l'anion superoxyde, dans cet organe (Ucar *et al.*, 2013). Cette augmentation du O_2^- serait probablement due à la stimulation des enzymes CYP7A1, la xanthine oxydase, et en particulier la NADPH-oxydase (NOX), principaux pourvoyeurs du substrat de la SOD (De Oliveira et Burini, 2012 ; Ucar *et al.*, 2013). En effet, il a été rapporté que les fortes teneurs intracellulaires en cholestérol activent la NOX (Csonka *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'activité catalase hépatique est restée inchangée.

D'après Ktari *et al.*, (2015), et Olorunnisola *et al.*, (2012), un apport en cholestérol augmente les activités SOD et catalase hépatiques. Alors que, Lassoued *et al.*, (2014), et Ben Khaled *et al.*, (2012), ont plutôt noté une diminution des activités de ces deux enzymes.

Lorsque les rats HC ont été traités avec l'IPF, hydrolysées ou non, une augmentation de l'activité SOD hépatique a été notée. Par ailleurs, les activités catalase et glutathion réductase sont restées inchangées chez ces rats. A notre connaissance, seul un nombre limité d'études a évalué les propriétés antioxydantes de protéines et de leurs hydrolysats, en particulier d'origine végétale, dans des conditions physiologiques (Chakrabarti et Wu, 2016 ; Maestri *et al.*, 2018). Toutefois, il a été démontré que des protéines et des hydrolysats, de produits marins surtout (Ben Khaled *et al.*, 2012 ; Lassoued *et al.*, 2014), augmentent la défense antioxydante hépatique (SOD, catalase et glutathion peroxydase) chez les rats hypercholestérolémiques, tandis que Ktari *et al.*, (2015), ont noté une diminution de l'activité de ces enzymes.

L'hypercholestérolémie est aussi associée à une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes au niveau cardiaque (Csonka *et al.*, 2016). En effet, l'activité SOD cardiaque a diminué chez tous les groupes HC. Cependant, l'hypercholestérolémie n'a pas affecté les activités catalase et GSSG-Red au niveau cardiaque. Chez les rats PFHE, l'activité catalase est augmentée comparée à celle des rats HC. Il paraît que les PFHE ont permis cette augmentation de l'activité catalase, qui a contribué, éventuellement, aux faibles teneurs en TBARS dans ce tissu.

Au niveau de l'aorte, l'activité catalase est augmentée chez tous les animaux consommant le régime HC, ce qui rejoint les résultats d'Olorunnisola *et al.*, (2012). Les deux principales sources d'oxydants dans le système vasculaire sont les macrophages et les cellules musculaires lisses. Les premières sont recrutées en réponse à une présence de molécules toxiques (ex. lipides oxydés) ou de corps étrangers, et qui peuvent produire des espèces radicalaires en particulier via les NOX (Stapleton *et al.*, 2010).

Le traitement des rats HC avec l'IPF et les PFHP a augmenté l'activité SOD au niveau de l'aorte. Cette activité élevée de la SOD est traduite par une augmentation de l'activité catalase chez le groupe IPF. L'augmentation des activités SOD et catalase, associée à la diminution des teneurs en PL aortiques et de la cholestérolémie chez le groupe IPF, a probablement permis une diminution des TBARS dans ce tissu. En revanche, chez le groupe PFHP vs. HC, l'augmentation de l'activité SOD aortique est plutôt associée à une augmentation de l'activité GSSG-Red. Cependant, apparemment en raison de la cholestérolémie élevée et des fortes teneurs en PL au niveau de ce tissu, l'augmentation de l'activité GSSG-Red n'a pas permis de réduire les taux des TBARS chez ce groupe.

Les protéines de fenugrec protègent contre les effets délétères oxydants de l'hypercholestérolémie chez le rat Wistar, principalement au niveau de l'aorte. Lorsque ces protéines sont hydrolysées, en particulier avec l'Espérase, leurs propriétés antioxydantes se sont améliorées en augmentant la capacité antioxydante des lipoprotéines, et la défense antioxydante du cœur et du foie, ce qui s'est traduit par une diminution de la peroxydation des lipides.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été réalisé dans le but de comparer les propriétés antioxydantes et hypocholestérolémiantes des protéines de fenugrec et de leurs hydrolysats.

Au terme de cette étude, il ressort que les protéines de fenugrec possèdent une propriété antioxydante *in vitro*. Après hydrolyse, cette activité est particulièrement améliorée avec l'Espérase. La différence entre les activités obtenues par les deux hydrolysats pourrait être due à la différence dans leurs compositions et/ou au degré d'hydrolyse. Il ressort aussi que les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats peuvent exercer leur potentiel antioxydant *via* plusieurs mécanismes moléculaires.

Les protéines de fenugrec et leur hydrolysate d'Espérase possèdent également des propriétés hypolipémiantes. En effet, ils ont protégé contre l'hypertriglycéridémie et l'hypercholestérolémie, en diminuant les teneurs des fractions athérogènes en cholestérol. Ces deux préparations ont également protégé contre l'accumulation des triglycérides au niveau hépatique. Cependant, le traitement des rats avec les protéines et les hydrolysats de fenugrec n'a pas protégé contre l'accumulation du cholestérol au niveau hépatique.

L'IPF et les PFHE ont aussi diminué les transaminases sériques, les rapports d'athérogénicité et les teneurs de l'aorte en cholestérol et en phospholipides, ce qui pourrait leur conférer une propriété antiathérogène et cardioprotectrice. Mais, il est important de préciser que l'effet hypolipémiant de l'isolat de protéines de fenugrec est plus important que celui de l'hydrolysate d'Espérase.

Les protéines de fenugrec possèdent aussi un effet antioxydant *in vivo*, et ce en protégeant les organes cibles (foie, cœur et aorte) contre un stress oxydant provoqué par l'hypercholestérolémie. Ceci est principalement constaté par l'augmentation de l'activité antioxydante au niveau du foie et de l'aorte.

Comme observé *in vitro*, l'hydrolyse des protéines, en particulier avec l'Espérase, améliore leurs propriétés antioxydantes *in vivo*. L'apport en hydrolysats améliore les fonctionnalités antioxydantes des HDL probablement via l'augmentation de l'activité paraoxonase. Elles ont ainsi amélioré la défense antioxydante et diminué l'oxydation au niveau cardiaque et hépatique.

Au vu de ces résultats, on peut déduire que l'hydrolyse des protéines de fenugrec améliore leurs propriétés antioxydantes, mais pas leur propriété hypocholestérolémiante.

Cette étude a démontré que les protéines de fenugrec et leur hydrolysat d'Espérase peuvent d'être considérés comme aliments nutraceutiques dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires liées à la dyslipidémie.

Cependant, certains points dans cette étude restent à éclaircir :

- En effet, du fait que les deux hydrolysats ont une composition en acides aminés presque similaire, nous ne pouvions pas expliquer avec précision la différence dans l'activité antioxydante entre les deux hydrolysats.
- De plus, il est difficile de trancher si l'effet hypocholestérolémiant et antioxydant, observé chez le rat suite à l'apport en protéines et en hydrolysats de fenugrec, est dû à une action directe de ces derniers à l'échelle moléculaire et cellulaire, ou une conséquence de l'inhibition de l'absorption du cholestérol au niveau intestinal.

Ceci nous conduit à suggérer, en perspective :

- D'identifier et de caractériser les peptides responsables de cette activité afin de mieux comprendre les résultats de cette étude.
- D'étudier l'impact de l'apport en ces deux aliments bioactifs sur l'expression des gènes liés au métabolisme du cholestérol et des lipides en phase postprandiale.
- Il serait aussi intéressant de vérifier si l'utilisation combinée de l'isolat des protéines de fenugrec, principalement hypolipémiant, et de son hydrolysat d'Espérase, principalement antioxydant, pourrait donner de meilleures propriétés.

Références
bibliographiques

Liste des Références

- Abd El Rahman A.M.M. (2014). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of fenugreek in different forms on experimental rats. *World Applied Sciences Journal*; 29(7):835-841.
- Abu-Salem F.M., Mahmoud M.H., El-Kalyoubi M.H., Gibriel A.Y. et Abou-Arab A.A. (2013). Characterization of antioxidant peptides of soybean protein hydrolysate. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*; 7(7):238-242.
- Adams M.R., Golden D.L., Franke A.A., Potter S.M., Smith H.S. et Anthony M.S. (2004). Dietary soy β -conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *The Journal of Nutrition*; 134(3):511-516.
- Adler-Nissen J. (1982). Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *Journal of Chemical and Technical Biotechnology*; 32:138-156.
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*; 105:121-126.
- Agyei D., Tan K.-X., Pan S., Udenigwe C.C. et Danquah M.K. (2018). Peptides for biopharmaceutical applications. In: Koutsopoulos S (ed.). *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Woodhead Publishing, pp. 231-251.
- Ajibola C.F., Fashakin J.B., Fagbemi T.N. et Aluko R.I. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of african yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. *International Journal of Molecular Science*; 12:6685-6702.
- Alam M.N., Bristi N.J. et Rafiquzzaman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*; 21:143-152.
- Amza T., Balla A., Tounkara F., Man L. et Zhou H.M. (2013). Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *International Food Research Journal*; 20(5):2081-2090.
- Apak R., Gorinstein S., Böhm V., Schaich K.M., Özyürek M. et Güçlü K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity-activity. *Pure and Applied Chemistry*; 85(5):957-998.
- Arias-Moscoso J.L., Maldonado-Arce A., Rouzaud-Sandez O., Márquez-Ríos E., Torres-Arreola W., Santacruz-Ortega H., Gaxiola-Cortés M.G. et Ezquerria-Brauer J.M. (2015). Physicochemical characterization of protein hydrolysates produced by autolysis of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproducts. *Food Biophysics*; 10(2):145-154.
- Atek M., Laid Y., Mezimeche N., Boutekdjiret L., Lebciir H. et Ait Mohand A. (2008). Analyse des causes de décès année 2002- rapport. *Institut National de Santé Publique Algérie et Projet TAHINA*; Alger. <http://www.insp.dz/index.php/Non-categorise/enquetes.html>
- Atek M., Ouchfoun A., Laid Y., Mezimeche N., Lebciir H., Boutekdjiret L., Boughoufalah A., Ait Mohand A., Houti L., Hadjidj C., Khetache R. et Lebeche R. (2007). La transition épidémiologique et le système de santé en Algérie: Enquête Nationale Santé 2005. *Institut National de Santé Publique - Algérie & Projet TAHINA*; Alger. DOI10.13140/RG.2.1.1668.4967/

- Aviram M., Rosenblat M., Billecke S., Eroglu J., Sorenson R., Bisgaier C.L., Newton R.S. et La Du B. (1999). Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*; 26(7-8):892-904.
- Badimón J.J. et Ibáñez B. (2010). Increasing high-density lipoprotein as a therapeutic target in atherothrombotic disease. *Revista Española de Cardiología*; 63(3):323-333.
- Bähr M., Fechner A., Krämer J., Kiehntopf M. et Jahreis G. (2013). Lupin protein positively affects plasma LDL cholesterol and LDL:HDL cholesterol ratio in hypercholesterolemic adults after four weeks of supplementation: a randomized, controlled crossover study. *Nutrition Journal*; 12:107-116.
- Bangalore S., Fayyad R., Kastelein J.J., Laskey R., Amarencu P., Demicco D.A. et Waters D.D. (2016). 2013 Cholesterol guidelines revisited: Percent LDL cholesterol reduction or attained LDL cholesterol level or both for prognosis? *The American Journal of Medicine*; 129(4):384-391.
- Barbana C., Boucher A.C. et Boye J.I. (2011). In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *Food Research International*; 44:174-180.
- Bazzano L.A., Thompson A.M., Tees M.T., Nguyen C.H. et Winham D.M. (2011). Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*; 21(2):94-103(2):94-103.
- Bejarano J.M.L., Galve E., Royo-Bordonada M.A., Ezquerro E.A., Armario P., Cuixart C.B., Babkowski M.C., Fort A.C., Galán A.M., Morató T.M., Pérez A.P., Pedro-Botet J., Álvarez F.V. et González-Juanatey J.R. (2014). Spanish interdisciplinary committee for cardiovascular disease prevention and the spanish society of cardiology position statement on dyslipidemia management. Differences between the european and american guidelines. *Revista Española de Cardiología*; 67(11):913-919.
- Belguith-Hadriche O., Bouaziz M., Jamoussia K., Simmonds M., El Feki A. et Makni-Ayedi F. (2013). Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chemistry*; 138:1448-1453.
- Ben Khaled H., Ghlissi Z., Chtourou Y., Hakim A., Ktari N., Fatma M.A., Barkia A., Sahnoun Z. et Nasri M. (2012). Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Research International*; 45(1):60-68.
- Bettzieche A., Brandsch C., Weiße K., Hirche F., Eder K. et Stang G.I. (2008). Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. *British Journal of Nutrition*; 99:952-962.
- Blachie F., Lancha A.H., Boutry C. et Tome D. (2010). Alimentary proteins, amino acids and cholesterolemia. *Amino Acids*; 38:15-22.
- Blanco-Míguez A., Gutiérrez-Jácome A., Pérez-Pérez M., Pérez-Rodríguez G., Catalán-García S., Fdez-Riverola F., Lourenço A. et Sánchez B. (2016). From amino acid sequence to bioactivity: The biomedical potential of antitumor peptides. *Protein Science*; 25(6):1084-1095.

- Boualga A., Prost J., Taleb-Senouci D., Krouf D., Kharoubi O., Lamri-Senhadj M.Y., Bouchenak M. et Belleville J. (2009). Purified chickpea or lentil proteins impair very-low-density lipoprotein (VLDL) metabolism and lipoprotein lipase activity in epididymal fat, but not in muscle, compared to casein, in growing rats. *European Journal of Nutrition*; 48(3):162-169.
- Bouchenak M. et Lamri-Senhadj M.Y. (2013). Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: A review. *Journal of Medicinal Food*; 16(3):185-198.
- Boye J.I., Aksay S., Roufik S., Ribéreau S., Mondor M., Farnworth E. et Rajamohamed S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*; 43:537-546.
- Brites F., Martin M., Guillas I. et Kontush A. (2017). Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clinical*; 8:66-77.
- Bueno-Solano C., López-Cervantes J., Campas-Baypoli O.N., Lauterio-García R., Adan-Bante N.P. et Sánchez-Machado D.I. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*; 112:671-675.
- Cao W., Zhang C., Hong P., Ji H., Hao J. et Zhang J. (2009). Autolysis of shrimp head by gradual temperature and nutritional quality of the resulting hydrolysate. *Food Science and Technology*; 42:244-249.
- Carocho M. et Ferreira I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*; 51:15–25.
- Chabanon G. (2005). Hydrolyses enzymatiques d'isolats protéiques issus de tourteaux de colza : cinétique, modélisation, caractérisation et fonctionnalité des peptides. Thèse de doctorat en Procédés Biotechnologiques et Alimentaires; *Institut national polytechnique de Lorraine, Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires*.
- Chakrabarti S. et Wu J. (2016). Bioactive peptides on endothelial function. *Food Science and Human Wellness*; 5(1):1-7.
- Chalé H.F., Ruiz J.C.R., Ancona D.B., Fernández J.J.A. et Campos M.R.S. (2016). The hypolipidemic effect and antithrombotic activity of *Mucuna pruriens* protein hydrolysates. *Food and Function*; 7:434-444.
- Charles R.L., Burgoyne J.R. et Eaton P. (2010). Mechanisms of redox signaling in cardiovascular disease. In: Sauer H, Shah AM & Laurindo FRM (eds.). *Studies on cardiovascular disorders*. Humana Press, London, pp. 43-60.
- Chen Z.Y., Ma K.Y., Liang Y., Peng C. et Zuo Y. (2011). Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *Journal of Functional Foods*; 3(2):61-69.
- Cho S.J., Juillerat M.A. et Lee C.H. (2007). Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 55(26):10599-10604.

- Cicero A.F.G., Fogacci F. et Colletti A. (2016). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of Pharmacology*; DOI: 10.1111/bph.13608.
- Council of European Communities. (1987). Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. *Official Journal European Communities (JO 86/609/CEE) L358, Brussels*:1-28.
- Csonka C., Sárközy M., Pipicz M., Dux L. et Csont T. (2016). Modulation of hypercholesterolemia-induced oxidative/nitrative stress in the heart. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; doi:10.1155/2016/3863726.
- Csont T., Bereczki E., Bencsik P., Fodor G., Görbe A., Zvara À., Csonka C., Puskás L.G., Sántha M. et Ferdinandy P. (2007). Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovascular Research*; 76:100-109.
- Daliri E.B.-M., Oh D.H. et Lee B.H. (2017). Bioactive Peptides. *Foods*; 6(5):32-52.
- Das R. et Bhattacharjee C. (2013). In vitro evaluation of antioxidant activity and radical scavenging activity of sesame bioactive peptides. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*; 3(11):521-527.
- De Mejia E.G. et Dia V.P. (2010). The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer and Metastasis Reviews*; 29(3):511-528.
- De Oliveira E.P. et Burini R.C. (2012). High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetology & Metabolic Syndrome*; 4:12-12.
- Defraigne J.O. et Pincemail J. (2008). Stress oxydant et antioxydants : Mythes et réalités. *Revue Medicale de Liege*; 63:10-19.
- Devrim E., Ergüder I.B., Ozbek H. et Durak I. (2008). High-cholesterol diet increases xanthine oxidase and decreases nitric oxide synthase activities in erythrocytes from rats. *Nutrition Research*; 28(3):212-215.
- Duka A., Fotakis P., Georgiadou D., Kateifides A., Tzavlaki K., Von Eckardstein L., Stratikos E., Kardassis D. et Zannis V.I. (2013). ApoA-IV promotes the biogenesis of apoA-IV-containing HDL particles with the participation of ABCA1 and LCAT. *The Journal of Lipid Research*; 54(1):107-115.
- Duranti M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*; 77:67-82.
- Eckerson H.W., Wyte C. et La Du B.N. (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *American Journal of Human Genetics*; 35:1126-1138.
- El Nasri A., N. et El Tinay A., H. (2007). Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentration. *Food Chemistry*; 103:582-589.
- Elmnan A., Balgees A. et Mangara J.L. (2012). Effect of fenugreek (*Trigonella foenm greacum*) seed dietary levels on lipid profile and body weight gain of rats. *Pakistan Journal of Nutrition*; 11(11):1004-1008.

- Erdmann K., Grosser N., Schipporeit K. et Schroder H. (2006). The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *Journal of Nutrition*; 136:2148-2152.
- Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V. et Reiner E. (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry*; 2013:224-227.
- Fæste C.K., Namork E. et Lindvik H. (2009). Allergenicity and antigenicity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) proteins in foods. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 123:184-194.
- Fassini P.G., Noda R.W., Ferreira E.S., Silva M.A., Neves V.A. et Demonte A. (2011). Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats. *Lipids in Health and Disease*; 10:165-171.
- Ferreira E.S., Amaral A.L.S., Demonte A., Zanelli C.F., Capraro J., Duranti M. et Neves V.A. (2015). Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans. *Journal of Nutritional Science*; 4(7):1-9.
- Ferreira E.S., Silva M.A., Demonte A. et Neves V.A. (2010). b-Conglycinin (7S) and glycinin (11S) exert a hypocholesterolemic effect comparable to that of fenofibrate in rats fed a high-cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*; 2:275-283.
- Ferrières J., Bongard V., Dallongeville J., Arveiler D., Cotel D., Haas B., Wagner A., Amouyel P. et Ruidavets J.B. (2009). Trends in plasma lipids, lipoproteins and dyslipidaemias in French adults, 1996-2007. *Archives of Cardiovascular Disease*; 102(4):293-301.
- Feyzi S., Varidi M., Zare F. et Varidi M.J. (2015). Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 95(15):3165-3176.
- Folch J., Lees M. et Sloane-Stanley G.H. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*; 226:497-509.
- Fontaine E., Barnoud D., Schwebel C. et Leverve X. (2002). Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*; 11:411-420.
- Frota K.M., Mendonça S., Saldiva P.H., Cruz R.J. et Arêas J.A. (2008). Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *Journal of Food Science*; 73(9):H235-H240.
- Gao C., Sun R., Xie Y.R., Jiang A.L., Lin M., Li M., Chen Z.W., Zhang P., Jin H. et Feng J.P. (2017). The soy-derived peptide Vglycin inhibits the growth of colon cancer cells in vitro and in vivo. *Experimental Biology and Medicine*; 242(10):1034-1043.
- Garcia M.C., Puchalska P., Esteve C. et Marina M.L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*; 106:328-349.
- Girgih A.T., Alashi A.M., He R., Malomo S.A., Raj P., Netticadan T. et Aluko R.E. (2014). A novel hemp seed meal protein hydrolysate reduces oxidative stress factors in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients*; 6(12):5652-5666.

- Godel H., Seitz P. et Verhoef M. (1992). Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. *LC-GC International*; 5(2):44-49.
- Golla U. et Bhimathati S.S.R. (2014). Evaluation of antioxidant and DNA damage protection activity of the hydroalcoholic extract of *Desmostachya bipinnata* L. Stapf. *The Scientific World Journal*; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/215084>.
- González-Ortega O., López-Limón A.L., Morales-Domínguez J.F. et Soria-Guerra R.E. (2015). Production and purification of recombinant hypocholesterolemic peptides. *Biotechnological Letters*; 37:41-54.
- Guerard F., Guimas L. et Binet A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 19(20):489-498.
- Guerin J., Kriznik A., Ramalanjaona N., Le Roux Y. et Girardet J.M. (2016). Interaction between dietary bioactive peptides of short length and bile salts in submicellar or micellar state. *Food Chemistry*; 209:114-122.
- Hafiane A. et Genest J. (2013). HDL, atherosclerosis, and emerging therapies. *Cholesterol*; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/891403>.
- Hao W. et Friedman A. (2014). The LDL-HDL profile determines the risk of atherosclerosis: A mathematical model. *PLoS One*; 9(3):e90497.
- Hari N. et Mohan V. (2014). Isolation of (2S,3R,4S)-4-hydroxyisoleucine from *Trigonella foenum graecum* seeds. *Asian Journal of Chemistry*; 26(10):3082-3084.
- He R., Girgih A.T., Malomo S.A., Ju X. et Aluko R.E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*; 5:219-227.
- Hilton J.W. (1989). Les antioxydants: roles, types et necessites dans les ailments pour animaux de compagnie. *Canadian Veterinary Journal*; 30:834-837.
- Holtzman J.L. (2007). The role of glutathione pathways in the prevention of atherosclerosis. In: Holtzman J.L. (ed.). *Atherosclerosis and Oxidant Stress: A New Perspective*. Springer, New York, pp. 211-239.
- Horwitz W. (2000). Food composition ; additives ; natural contaminants. In: Horwitz W & AOAC International (eds.). 17th ed: *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International, Gaithersburg.
- Hrčková M., Rusňáková M. et Zemanovič J. (2002). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, (20):7-14.
- Hubáček J.A., Bobková D., Bohuslavová R. et Poledne R. (2008). Differences in expression of cholesterol 7 α -hydroxylase between PHHC and wistar rats. *Folia Biologica*; 54:18-23.
- Hwang J.Y., Shyu Y.S., Wang Y.T. et Hsu C.K. (2010). Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. *Food Science and Technology*; 43:285-290.

- Jemil I., Nasri R., Abdelhedi O., Aristoy M.-C., Ben Slama R., Kallel C., Marrekchi R., Jamoussi K., Elfeki A., Hajji M., Toldrá F. et Nasri M. (2017). Beneficial effects of fermented sardinelle protein hydrolysates on hypercaloric diet induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in wistar rats. *Journal of Food Science and Technology*; 54(2):313-325.
- Jiménez-Ruiz E.I., Calderón De La Barca A.M., Sotelo-Mundo R.R., Arteaga-Mackinney G.E., Valenzuela-Melendez M. et Peña-Ramos E.A. (2013). Partial characterization of ultrafiltrated soy protein hydrolysates with antioxidant and free radical scavenging activities. *Journal of Food Science*; 78(8):1152-1158.
- Jridi M., Lassoued I., Nasri R., Ayadi M.A., Nasri M. et Souissi N. (2014). Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *BioMed Research International*; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/461728>.
- Kanu P.J., Kanu J.B., Sandy E.H., Kandeh J.B.A., Mornya P.M.P. et Huiming Z. (2009). Optimization of enzymatic hydrolysis of defatted sesame flour by different proteases and their effect on the functional properties of the resulting protein hydrolysate. *American Journal of Food Technology*; 4(6):226-240.
- Kapravelou G., Martínez R., Andrade A.M., Sánchez C., Chaves C.L., López-Jurado M., Aranda P., Cantarero S., Arrebola F., Fernández-Segura E., Galisteo M. et Porres J.M. (2013). Health promoting effects of Lupin (*Lupinus albus* var. *multolupa*) protein hydrolyzate and insoluble fiber in a diet-induced animal experimental model of hypercholesterolemia. *Food Research International*; 54:1471-1481.
- Kitts D.D. et Weiler K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*; 9:1309-1323.
- Koleva I.I., Van Beek T.A., Linssen J.P.H., De Groot A. et Evstatieva L.N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*; 13:8-17.
- Kong X.Z., Guo M.M., Hua Y.F., Cao D. et Zhang C.M. (2008). Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology*; 99:8873-8879.
- Kostić D.A., Dimitrijević D.S., Stojanović G.S., Palić I.R., Đorđević A.S. et Ickovski J.D. (2015). Xanthine oxidase: Isolation, assays of activity, and inhibition. *Journal of Chemistry*; dx.doi.org/10.1155/2015/294858.
- Kristinsson H.G. et Rasco B.A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 40(1):43-81.
- Ktari N., Belguith-Hadriche O., Ben Amara I., Ben Hadj A., Turki M., Makni-Ayedi F., Boudaouara T., El Feki A., Boualga A., Ben Salah R. et Nasri M. (2015). Cholesterol regulatory effects and antioxidant activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in cholesterol-fed rats. *Food and Function*; 6(7):2273-2282.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685.

- Lammi C., Zanoni C., Scigliuolo G.M., D'amato A. et Arnoldi A. (2014). Lupin peptides lower low-density lipoprotein (LDL) cholesterol through an up-regulation of the LDL receptor/sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) pathway at HepG2 cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 62:7151-7159.
- Lassoued I., Trigui M., Ghilissi Z., Nasri R., Jamoussi K., Kessiss M., Sahnoun Z., Rebai T., Boualga A., Lamri-Senhadj M., Nasri M. et Barkia A. (2014). Evaluation of hypocholesterolemic effect and antioxidant activity of *Boops boops* proteins in cholesterol-fed rats. *Food & Function*; 5(6):1224-1231.
- Lemes A.C., Sala L., Ores J.C., Braga A.R.C., Egea M.B. et Fernandes K.F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International Journal of Molecular Sciences*; 17:950-973.
- León-Espinosa E.B., Sánchez-Chino X., Garduño-Siciliano L., Álvarez-González R.I., Dávila-Ortiz G., Madrigal-Bujaidar E., Téllez-Medina D.I. et Jiménez-Martínez C. (2016). Hypocholesterolemic and anticarcinogenic effect of *Vicia faba* protein hydrolyzates. *Nutrition and Cancer*; 68(5):856-864.
- Leong X.F., Ng C.Y. et Jaarin K. (2015). Animal models in cardiovascular research: Hypertension and atherosclerosis. *BioMed Research International*; dx.doi.org/10.1155/2015/528757.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*; 193:265-275.
- Luna Vital D.A., Mojica L., González De Mejía E., Mendoza S. et Loarca-Piña G. (2015). Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food Research International*; 76(1):39-50.
- M.I.C.S4. (2015). Multiple Indicator Cluster Surveys: Enquête nationale à indicateurs multiples 2012-2013- rapport final. *Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière, Office National des Statistiques, UNICEF, UNFPA, Système des Nations Unies pour le Développement pour l'Algérie; Algérie.*
- Macarulla M.T., Medina C., Arànzazu D.M., Chavarri M., Zulet M.A., Martinez J.A., Noel-Suberville C., Higuieret P. et Portillo M. (2001). Effect of whole seed and protein isolate of Faba bean (*Vicia faba*) on the cholesterol metabolism of hypercholesterolemic rats. *British Journal of Nutrition*; 85:607-614.
- Machecourt J. (2005). Semiologie et pathologies cardiovasculaire. Pathologie cardiovasculaire: Chapitre 1. Athérosclérose : Epidemiologie, physiopathologie et prévention. <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/sante/CardioCD/cardio/chapitre/412.htm>
- Madamanchi N.R., Hakim Z.S. et Runge M.S. (2005a). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 3:254-267.
- Madamanchi N.R., Vendrov A. et Runge S.M. (2005b). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 25:29-38.
- Madhava Naidu M., Shyamala B.N., Pura Naik J., Sulochanamma G. et Srinivas P. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds. *Food Science and Technology*; 44:451-456.

- Maestri E., Pavlicevic M., Montorsi M. et Marmiroli N. (2018). Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; 18(1):3-30.
- Malaguti M., Dinelli G., Leoncini E., Bregola V., Bosi S., Cicero A.F. et Hrelia S. (2014). Bioactive peptides in cereals and legumes: agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*; 15(11):21120-21135.
- Marques M.R., Fontanari G.G., Pimenta D.C., Soares-Freitas R.M. et Arêas J.a.G. (2015). Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity. *Food Research International*; 77(1):43-48.
- Mayilvaganan M., Singh S.P. et Johari R.P. (2004). Hypocholesterolemic effect of protein prepared from *Phaseolus aconitifolius*. *Indian Journal of Experimental Biology*; 42(9):904-908.
- Mendonça S., Saldiva P.H., Cruz R.J. et Arêas J.a.G. (2009). Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry*; 116:738-742.
- Mesbah S., Nadir D., Razanamparany M. et Coppieters Y. (2013). Plan stratégique national multisectoriel de lutte intégrée contre les facteurs de risque des maladies non transmissibles 2015-2019: rapport. *MSPRH, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière/ Direction Générale de la Prévention et de la Promotion de la Santé*; Algérie.
- Möller N.P., Scholz-Ahrens K.E., Roos N. et Schrezenmeir J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*; 47(4):171-182.
- Mukthamba P. et Srinivasan K. (2015). Hypolipidemic influence of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and garlic (*Allium sativum*) in experimental myocardial infarction. *Food and Function*; 6:3117-3125.
- Mukthamba P. et Srinivasan K. (2016). Protective effect of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and garlic (*Allium sativum*) on induced oxidation of low-density lipoprotein in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*; 27(1):39-47.
- Mundi S. et Aluko R.E. (2014). Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin Journal of Nutrition and Food sciences*; 2(1):1008-1018.
- Muraki E., Hayashi Y., Chiba H., Tsunoda N. et Kasono K. (2011). Dose-dependent effects, safety and tolerability of fenugreek in diet-induced metabolic disorders in rats. *Lipids in Health and Disease*; 10:240-245.
- Nasri M. (2017). Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. In: Toldrá F (ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press, pp. 109-159.
- Nathiya S., Durga M. et Devasena T. (2014). Therapeutic role of *Trigonella foenum-graecum* (Fenugreek) – A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*; 27(2):74-80.

- Navab M., Hama S.Y., Hough G.P., Subbanagounder G., Reddy S.T. et Fogelman L.M. (2001). A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *The Journal of Lipid Research*; 42:1308-1317.
- Negre-Salvayre A., Vindis C. et Salvayre R. (2006). Signalisation apoptotique induite par les LDL oxydées Implication dans l'athérosclérose. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*; 13(1):39-45.
- Nieland T.J.F., Ehrlich M., Krieger M. et Kirchhausen T. (2005). Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1734:44-51.
- Niknam V., Sharifzadeh B., Ebrahimzadeh H., Zarre S. et Izadpanah M. (2004). Comparative study of proteins in seeds of some species of *Trigonella* from Iran. *Iranian International Journal of Science*; 5(1):1-11.
- Nwachukwu I.D. et Aluko E.R. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*; 43:e12761.
- O.M.S (2017). Maladies cardiovasculaires. <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>)
- Olorunnisola O.S., Bradley G. et Afolayan A.J. (2012). Protective effect of *Tulbaghia violacea* Harv. on aortic pathology, tissue antioxidant enzymes and liver damage in diet-induced atherosclerotic rats. *International Journal of Molecular Sciences*; 13(10):12747-12760.
- Otunola G.A., Oloyede O.B., Oladiji A.T. et Afolayan A.J. (2014). Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. *Biological Research*; 47(1):5-10.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*; 44:307-315.
- Pasupuleti V.K. et Braun S. (2008). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In: Pasupuleti VK & Demain AL (eds.). *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. Springer, Dordrecht, pp. 11-32.
- Paul J.L. et Baudin B. (2009). Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces. *Revue Francophone des Laboratoires*; 409:41-50.
- Pavlovskaya E.F.A. et Nesterova I.M. (2013). Fenugreek in the ecological areas of belarus and france. *International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering*; 7(8):415-419.
- Pownall T.L., Udenigwe C.C. et Aluko R.E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 58:4712-4718.
- Prieto M.A., Rodríguez-Amado I., Vázquez J.A. et Murado M.A. (2012). β -Carotene assay revisited: Application to characterize and quantify antioxidant and pro-oxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 60: 8983-8993.

- Ramadan G., El-Beih N.M. et Abd El-Kareem H.F. (2011). Anti-metabolic syndrome and immunostimulant activities of Egyptian fenugreek seeds in diabetic/obese and immunosuppressive rat models. *British Journal of Nutrition*; 105(7):995-1004.
- Reddy R.R.L. et Srinivasan K. (2011). Dietary fenugreek and onion attenuate cholesterol gallstone formation in lithogenic diet-fed mice. *International Journal of Experimental Pathology*; 92:308-319.
- Rice-Evans C.A., Diplock A.T. et Symons M.C.R. (1991). Techniques in free radical research. In: Brton RH & Knippenberg PH (eds.). *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 147-149.
- Roy F., Boye J.I. et Simpson B.K. (2010). Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Research International*; 43:432-442.
- Ruiz-Ruiz J.C., Betancur-Ancona D.A. et Segura-Campos M.R. (2014). Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutrición Hospitalaria*; 29(4):776-784.
- Samaranayaka G.P. et Li-Chan C.Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*; 3:229-254.
- Sánchez A. et Vázquez A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*; 1(1):29-46.
- Sarmadi B.H. et Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*; 31:1949-1956.
- Sato K., Iwai K. et Aito-Inoue M. (2008). Identification of food-derived bioactive peptides in blood and other biological samples. *Journal of AOAC International*; 91:995-1001.
- Sbroggio M.F., Montilha M.S., De Figueiredo V.R.G., Georgetti S.R. et Kurozawa L.E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*; 36(2):375-381.
- Sedlak J. et Lindsay R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*; 25(Suppl. C):192-205.
- Setti K., Kachouri F. et Hamdi M. (2017). Improvement of the antioxidant activity of fenugreek protein isolates by *Lactococcus lactis* Fermentation. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*; 24(4):499-509.
- Shahidi F. et Zhong Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. . In: Shahidi F (ed.). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc, Newfoundland, pp. 357-385.
- Sharma R.D. et Raghuram T.C. (1990). Hypoglycaemic effect of fenugreek seeds in non-insulin dependent diabetic subjects. *Nutrition Research*; 10(7):731-739.
- Shen J., Zhang J., Wen J., Ming Q., Zhang J. et Xu Y. (2015). Correlation of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase with coronary heart disease. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*; 8(3):4399-4404.

- Soufleros E. et Bertrand A. (1998). Evaluation d'une méthode CLHP adaptée au dosage des acides aminés du vin. *Vitis-Journal of Grapevine Research*; 37(1):43-53.
- Spielmann J., Stangl G.I. et Eder K. (2008). Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*; 92:683-693.
- Stanisavljević N.S., Vukotić G.N., Pastor F.T., Sužnjević D., Jovanović Ž.S., Strahinić I.D., Fira Đ.A. et Radović S.S. (2015). Antioxidant activity of pea protein hydrolysates produced by batch fermentation with lactic acid bacteria. *Archives of Biological Sciences*; 67(3):1033-1042.
- Stapleton P.A., Goodwill A.G., James M.E., Brock R.W. et Frisbee J.C. (2010). Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction- interventional strategies. *Journal of Inflammation*; 7:54-63.
- Subhashini N., Thangathirupathi A. et Lavanya N. (2011). Antioxidant activity of *Trigonella foenum graecum* using various in vitro and ex vivo models. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (International)*; 3(2):96-102.
- Surówka K., Żmudziński D. et Surówka J. (2004). Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends in Food Science and Technology*; 15:153-160.
- Taha F.S., Yamamah G.A., Mohamed G.F., Mohamed S.S. et Wagdy S.M. (2014). Biological activities of sunflower protein hydrolysate. *World Applied Sciences Journal*; 30(11):1462-1470.
- Tandon V.R., Verma S., Singh J.B. et Mahajan A. (2005). Antioxidants and cardiovascular health. *Drug Review*; 7(2):61-64.
- Thorat I.D., Jagtap D.D., Mohapatra D., Joshi D.C., Sutar R.F. et Kapdi S.S. (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*; 2:81-104.
- Torres-Fuentes C., María D., C., Isidra R., Manuel A. et Javier V. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*; 180:194-202.
- Tóth P.P., Potter D. et Ming E.E. (2012). Prevalence of lipid abnormalities in the United States: The National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2006. *Journal of Clinical Lipidology*; 6(4):325-330.
- Trigatti B.L., Rigotti A. et Braun A. (2000). Cellular and physiological roles of SR-BI, a lipoprotein receptor which mediates selective lipid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1529:276-286.
- Ucar F., Sezer S., Erdogan S., Akyol S., Armutcu F. et Akyol O. (2013). The relationship between oxidative stress and nonalcoholic fatty liver disease: Its effects on the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Redox Report*; 18(4):127-133.
- Udenigwe C.C. et Rouvinen-Watt K. (2015). The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. *International Journal of Molecular Science*; 16:9303-9313.

- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. et Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 39:44-84.
- Vijayakumar M.V., Pandey V., Mishra G.C. et Bhat M.K. (2010). Hypolipidemic effect of fenugreek seeds is mediated through inhibition of fat accumulation and upregulation of LDL receptor. *Obesity*; 18:667-674.
- Wang B., Xie N. et Li B. (2019). Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: A review. *Journal of Food Biochemistry*; 43(1):e12571.
- Wang F., Kohan A.B., Lo C.M., Liu M., Howles P. et Tso P. (2015). Apolipoprotein A-IV: a protein intimately involved in metabolism. *The Journal of Lipid Research*; 56(8):1403-1418.
- Wang Y.M., Zhang B., Xue Y., Li Z.J., Wang J.F., Xue C.H. et Yanagita T. (2010a). The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids in Health and Disease*; 9(1):4-9.
- Wang Z., Yang Y., Xiang X., Zhu Y., Men J. et He M. (2010b). Estimation of the normal range of blood glucose in rats. *Journal of hygiene research*; 39(2):133-137.
- Wani S.A. et Kumar P. (2016). Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2016.01.007>.
- Wilson T.A., Nicolosi R.J., Kotyla T. et Fleckinger B. (2007). Soy protein without isoflavones reduces aortic total and cholesterol ester concentrations. *Nutrition Research*; 27:498-504.
- Xiao C.W. (2008). Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *The Journal of Nutrition*; S:1244-1249.
- Xue Z., Gao J., Zhang Z., Yu W., Wang H. et Kou X. (2012). Antihyperlipidemic and antitumor effects of chickpea albumin hydrolysate. *Plant Foods for Human Nutrition*; 67:393-400.
- Xue Z., Wen H., Zhai L., Yu Y., Li Y., Yu W., Cheng A., Wang C. et Kou X. (2015). Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*; 77(2):75-81.
- Yahia S., Benomar S., Dehiba F., Allaoui A., Guillen N., Rodriguez-Yoldi M.J., Osada J. et Boualga A. (2017). Hypocholesterolemic and antioxidant efficiency of chickpea (*Cicer arietinum*) protein hydrolysates depend on its degree of hydrolysis in cholesterol-fed rat. *Nutrition and Food Science*; 47(2):254-269.
- Yang H.-Y., Yang S.-C., Chen S.-T. et Chen J.-R. (2008a). Soy protein hydrolysate ameliorates cardiovascular remodeling in rats with l-NAME-induced hypertension. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; 19(12):833-839.
- Yang R.L., Shi Y.H., Hao G., Li W. et Le G.W. (2008b). Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: Relation between malondialdehyde and atherogenic index. *Journal of Clinical and Biochemical Nutrition*; 43(3):154-158.

- Yang S.C., Liu S.M., Yang H.Y., Lin Y.H. et Chen J.R. (2007). Soybean protein hydrolysate improves plasma and liver lipid profiles in rats fed high-cholesterol diet. *The Journal of the American College of Nutrition*; 26(5):416-423.
- Yasser C.C., David B.A., Cristian J.M., Luis C.G. et Gloria D.O. (2016). Cholesterol metabolism and its regulation by functional foods. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*; 1(4):697-707.
- Yust M.D.M., Millán-Linares M.D.C., Alcaide-Hidalgo J.M., Millán F. et Pedroche J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 92(9):1994-2001.
- Yust M.D.M., Pedroche J., Girón-Calle J., Vioque J., Millán F. et Alaiz M. (2004). Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*; 85:317-320.
- Zhang H., Wang J., Liu Y., Gong L. et Sun B. (2016). Rice bran proteins and their hydrolysates modulate cholesterol metabolism in mice on hypercholesterolemic diets. *Food and Function*; 7(6):2747-2753.
- Zhang Q., Tong X., Qi B., Wang Z., Li Y., Sui X. et Jiang L. (2018). Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *Journal of Functional Foods*; 42:298-305.
- Zhao Q., Xiong H., Selomulya C., Chen X.D., Zhong H., Wang S., Sund W. et Zhou Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*; 134:1360-1367.
- Zhong F., Liua J., Maa J. et Shoemaker C.F. (2007a). Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Research International*; 40:661-667.
- Zhong F., Zhang X., Ma J. et Shoemaker C.F. (2007b). Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Research International*; 40:756-762.
- Zhu K.-X., Guo X., Guo X.-N., Peng W. et Zhou H.-M. (2013). Protective effects of wheat germ protein isolate hydrolysates (WGPIH) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells. *Food Research International*; 53:297-303.
- Zou T.-B., He T.-P., Li H.-B., Tang H.-W. et Xia E.-Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*; 21(1):72-85.

Annexe

Tableau XVI. Facteur de dissociation (α) des groupements α -NH₂ en fonction de la température et du pH selon la fiche technique des enzymes Novozyme®.

pH	Température (°C)				
	25	30	40	50	60
6.5	-	-	-	0,20	0,29
7.0	-	0,20	0,33	0,44	0,56
7.5	0,39	0,44	0,61	0,71	0,80
8.0	0,67	0,71	0,83	0,88	0,93
8.5	0,86	0,88	0,94	0,96	0,97
9.0	0,95	0,96	0,98	0,99	0,99
9.5	0,98	0,99	0,99	1,00	1,00
10.0	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00
10.5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
11.0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Tableau XVII. Evolution du degré d'hydrolyse de protéines de fenugrec par Espérase et Purafect.

Temps (min.)	0	5	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240	270	300
PFHE	0	4,8	8	10,1	11,6	12,6	14,4	15,7	16,8	17,6	18,5	19	19,1	19,1
PFHP	0	1,6	2,5	3,2	3,7	4,1	4,9	5,7	6,7	7,5	8,3	8,9	9,1	9,1

Tableau XVIII. Répartition du poids moléculaire des peptides issus de l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec Espérase (PFHE) et Purafect (PFHP).

%	>30	10-30	5-10	<5
PFHE	42,4±0,7	21,0±4,7	22,3±2,3	14,4±3,2
PFHP	68,3±0,2	10,0±5,4	17,4±3,7	4,3±0,8

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm ET de 3 échantillons.

Tableau XIX. Pouvoir inhibiteur du radical DPPH par les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

[pt] mg.ml ⁻¹	PFHE	PFHP	IPF	BHT
0,1	33,1±3,0	29,5±1,8	14,2±3,2	86
0,5	42,3±3,5	38,3±4,6	20,1±6,9	92
0,75	51,8±5,1	40,0±4,8	26,0±6,2	92
1,0	60,7±6,0	40,4±2,3	29,3±2,0	92
2,0	75,4±4,3	44,3±3,9	41,0±2,7	92
3,0	88,5±3,7	48,9±3,4	53,4±2,4	92
4,0	100,1±3,2	56,1±2,5	53,4±0,1	92
5,0	100,0±0,0	56,0±0,1	53,4±0,2	92

Tableau XX. Pouvoir réducteur (unité arbitraire) de l'ion ferrique par les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

[pt] mg.ml ⁻¹	PFHE	PFHP	IPF
0,1	0,15±0,00	0,08±0,02	0,06±0,01
0,25	0,19±0,00	0,09±0,01	0,08±0,01
0,5	0,23±0,04	0,20±0,02	0,12±0,03
0,75	0,27±0,06	0,29±0,00	0,24±0,04

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ±ET de 3 échantillons.

Tableau XXI. Pouvoir inhibiteur du radical DPPH et pouvoir réducteur des différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec.

% d'inhibition	Hydrolysats	>30	10-30	5-10	<5
<u>Pouvoir inhibiteur du DPPH (%)</u>					
PFHE	61,8±6,5	59,5±3,8	6,4±0,0	52,3±0,0	60,3±2,0
PFHP	40,3±5,1	54,1±2,5	22,6±10,7	31,9±3,8	62,2±2,0
BHT	64,9				
<u>Pouvoir réducteur (FRAP) (unité arbitraire)</u>					
PFHE	1,05±0,07	1,25±0,20	0,95±0,01	0,65±0,05	0,630±0,04
PFHP	0,95±0,07	1,28±0,09	1,02±0,03	0,63±0,10	1,374±0,09
VIT C	2,59				

Les hydrolysats et leurs fractions sont utilisés à une concentration de 1 mg.ml⁻¹.

Tableau XXII. Pouvoir inhibiteur (%) de la décoloration du β-carotène par les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

[pt] mg.ml ⁻¹	PFHE	PFHP	IPF	BHA
0,1	40,7±1,9	51,7±0,3	39,0±3,0	-
0,25	67,1±2,6	63,2±0,7	48,2±3,6	-
0,5	72,7±1,5	68,3±4,7	54,0±1,8	86
0,75	79,5±1,1	75,0±4,1	65,2±2,7	-
1	85,7±2,8	81,9±2,6	71,8±0,2	92
2	90,7±4,5	85,9±5,5	71,8±2,3	92
3	90,3±3,2	85,9±4,5	71,8±3,8	92

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ±ET de 3 échantillons.



Tableau XXIII. Composition détaillée du régime donné aux rats expérimentaux.

<i>Nutriments</i>	<i>Composition</i>	<i>Quantité</i>
	<u><i>Acides aminés essentiels</i></u>	<u><i>(g/kg d'aliment)</i></u>
<i>Caséine</i> <i>Sigma-life science,</i> <i>Etats-Unis</i>	<i>Arginine</i>	7,4
	<i>Histidine</i>	6,4
	<i>Isoleucine</i>	1,8
	<i>Leucine</i>	19,0
	<i>Lysine</i>	18,8
	<i>Méthionine + cystéine</i>	7,0
	<i>Phénylalanine + tyrosine</i>	22,2
	<i>Thréonine</i>	8,4
	<i>Tryptophane</i>	2,8
	<i>Valine</i>	12,6
	<u><i>Acides gras</i></u>	<u><i>(g/kg d'aliment)</i></u>
<i>Huile de tournesol</i> <i>Cévital, SPA, Algérie</i>	<i>Saturés (13%)</i>	6,5
	<i>Monoinsaturés (22%)</i>	11
	<i>Polyinsaturés (65%) dont 65 % $\omega 6$</i>	32,5
		<u><i>(mg/kg d'aliment)</i></u>
<i>Mélange minéral</i> <i>UAR 205 B, France</i>	<i>CaHPO₄</i>	17200
	<i>KCl</i>	4000
	<i>NaCl</i>	400
	<i>MgO₂</i>	420
	<i>MgSO₄</i>	2000
	<i>Fe₂O₃</i>	120
	<i>FeSO₄, 7H₂O</i>	200
	<i>MnSO₄, H₂O</i>	98
	<i>CuSO₄, 5H₂O</i>	20
	<i>ZnSO₄</i>	80
	<i>CuSO₄</i>	80
	<i>CoSO₄, 7H₂O</i>	0,16
	<i>KI</i>	0,32
		<u><i>(mg/kg d'aliment)</i></u>
<i>Mélange vitaminique</i> <i>UAR 200, France</i>	<i>Vit A</i>	12
	<i>Vit D₃</i>	0,125
	<i>Vit B₁</i>	40
	<i>Vit B₂</i>	30
	<i>Vit B₅</i>	140
	<i>Vit B₆</i>	20
	<i>Vit B₇</i>	300
	<i>Vit B₁₂</i>	0,1
	<i>Vit C</i>	1600
	<i>Vit E</i>	340
	<i>Vit K</i>	3,80
	<i>Vit PP</i>	200
	<i>choline</i>	2720
	<i>Acide folique (B9)</i>	10
	<i>Acide para-aminobenzoïque</i>	180
	<i>Biotine (B8)</i>	0,6

Tableau XXIV. Avantages et désavantages de l'utilisation du rat comme modèle animal pour l'étude de l'hypercholestérolémie (Leong *et al.*, 2015).

Avantages	Désavantages
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Faible coût ▪ Forte disponibilité ▪ Facile à manipuler ▪ Elevage facile ▪ Génome largement séquencé ce qui permet une étude d'expression des gènes plus facile 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Résistant à l'athérosclérose ▪ Absence de l'enzyme CETP ▪ La majeure partie du cholestérol est transportée par les HDL ▪ Echantillonnage de sang et de certains organes très limitée

Tableau XXV. Evolution du poids des rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

Jours	0	6	12	18	24	28
T	185±04	200±21	217±26	228±20	240±28	236±18
HC	184±09	207±14	221±18	232±22	239±28	240±26
PFHE	189±11	215±13	228±15	242±21	252±23	251±30
PFHP	183±04	221±11	235±19	247±21	259±26	249±21
IPF	184±02	204±06	219±09	227±11	238±12	233±13

Tableau XXVI. Teneurs sériques en différents lipides chez les rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

(mM)	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
Cholestérol total	1,43±0,04	6,29±1,14	2,95±0,46	7,80±1,79	4,12±0,76
Cholestérol libre	0,72±0,01	1,62±0,53	1,06±0,04	1,58±0,43	1,23±0,30
Esters de cholestérol	0,71±0,05	4,67±1,00	1,88±0,45	6,21±1,54	2,89±1,04
Triglycérides	0,66±0,30	1,09±0,09	0,87±0,16	1,14±0,19	1,03±0,06
Phospholipides	1,98±0,42	2,27±0,46	1,61±0,10	2,60±0,54	1,86±0,32

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ±ET de 6 rats par groupe.

Tableau XXVII. Teneurs en apolipoprotéines B, AI et AIV chez les rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

Unité arbitraire	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
Apo B	0,24±0,04	0,24±0,04	0,21±0,01	0,24±0,04	0,22±0,03
Apo AIV	0,75±0,04	0,69±0,11	0,56±0,06	0,79±0,06	0,75±0,10
Apo AI	0,64±0,01	0,59±0,06	0,53±0,05	0,57±0,06	0,61±0,05

Tableau XXVIII. Teneurs en TBARS au niveau hépatique, cardiaque et de l'aorte chez des rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

nmol.g ⁻¹ tissu	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
TBARS foie	7,0±0,6	8,6±2,0	7,3±1,3	9,5±0,8	4,7±1,4
TBARS cœur	22,8±2,5	23,7±2,1	24,1±1,8	21,7±2,2	20,1±2,1
TBARS aorte	10,5±1,1	18,4±4,7	12,4±0,9	20,6±4,7	15,7±3,9

Tableau XXIX. Propriété antioxydante des HDL isolées de rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

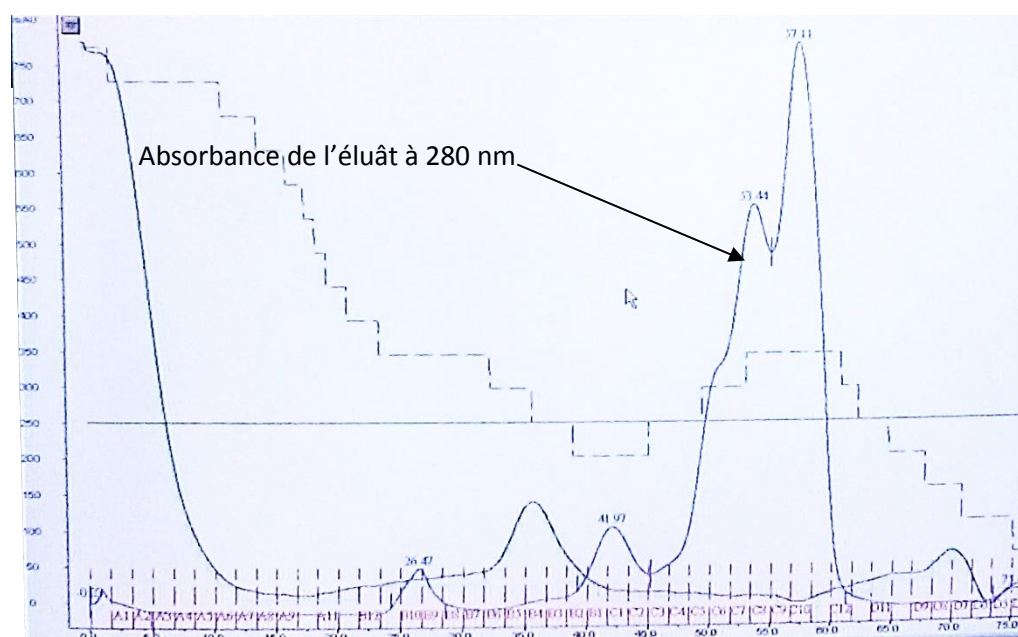
Unité arbitraire	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
VLDL	92,6±0	166,0±15,3	89,5±12,5	257,8±25,4	170,8±34,7
VLDL +HDL	76,4±0	144,9±6,4	95,8±12,2	106,3±19,2	97,5±23,9

Tableau XXX. Activité arylestérase (paraoxonase) sérique chez les rats traités ou non avec les protéines de fenugrec et leurs hydrolysats.

U.ml ⁻¹	T	HC	IPF	PFHP	PFHE
PON1	109±8	94±8	94±10	116±6	112±8

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ±ET de 6 rats par groupe.

A.



B.

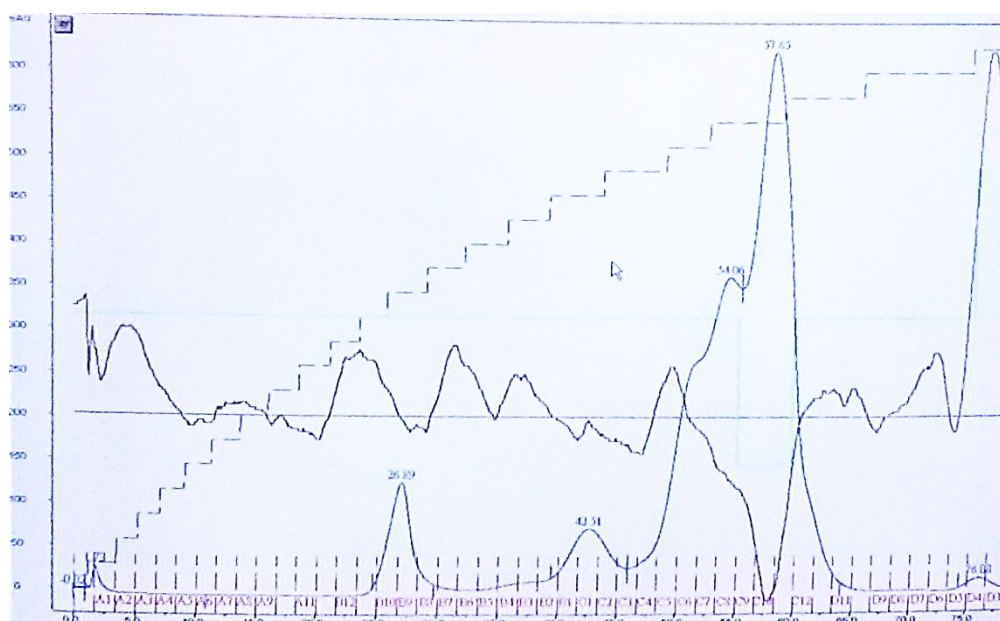


Figure 29. Chromatogramme des protéines dans l'éluât après fractionnement, par FPLC, des lipoprotéines de deux pools de sérum de rats témoins (A) et rats IPF (B).

L'éluât est mesuré à 280 nm. Le premier pic correspond aux VLDL, le deuxième pic aux LDL et le troisième et quatrième pics aux HDL.

Fenugreek proteins and their hydrolysates prevent hypercholesterolemia and enhance the HDL antioxidant properties in rats

Amine Allaoui, Cristina Barranquero, Sanaa Yahia,
Luis Vicente Herrera-Marcos, Souhila Benomar, Mourad Jridi,
María Ángeles Navarro, María Jesús Rodríguez-Yoldi, Moncef Nasri,
Jesús Osada and Ahmed Boualga
(*Author affiliations can be found at the end of the article*)

Abstract

Purpose – This paper aims to investigate the *in vivo* hypocholesterolemic property of fenugreek proteins (FP), Purafect-fenugreek protein hydrolysate (PFPH) and Esperase-fenugreek protein hydrolysate (EFPH) on high cholesterol (HC)-fed rats.

Design/methodology/approach – Rats were randomized into five groups: four were fed for four weeks a hypercholesterolemic diet and the tested products were given by gavage. The fifth group was taken as control (C) receiving the same diet without cholesterol.

Findings – Results showed that the elevated aspartate aminotransferase activity in HC group plasma was significantly corrected by FP and EFPH administration (-33 per cent; $p = 0.0003$). HC liver lipids and total cholesterol (TC) contents were not markedly affected by FP and EFPH. However, liver triglycerides (TG) contents trended to decrease in FP rats vs HC ($p = 0.07$), while, the TG decrease was significant in groups fed the proteins hydrolysates ($p = 0.02$). On the other hand, serum TC and TG decreased by 53 per cent ($p = 0.0003$) and 20 per cent ($p = 0.04$), respectively, in FP treated rats compared to HC group. This decrease was associated with a high fecal cholesterol excretion (2.5-fold higher in FP vs HC; $p = 0.0001$). Likewise, EFPH-treated rats exhibited lower TC compared to HC rats ($p = 0.004$). The very low density lipoproteins was the main affected fraction in these two groups, while there were no significant difference in apolipoproteins (Apo) B, A-I and A-IV contents between the different groups, except in FP group, where Apo A-I and A-IV decreased by 26 and 17 per cent, respectively, compared to C rats ($p = 0.02$). The high density lipoproteins (HDL) of rats treated with proteins hydrolysates showed a better antioxidant property compared to those of HC rats, which was accompanied with an increase in paraoxonase activity when compared to HC group.

Originality/value – Unlike PFPH which had almost no effect, FPs and EFPH could constitute a nutraceutical ingredient in cardiovascular disease management.

Keywords Fenugreek, Hypercholesterolemia, HDL antioxidants properties, Lipoproteins, Protein hydrolysates

Paper type Research paper



The authors thank the Regional Laboratory Quality Control and the Repression of Fraud of Oran, Algeria for their help with chemical and amino acid composition analysis of fenugreek.

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Innovation (Grant SAF 2016-75441-R); and the Algerian Ministry of Higher Education, Scientific Research and the Tunisian Ministry of Higher Education and Scientific Research (Joint Research Project Algeria/Tunisia).

1. Introduction

Hypercholesterolemia and oxidative stress is one of the leading causes of atherosclerosis and cardiovascular diseases (CVD). These two factors are often observed in the modern life style. As consequence of the world life transition, CVD, and especially dyslipidemia, had immensely increased either in occidental societies or in emerging countries, reaching a prevalence of 53 per cent in the USA, 50.5 per cent in Spain and 48 per cent in France (with 30 per cent for hypercholesterolemia) (Ferrières *et al.*, 2009; Guallar-Castillón *et al.*, 2012;

Tóth *et al.*, 2012). In Algeria, the prevalence of dyslipidemia is less than 15 per cent as reported in "Epidemiological Transition and Health Impact in North Africa (TAHINA) Survey 2002" (Institut National de Santé Publique, 2007).

It is generally established that the nutritive and non-nutritive constituents of food can be used to prevent the risk of developing or complicating human disease conditions (Bouchenak and Lamri-Senhadji, 2013). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) is a leguminous used as food and spice for seasoning (Srinivasan, 2013). It is equally used in Indian and Chinese traditional medicine for the treatment of many diseases (Bukhari *et al.*, 2008), as well as in the Mediterranean countries, Western countries, Asia and Africa. The seeds are the most important and useful part of this plant (Meghwal and Goswami, 2012). Many of the functional and medicinal properties of fenugreek are attributed to its chemical composition (20-25 per cent protein, 45-50 per cent dietary fiber, 20-25 per cent mucilaginous soluble fiber, 6-8 per cent fatty acids and essential oils and 2-5 per cent steroidal saponins) (Khorsidian *et al.*, 2016). Most of these constituents have been investigated in recent studies (Mowla *et al.*, 2009; Madhava Naidu *et al.*, 2011; Reddy and Srinivasan, 2011; Elmnar *et al.*, 2012; Belguith-Hadriche *et al.*, 2013; Habib-Martin *et al.*, 2017). To the best of our knowledge, although these studies clearly demonstrated the beneficial role of non-protein components such as saponine, fiber, flavonoid and trigoneline on lipid metabolism and redox status (El Khoury and Anderson, 2013), no comparative study has been conducted on the role of fenugreek proteins (FP) or their hydrolysates on hypercholesterolemia. Indeed, fenugreek is a rich protein legume and because of its high protein content and its favorable amino acid composition, the seeds could be a potential source of bioactive peptides (Christiane *et al.*, 2009).

Indeed, in addition to their nutritional function, proteins can also be considered as bioactive molecules providing other functional and nutraceutical properties (Garcia *et al.*, 2013; López-Barrios *et al.*, 2014). In this regard, administration of proteins from different sources have shown promising results in improving the quality of life, particularly in CVD and dyslipidemia prevention (Möller *et al.*, 2008; Ruiz *et al.*, 2014; Udenigwe and Rouvinen-Watt, 2015). In fact, the action of proteins is because of their nature and their amino acid composition. In addition, more recent studies have shown that the proteins may also contain biologically active peptide sequences which, after their release during gastrointestinal digestion, are responsible in part of their properties. Moreover, it is believed that some of these peptides exhibit the same properties of the protein that contained them but with greater potential or even exhibit new properties. According to researchers, the release of these bioactive peptides from their proteins is also possible by controlled hydrolysis *in vitro* (Sarmadi and Ismail, 2010; Lemes *et al.*, 2016; Cicero *et al.*, 2017; Nasri, 2017).

The main biological cardioprotective activities attributed to bioactive peptides to date are antioxidant, hypolipidemic, antithrombotic and antihypertensive (Sarmadi and Ismail, 2010; Cicero *et al.*, 2017). The exact mechanism by which proteins decreased cholesterolemia is not fully understood. In this sense, it has been reported that protein hydrolysates and peptides exhibited hypocholesterolemic activity via bile acid binding and disruption of cholesterol micelles in the gastrointestinal tract, and/or by altering hepatic and adipocytic enzymes

activities and gene expression of lipogenic proteins, which can modulate aberrant physiological lipid profiles (Udenigwe and Howard, 2013).

In the present study, the hypocholesterolemic and antioxidant properties of FG proteins and their hydrolysates obtained by using two commercial enzymes (Purafect or Esperase) were investigated in rats that were fed hypercholesterolemic diet. Fenugreek was chosen for its high proteins content and its favorable amino acid composition.

2. Material and methods

2.1 Preparation of fenugreek proteins

Fenugreek was purchased from a local spices market in the city of Tiaret (Algeria). Seeds were then cleaned, grounded to a fine powder and defatted in Soxhlet (Labotech LT-6, Rosdorf, Germany) by using *n*-hexane for 12 cycles (10 h) and the FP were purified according to Boye *et al.* (2010) method. The defatted powder was solubilized with distilled water in a ratio of 1:20 (w/v) and the pH was adjusted to 10 with 1N NaOH solution. After 30 min, the preparation was centrifuged (Refrigerated Centrifuge Sigma DE) at 2,000 *g* for 30 min at 4°C and the resulting supernatant was brought to isoelectric point (pH 4.5) with 2N HCl. Proteins were removed after centrifugation (3,000 *g* for 30 min) and rinsed twice with distilled water. The purified proteins isolate was freeze dried and stored at 4°C. The nitrogen content in FP isolate was determined according to the AOAC method number 984.13 (Horwitz, 2000), and crude protein, estimated by multiplying total nitrogen content by the factor of 6.25. FP isolate contained 80.3 per cent of total proteins.

2.2 Preparation of fenugreek protein hydrolysates

FPs were hydrolyzed by using Esperase® (pH 9.0; 50°C) or Purafect® 2000E (pH 10.0; 50°C) both from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). FPs isolate was dissolved in distilled water at a proportion of 5 per cent (w/v). The pH and temperature were then adjusted to optimum enzyme activity prior to their addition. The enzyme/protein ratio was fixed at 5 (U/mg of protein). Once the enzyme was added, the pH of the solution was maintained constant by a continuous addition of 2N NaOH solution. The degree of hydrolysis of FP was monitored using a pH-stat method (Adler-Nissen, 1986).

$$DH (\%) = \frac{V_B \times N_B}{mp} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

where B is the amount (mL) of NaOH consumed to keep the pH constant during the reaction, N_B is the normality of NaOH, MP is the mass of proteins (g) and α is the average degree of dissociation of the α -NH₂ groups released during hydrolysis. The total number of peptide bonds (h_{tot}) was assumed to be 7.6 meq/g.

When the degree of hydrolysis reached its maximum value, the reaction was stopped by heating the solution at 90°C for 10 min, and the digest was cooled at room temperature and then centrifuged at 5,000 *g* for 15 min. The supernatant fraction containing FP hydrolysates was collected, freeze dried (104 h for a volume of 500 mL) then stored at 4°C until use. The respective final degrees of hydrolysis of the obtained hydrolysates were 19 and 9 per cent for Esperase-fenugreek proteins hydrolysate (EFPH) and Purafect-fenugreek proteins hydrolysate (PFPH). Protein contents of PFPH and EFPH were estimated at 90 and 92.5 per cent, respectively, and their amino acids composition was determined (Table I) according to Soufleros and Bertrand (1998).

NFS
48,6

976

Table I.
Amino acids
composition of FPs
and their
hydrolysates

(%)	FP	EFPH	PFPH
Cys	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.1
Met	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Asp/Asn	11.4 ± 0.1	12.6 ± 0.3	11.2 ± 0.0
Thr	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.7 ± 0.0
Ser	5.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Glu/Gln	12.7 ± 0.3	14.3 ± 0.2	14.0 ± 0.0
Pro	3.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.5 ± 0.0
Gly	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.1	3.8 ± 0.1
Ala	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.8 ± 0.1
Val	6.1 ± 0.1	5.0 ± 0.1	5.2 ± 0.1
Ile	6.5 ± 0.2	6.0 ± 0.0	5.7 ± 0.2
Leu	9.6 ± 0.1	10.0 ± 0.2	11.1 ± 0.1
Tyr	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.0
Phe	3.5 ± 0.1	3.2 ± 0.0	3.4 ± 0.0
Lys	5.6 ± 0.3	5.8 ± 0.0	5.7 ± 0.2
His	3.1 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Trp	11.6 ± 0.2	11.1 ± 0.1	10.3 ± 0.0
Arg	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2	3.9 ± 0.1

Notes: Amino acid composition was determined by HPLC (Soufleros and Bertrand, 1998). All measurements were performed in triplicate at the Regional Laboratory Quality Control and the Repression of fraud of Oran. Data are presented as mean±SD

2.3 Animal treatment

In total, 30 male Wistar rats, weighing about 184±7 g, purchased from Algiers Pasteur Institute (Algeria), were housed in cages in a room maintained at 22°C and 60 per cent relative humidity with a 12-h cycle of light and dark. Rats were given free access to tap water and food throughout the experiment. Animals were kept according to the general guidelines on the use of living animals in scientific investigation (Council of European Communities, 1986), and the institutional committee on animal care and use approved the protocol and use of rats (approval number DZ-TN371/13).

2.4 Experimental design

In all, 24 rats were fed during four weeks a hypercholesterolemic (HC) diet (Table II) containing 20 per cent casein supplemented with 1 per cent cholesterol and 0.5 per cent cholic acid and randomized into four groups of six rats each as follow:

- HC group receiving daily 1 g/kg body weight (BW) of casein.
- FP group daily receiving 1 g/kg BW of FPs.
- PFPH group daily receiving 1 g/kg BW of PFPH.
- EFPH group daily receiving 1 g/kg BW of EFPH.

A fifth group (control: C) was fed the same experimental diet without cholesterol/cholic acid and treated under the same conditions with 1 g of casein/kg BW given by gavage.

Animals were weighed twice a week, and food consumption was recorded daily. In the last week of the experiment, rats of each group were kept for three days in metabolic cages and feces were daily collected, then dried, weighed and stored at -40°C until analysis. At the end of the experiment, the overnight fasting rats were anesthetized with sodium

Table II.
Composition of
cholesterol-enriched
diet (g/kg diet)^a

Ingredients	C	HC
Casein ^b	200	200
Corn starch ^c	597	582
Sucrose ^d	40	40
Sunflower oil ^e	50	50
Cellulose powder ^f	50	50
Mineral mix ^g	20	20
Vitamin mix ^h	40	40
Cholesterol ⁱ	0	10
Cholic acid ^b	0	5
Methionine ⁱ	3	3

Notes: ^aThe diet contained 16 MJ/kg and was given in powdered form. ^bSigma-Aldrich Chemie, Germany. ^cMaghnia Starch, Tlemcen, Algeria. ^dCommercial sugar, Cevital, Bejaia, Algeria. ^eCommercial oil (80% soy oil and 20% sunflower oil), Cevital, Bejaia, Algeria. ^fAgar, Liofilchem, Italie. ^gMx SAFE 205B, Augy, France. ^hVit SAFE 200, Augy, France. ⁱBiochem Chemopharma, Canada

pentobarbital (60 mg/kg). Blood samples were collected from the abdominal aorta and serum was obtained by low speed centrifugation (2000 g, 30 min at 4°C). Liver was excised, washed in ice-cold saline (150 mM NaCl) and stored at -40°C until analysis.

2.5 Biochemical analysis

Glycaemia was measured by using glucose oxydase kit and uric acid by uricase-peroxidase kit (Spinreact, Girona, Spain). Serum protein and albumin concentrations were measured by the methods of Biuret (Chronolab Kit, Barcelona, Spain) and Bromocresol Green (Biolabo kit, Maizy, France), respectively. Alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) activities were assayed using commercial kits (Spinreact, Girona, Spain).

Serum thiols were determined by a colorimetric assay as described by [Sedlak and Lindsay \(1968\)](#) using Ellman reagent. The results were calculated using the molar absorption coefficient of TNB $\varepsilon = 14.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ([Eyer et al., 2003](#)).

2.6 Hepatic and fecal lipid extraction

One gram of liver or feces was extracted with chloroform:methanol (2:1, v/v) according to the method of [Folch et al. \(1957\)](#). After solvent evaporation, lipids extract was dissolved in isopropyl alcohol and immediately analyzed.

2.7 Lipids analysis

Serum and liver triacylglycerol (TG) and total cholesterol (TC), unesterified cholesterol (UC) and phospholipids (PL) concentrations were measured by using commercial kits (Spinreact, Girona, Spain), (Biolabo, Maizy, France) and (Cypress, Langdorp, Belgium), respectively. Esterified cholesterol (EC) levels were deduced from the difference between TC and UC.

2.8 Lipoproteins fractionation and lipid and apolipoproteins analysis

Fast protein liquid chromatography in Äkta-FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain) was used for analysis of the lipoproteins profile using 50 mM phosphate buffer sodium (PBS) as running buffer following the method described by [Hubáček et al. \(2008\)](#). A volume of 150 mL of each serum pool was loaded on a Superose™ 6 10/300 GL column (GE healthcare life sciences, Barcelona, Spain) and 0.5 mL of each fraction was

collected. The elution was monitored at 280 nm for proteins content and collected in fractions.

The TC in each fraction was measured by a fluorometric method using Amplex Red (Molecular Probes, OR, USA). The phosphatidylcholine (PC) was determined by using the enzymatic procedure (Hojjati and Jiang, 2006) coupled to fluorometric detection (He *et al.*, 2002). Serum apolipoproteins (apo B, A-I and A-IV) were quantified by ELISA using specific polyclonal antibodies (Navarro *et al.*, 2005).

2.9 Lipoproteins oxidation susceptibility and high density lipoproteins antioxidant potential

The susceptibility of very low density lipoproteins and low density lipoproteins cholesterol (VLDL-LDL-c) to oxidation and the antioxidant potential of high density lipoproteins (HDL) to prevent low and very low density lipoproteins against oxidation in rats was measured according to the fluorometric method of Navab *et al.* (2001), as modified by Acín *et al.* (2006), using dichlorofluorescein (DCF) (Sigma, MO, USA) as an oxidation marker.

Two volumes of a preparation containing 100 µg/mL of VLDL-LDL-cholesterol and 4 µg/mL of HDL-cholesterol were mixed with 1/2 volume of 0.12 per cent sodium azide and 1/2 volume of DCF (80 µg/mL). After incubation for 3 h at 37°C, the intensity of the fluorescence of the DCF is measured. A control (for VLDL-LDL-c oxidation susceptibility) was prepared for each group by following the same steps with substituting HDL by PBS. The samples were analyzed in duplicate. The antioxidant index (AOI) of HDL is expressed as the percentage of non-HDL oxidation inhibition.

2.10 Paraoxonase activity assay

Paraoxonase activity (PON1) was determined in serum by measuring the conversion rate of phenyl acetate to phenol as described by Eckerson *et al.* (1983). In total, 5 µL of appropriately diluted serum was added to 200 µL of working reagent (20 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, containing 1 mM CaCl₂ and 4 mM phenyl acetate). The increase of the absorbance was recorded at 270 nm (25°C) every 30 s. One unit of arylesterase activity is equal to one µM of phenol formed per minute. The activity was expressed in U/mL based on the extinction coefficient of phenol (1,310 M⁻¹cm⁻¹). Blank sample containing buffer was used to correct for non-enzymatic hydrolysis.

2.11 Statistical analysis

Data are presented as mean ±SD and subjected to one way ANOVA and LSD-Fisher post hoc test. Differences are considered to be significant at *p* # 0.05 and were superscripted by (*) between HC rats and C group and by (#) between treated groups and HC one.

3. Results and discussion

3.1 Food intake, body weight and liver relative weight

The first objective of our study was to determine whether FP and their hydrolysates affect the dietary nutritional properties and hepatic function. Under our experimental conditions, neither food intake nor body weight changes were observed after the administration of FP, PFPH or EFPH, suggesting that FPs and their two hydrolysates, did not affect the nutritional efficiency of the given diet, permitting therefore a normal body weight growth. These results confirmed those previously published by Yahia *et al.* (2017) using chickpea protein hydrolysates. Similarly, Bettzieche *et al.* (2008) did not find any significant difference in body weight, after 20 days, between high cholesterol (HC)-fed rats receiving, daily, 1g of lupin or casein proteins, and those fed a control diet. Likewise, Yang *et al.* (2007) reported

that the treatment with soy proteins and their hydrolysate (1g/day for 12 weeks) did not change body weight and food intake of rats.

However, when analysing liver relative weight, values were significantly increased by 1.3-fold in the four groups fed the hypercholesterolemic diet when compared to C group (Table III). This result could be explained by the high fat storage in liver of treated rats. Indeed, the higher lipid contents found in this organ indicated that FPs and their hydrolysates did not prevent liver lipid storage induced by the hypercholesterolemic diet.

3.2 Serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities

In the present study, the hypercholesterolemic diet induced a slight increase of serum ASAT activity while ALAT activity was unchanged between the five groups. It has been previously reported by [Ktari et al. \(2015\)](#), that the hepatocytes were particularly vulnerable to lipid accumulation, which can cause deterioration of membrane integrity resulting in the release of several components, including transaminases, from their cytosol. The observed result suggested that liver damage was not advanced in HC rats ([Kapravelou et al., 2013](#)) and could explain the unchanged ALAT activity in HC group. However, ASAT activity of the groups treated with FP and EPFH was 1.3-fold lower than value obtained with the HC group ($p = 0.0003$) and became comparable to that of C group (Table III). This indicated that FP and EPFH protected liver against the deleterious effect of HC diet. These results were consistent with those of [Kapravelou et al. \(2013\)](#) who also observed that lupin protein hydrolysate attenuated hepatotoxicity in high cholesterol-diet-fed rats.

3.3 Liver lipid contents

As depicted in Table IV, and compared to C group, all the liver lipids components were significantly higher in all HC-fed groups (HC, FP, PFPH and EPFH). The high contents of lipids, cholesterol and triglycerides in liver observed in HC non-treated animals vs C were probably a consequence of two mechanisms. Effectively, it has been estimated that, in rats, as much as 50 per cent of dietary fat enters the liver as remnant TG ([Babin and Gibbons, 2009](#)). The second mechanism is the stimulation of acyl-CoA cholesterol acyl transferase expression in liver by HC diet as mentioned by [Wang et al. \(2010\)](#). When compared to HC group, TC concentrations were reduced by 24 per cent in PFPH rats' liver ($p = 0.03$). UC levels in FP rats were increased by 27 per cent vs HC group ($p = 0.07$).

Groups	C	HC	FP	PFPH	EPFH
Initial BW (g)	185 ± 04	184 ± 09	184 ± 02	183 ± 04	189 ± 11
Final BW (g)	236 ± 18	240 ± 26	233 ± 13	249 ± 21	251 ± 30
Food intake (g/d)	17 ± 2	19 ± 4	22 ± 5	19 ± 5	20 ± 3
Food efficiency ratio (%)	0.13	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.03
Liver relative weight (%)	2.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2*	3.8 ± 0.2*	3.7 ± 0.3*	3.8 ± 0.2*
ASAT (U/l)	58 ± 9	70 ± 7	47 ± 6 [#]	72 ± 11	47 ± 7 [#]
ALAT (U/l)	20 ± 3	23 ± 5	27 ± 7	26 ± 7	29 ± 8

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group; EPFH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; BW: body weight; ASAT: aspartate aminotransferase; ALAT: alanine aminotransferase; data are presented as mean of 6 rats per groups. Superscripted (#, *) means within a row indicate they are significantly different at $P < 0.05$, as following: *HC, FP, PFPH or EPFH vs C. [#]FP, PFPH or EPFH vs HC

Table III.
Anthropometric
parameters and
serum transaminases
activities of rats
treated or not with
FPs and their
hydrolysates

Liver triacylglycerol contents decreased (1.3-fold lower), but not significantly ($p = 0.07$), in rats fed FP. In PFPH and EFPH groups, these contents were significantly lower (30 per cent, $p = 0.02$), both compared to HC. Furthermore, PL values did not show any significant difference between HC, FP, PFPH and EFPH rat groups. These results were in agreement with the works of [Fassini et al. \(2011\)](#) and [Yang et al. \(2007\)](#) who did not notice significant changes in liver cholesterol contents between HC and soy protein or its hydrolysate treated rats. In contrast, this work results were not wholly in line neither with the studies of [Ferreira et al. \(2015\)](#) and [Kapravelou et al. \(2013\)](#) who noticed a diminution of cholesterol and TG levels after protein or hydrolysate supplementation, nor with those of [Bettzieche et al. \(2008\)](#) who remarked that lupin protein had diminished only TG concentrations in liver vs HC group.

3.4 Glycaemia, serum lipids contents and fecal cholesterol excretion

Although glycaemia of all the experimental groups was normal, results showed a slight increase of blood glucose level in HC group compared with C group ($p = 0.02$). This was corrected after treatment with FP ($p = 0.04$ vs HC), suggesting a possible regulating effect of glycaemia by FP consumption.

The ability of FPs and their hydrolysates to prevent hypercholesterolemia complications in HC-diet-fed rat was further examined. After 28 days, and compared to control diet, HC diet induced a sharp increase of cholesterolemia by 439 per cent mainly in VLDL fraction. The TC increase, similarly observed in early works ([Athmani et al., 2015](#); [Benomar et al., 2015](#); [Yahia et al., 2017](#)), was concomitant with hypertriglyceridemia state (1.6-fold higher) ([Table V](#)). These findings were in contrast with those reported by [León-Espinosa et al. \(2016\)](#) and [Wang et al. \(2010\)](#) showing that the HC diet decreased serum TG levels.

Compared to HC group, FP ($p = 0.0003$) and their hydrolysate produced by Esperase ($p = 0.004$) caused a significant decrease in serum TC (-53 and -34 per cent, respectively). The decreased cholesterolemia in FP group resulted from the low levels of the unesterified and esterified pools that were, respectively, reduced by 35 and 60 per cent, while, regarding EFPH group, only the esterified pool was decreased by -38 per cent, all compared with HC animals. The main hypothesis advanced to explain the observed cholesterol-lowering effect

Groups	C	HC	FP	PFPH	EFPH
<i>mg/g liver</i>					
Total lipids	71±6	193±21*	225±18*	184±33*	198±25*
<i>mmol/g liver</i>					
TC	9.5±0.7	67.0±10.6*	75.0±10.0*	50.9±6.7*#	76.2±9.3*
UC	2.7±1.8	7.1±1.7*	9.05±1.9*#	7.3±1.0*	5.8±0.9*
CE	6.8±1.3	59.9±9.4*	64.4±4.7*	43.6±7.0*#	70.3±10.7*
TG	6.5±1.1	20.0±2.8*	15.7±5.0*	14.1±2.1*#	14.7±2.9*#
PL	34.0±5.5	52.5±6.2*	47.4±8.3	64.5±15.3*	51.8±4.9*
CE/UC	2.51	8.43	7.11	5.97	12.12

Table IV.
Liver lipids contents
in rats treated or not
with FPs and their
hydrolysates

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group, EFPH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; TC: total cholesterol; UC: unesterified cholesterol; CE: cholesteryl ester; TG: triglycerides; PL: phospholipids; data are presented as mean±SD of 6 rats per groups. Superscripted (#, *) means within a row indicate they are significantly different at $P < 0.05$, as following: *: HC, FP, PFPH or EFPH vs C. #FP, PFPH or EFPH vs HC

is the inhibition of cholesterol and lipids absorption (Ferreira *et al.*, 2015; Yahia *et al.*, 2017) as shown by the high fecal cholesterol excretion in FP-treated group ($P = 0.0001$). However, EFPH treated rats did not show any difference in fecal cholesterol compared with HC rats. In fact, Cho *et al.* (2007) reported that the *in vitro* effect of soy proteins on cholesterol micellar solubility was reduced after the hydrolysis of the intact proteins. It is possible that EFPH, via its small peptides fractions, passed the intestinal barrier and reached the systemic blood stream, then liver, where they could exert their bioactivities. This could also explain why EFPH (degree of hydrolysis = 19 per cent), and not PFPH (degree of hydrolysis = 8 per cent), affected serum cholesterol concentration. Indeed, PFPH-treated rats exhibited 1.2-fold higher TC vs HC.

FP supply-induced serum TG decreased by 20 per cent when compared to HC group ($p = 0.04$). Moreover, the lowest PL levels were found with FP diet, unlike the others groups, where values were similar (Table V).

3.5 Cholesterol and phosphatidylcholine distribution on lipoproteins fractions

The effect of FP and their hydrolysates for the possible changes of cholesterol and PC distribution in different lipoproteins fractions was also assessed. With control diet, the obtained FPLC lipoproteins profile revealed that the highest cholesterol contents were found in HDL followed by VLDL. Nevertheless, this profile was changed by the HC diet as indicated by the highest amounts of VLDL followed by HDL (Figure 1). HDL-cholesterol (HDL-c) contents were markedly decreased in HC, FP and EFPH groups compared to C. However, compared with HC, FP and EFPH reduced VLDL-cholesterol (VLDL-c) and-phosphatidylcholine (VLDL-PC), while PFPH did not show any effect. Furthermore, in rats treated with PFPH, a redistribution of cholesterol toward HDL and cholesterol poor-HDL fractions was observed.

PC distribution in lipoproteins fractions of C and HC groups showed that PC was mainly observed in VLDL followed by HDL, smaller HDL and LDL. Compared to HC group, FP and EFPH induced a decrease in the phospholipid content of all lipoprotein fractions whereas PFPH exhibited the highest PC accumulation in the smaller HDL.

Groups	C	HC	FP	PFPH	EFPH
<i>mmol/l</i>					
Glycaemia	3.26±0.22	4.99±0.60*	3.75±0.49 [#]	4.87±0.64*	3.78±0.75
TC	1.43±0.04	6.29±1.14*	2.95±0.46 [#]	7.80±1.79*	4.12±0.76* [#]
UC	0.72±0.01	1.62±0.53*	1.06±0.04 [#]	1.58±0.43*	1.23±0.30*
CE	0.71±0.05	4.67±1.00*	1.88±0.45 [#]	6.21±1.54* [#]	2.89±1.04* [#]
TG	0.66±0.30	1.09±0.09*	0.87±0.16 [#]	1.14±0.19	1.03±0.06
PL	1.98±0.42	2.27±0.46	1.61±0.10 [#]	2.61±0.54	1.86±0.32
<i>mg/day/rat</i>					
Fecal cholesterol	1.8±0.3	19.3±5.8*	50.6±6.9* [#]	17.6±1.5*	21.6±8.3*

Table V.

Glycaemia, serum lipids contents and fecal cholesterol excretion in treated or not with FPs and their hydrolysates

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group; EFPH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; TC: total cholesterol; UC: unesterified cholesterol; CE: cholesteryl ester; TG: triglycerides; PL: phospholipids; data are presented as mean±SD of 6 rats per groups. Superscripted ([#], *) means within a row indicate they are significantly different at $P < 0.05$, as following: *:HC, FP, PFPH or EFPH vs C. [#]FP, PFPH or EFPH vs HC

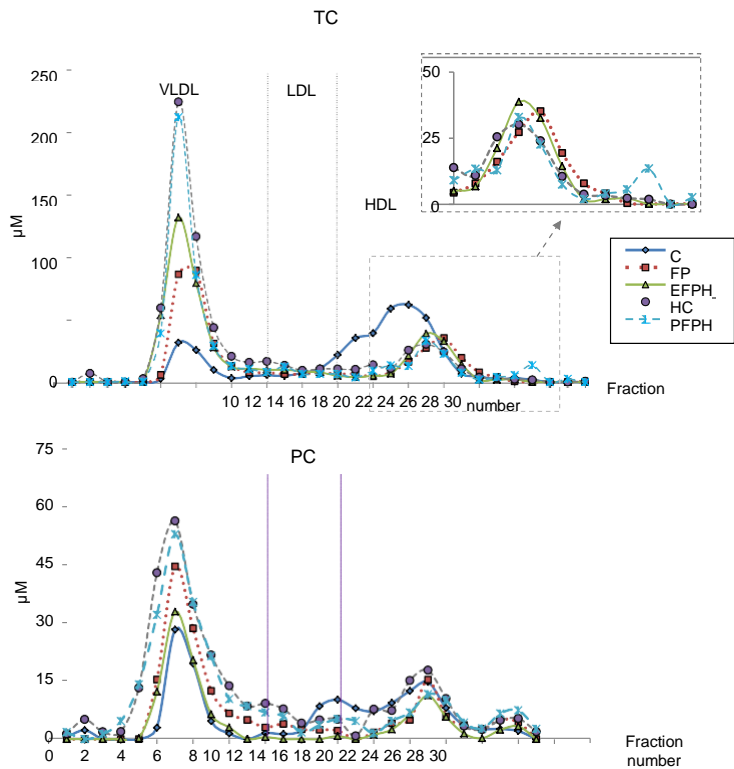


Figure 1.
Cholesterol(TC)and

phosphatidylcholine
(PC) distribution in
serum rats
lipoproteins treated
or not with FPs and
their hydrolysates

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group, EFPH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; Serum lipoproteins were separated by FPLC and collected fractions analyzed for total cholesterol (TC), phosphatidylcholine (PC). Data are presented as representative profile of six pooled animals serum

Similar results have been obtained by [Ferreira et al. \(2015\)](#) and [Yang et al. \(2007\)](#), showing that legume proteins and their hydrolysates decreased the non HDL-c amounts; however, they noticed an increase in HDL-c levels. The decreased HDL-c contents in all rats given the HC diet suggest that the reverse cholesterol transport was up regulated.

3.6 Serum apolipoproteins A-I and A-IV

Regarding C, HC, PFPH and EFPH groups, serum apolipoproteins B, A-I and A-IV were similar ([Table VI](#)). The HC and PL contents in VLDL, and the unchanged Apo B100, which reflect the number of VLDL and LDL particles, suggest that HC diet altered the composition of the VLDL core lipids rather than their synthesis or uptake by liver. Furthermore, [Kang and Davis \(2000\)](#) reported that when the amount of cholesterol increased in liver, the composition of the VLDL core lipids changed (i.e. increase the relative amount of cholesterol

esters to triglycerides) while the number of VLDL particles, assembled and secreted by this organ, remains the same.

However, FP decreased Apo A-I ($p = 0.03$) and A-IV ($p = 0.02$) levels compared with C rats. In a recent work of [Yahia et al. \(2017\)](#), who studied the hypercholesterolemic effect of chickpea proteins hydrolysate on rats, no change in Apo A-I of HDL was founded, while an increase in Apo A-IV contents was noticed in this particle. Two possible mechanisms could explain the decrease of Apo A-I in FP group. The first one is the increase of its uptake by liver, and the second one consists on the decrease of its synthesis ([Röhl and Stangl, 2013](#)). It is the first hypothesis rather than the second that could be advanced in the present study. Indeed, Apo A-I profile in FP rats serum showed a lower Apo A-I contents in their largest lipoproteins but not in the smallest ones. Further investigations should be undertaken to well understand the FP effect on HDL metabolism.

Apo A-IV is synthesized primarily by intestine and liver ([Duka et al., 2013](#)). Therefore, the post-absorptive Apo A-IV level reflected indirectly its post-prandial metabolism. The lower Apo A-IV levels observed in FP serum rats vs C could be because of the reduced enterocyte lipid absorption by FP treatment which involved a down-regulation of Apo A-IV gene synthesis and then impaired its redistribution toward HDL ([Duka et al., 2013](#)).

3.7 Proteins and oxidant stress markers

Compared with control diet, HC diet increased serum proteins. Nonetheless, after treatment with FP, PFPH or EFPH, the serum protein levels decreased (-15, 17 and 27 per cent, respectively compared to HC) and became similar to that of C group. Serum albumin did not show any significant difference among all groups ([Table VII](#)). However, and compared to animals fed control diet, serum uric acid markedly increased by HC feeding. This increase

Table VI.
Apolipoproteins B,
A-I and A-IV
contents in serums
of rats treated or
not with FPs and
their hydrolysates

Arbitrary unit	C	HC	FP	PFPH	EFPH
Apo B	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.04	0.22 ± 0.03
Apo AI	0.64 ± 0.01	0.59 ± 0.06	0.53 ± 0.05*	0.57 ± 0.06	0.61 ± 0.05
Apo AVI	0.75 ± 0.04	0.69 ± 0.11	0.56 ± 0.06*	0.79 ± 0.06	0.75 ± 0.10

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group, EFPH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; data are presented as mean±SD of 6 rats per groups. Superscripted (*) means within a row indicate they are significantly different at $P < 0.05$, as following: *: HC, FP, PFPH or EFPH vs C

Table VII.
Proteins and oxidant
stress markers in rats
treated or not with
FPs and their
hydrolysates

Groups	C	HC	FP	PFPH	EFPH
Proteins (g/l)	62±15	73±6	62±1 [#]	60±4 [#]	53±6 [#]
Albumin (g/l)	26±4	28±3	28±3	27±4	24±3
Uric acid (mM)	125±9	153±8*	159±10*	171±16 [#]	158±14*
Thiols (mM)	0.19±0.07	0.49±0.26	0.32±0.13	0.44±0.17	0.37±0.02
Paraoxonase (U/ml)	109±8	94±8	94±10	116±6 [#]	112±8 [#]

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group, EFPH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; data are presented as mean±SD of 6 rats per groups. Superscripted (#, *) means within a row indicate they are significantly different at $P < 0.05$, as following: * HC, FP, PFPH or EFPH vs C. [#]FP, PFPH or EFPH vs HC

could probably be because of the higher xanthine oxidase activity mainly induced by the HC diet responsible of the hepatic injury. Similar hypothesis was previously proposed by Devrim *et al.* (2008). Indeed, uric acid is the end product of purine nucleotide catabolism by xanthine oxidase. It seems that neither FP nor their hydrolysates could prevent the increase of uric acid. In spite of the high thiol values observed in all treated groups, compared to C group, these differences were not significant.

3.8 Antioxidative action of HDL

Several studies have shown that exogenous antioxidants, especially originated from foods, are essential for counteracting oxidative stress (Shahidi *et al.*, 1992). In our protocol design, the potential of FPs and their hydrolysates to change oxidant/antioxidant status in hypercholesterolemic rat was assessed.

Products of lipid peroxidation, especially fatty acyl residues within phospholipids, present in oxidized-LDL can induce pro-inflammatory phenotypes in arterial wall cells, which contribute to endothelial dysfunction and apoptotic cell death, as the key steps of the initiation and progression of atherosclerosis lesions (Hafiane and Genest, 2013). Whereas, besides its role of ensuring the reverse transport of cholesterol, HDL plays an important function in protecting against non-HDL oxidation. This property is attributed to some proteins and enzymes (Hafiane and Genest, 2013). To evaluate the AOI of the treated rats HDL, non-HDL fraction of each group was incubated with and without the HDL of the same group and the inhibitory property of their oxidation was estimated.

In the absence of HDL, the highest VLDL-LDL oxidation level was observed in PFPH followed by EFPH groups, while the lowest oxidation was obtained in the C group (Table VIII). This could not be because of the amounts of lipids in these lipoproteins as, for the same levels of cholesterol, PL contents were almost the same. However, this high oxidability could be because of the nature of acyl groups in lipids. In FP group, the non-HDL fraction was less susceptible to oxidation than that of HC.

On the other hand, the HDL of PFPH and EFPH groups showed a remarkable antioxidative effect (59 and 43 per cent, respectively) compared to HC group (13 per cent) ($p = 0.001$). These results could be attributed to the elevated PON1 activity (20 and 15 per cent higher in PFPH and EFPH, respectively, compared to HC group; Table VII) probably because of the direct effect of some peptides within hydrolysates or to an up-regulation as response to the high oxidation of the non-HDL fraction. According to Aviram *et al.* (1999), PON1 is inhibited in presence of oxidized LDL. However, this inhibition is countred by antioxidants. Hence, it could be possible that the hydrolysates were implicated in the increase of PON1 activity.

Table VIII.
AOI of HDL
separated from
serum of rats treated
or not with FPs and
their hydrolysates

Arbitrary unit	C	HC	FP	PFPH	EFPH
(VLDL-LDL)	92.6 ± 0.0	166.0 ± 15.3*	89.5 ± 12.5 [#]	257.8 ± 25.4* [#]	170.8 ± 34.7*
(VLDL-LDL +HDL)	76.4 ± 0.0	144.9 ± 6.4*	95.8 ± 12.2 [#]	106.3 ± 19.2* [#]	97.5 ± 23.9* [#]

Notes: C: Control group; HC: hypercholesterolemic group; FP: fenugreek protein group; PFPH: Purafect-fenugreek proteins hydrolysate group, EFPH: Esperase-fenugreek proteins hydrolysate group; data are presented as mean±SD of 6 rats per groups. Superscripted ([#], *) means within a row indicate they are significantly different at $P < 0.05$, as following: *: HC, FP, PFPH or EFPH vs C. [#]FP, PFPH or EFPH vs HC

4. Conclusion

FPs and EFPH exhibited an interesting hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic activity, accompanied with an antioxidant property. The synergetic use of FPs and their Esperase hydrolysate could represent a promising nutraceutical ingredient in foods for the prevention against hypercholesterolemia complications. However, with the lack of information and investigations, it was not possible to settle if the hypocholesterolemic effect of FPs and their Esperase hydrolysate was mediated by their direct action on cellular or subcellular level or if it was just a consequence of the inhibition of cholesterol and lipid absorption in gut. Further works may bring more elucidations to well understand the exact mechanism by which they act.

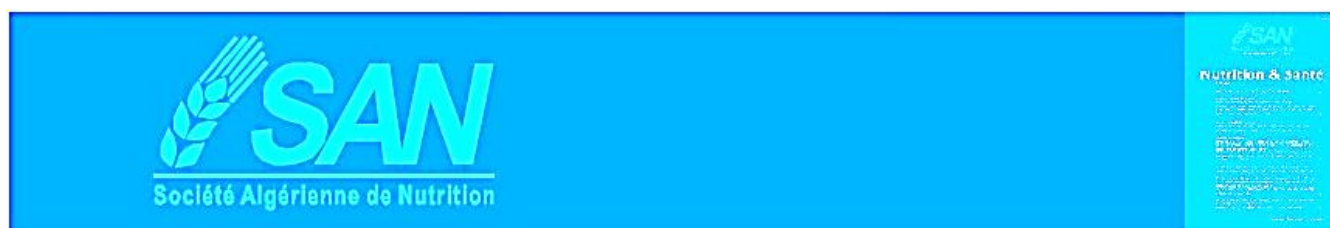
References

- Acín, S., Navarro, M.A., Arbonés-Mainar, J.M., Guillén, N., Sarriá, A.J., Carnicer, R., Surra, J.C., Orman, I., Segovia, J.C., De La Torre, R., Covas, M.I., Fernández-Bolaños, J., Ruiz-Gu, V. and Osada, J. (2006), "Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice", *The Journal of Biochemistry*, Vol. 140 No. 3, pp. 383-391.
- Adler-Nissen, J. (1986), "A review of food hydrolysis specific areas", in Adler-Nissen, J. (Ed.), *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier, Copenhagen, pp. 57-109.
- Athmani, N., Dehiba, F., Allaoui, A., Barkia, A., Bougateg, A., Lamri-Senhadj, M.Y., Nasri, M. and Boualga, A. (2015), "Sardina pilchardus and Sardinella aurita protein hydrolysates reduce cholesterolemia and oxidative stress in rat fed high cholesterol diet", *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, Vol. 5 No. 1, pp. 47-54.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S., Eroglu, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.L., Newton, R.S. and La Du, B. (1999), "Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants", *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 26 Nos 7/8, pp. 892-904.
- Babin, P.J. and Gibbons, G.F. (2009), "The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a 'spandrel' of hepatic lipid metabolism?", *Progress in Lipid Research*, Vol. 48 No. 2, pp. 73-91.
- Belguith-Hadriche, O., Bouaziz, M., Jamoussia, K., Simmonds, M., El Feki, A. and Makni-Ayedi, F. (2013), "Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds", *Food Chemistry*, Vol. 138 Nos 2/3, pp. 1448-1453.
- Benomar, S., Yahia, S., Dehiba, F., Guillen, N., Rodriguez-Yoldi, M.J., Osada, J. and Boualga, A. (2015), "Differential antioxidative and hypocholesterolemic responses to two fish protein hydrolysates (Sardina pilchardus and Boops boops) in cholesterol-fed rats", *Nutrition and Food Science*, Vol. 45 No. 3, pp. 448-466.
- Bettzieche, A., Brandsch, C., Weisse, K., Hirche, F., Eder, K. and Stang, G.I. (2008), "Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats", *British Journal of Nutrition*, Vol. 99 No. 05, pp. 952-962.
- Bouchenak, M. and Lamri-Senhadj, M. (2013), "Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention: a review", *Journal of Medicinal Food*, Vol. 16 No. 3, pp. 185-198.
- Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E. and Rajamohamed, S.H. (2010), "Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques", *Food Research International*, Vol. 43 No. 2, pp. 537-546.
- Bukhari, S.B., Bhanger, M.I. and Memon, S. (2008), "Antioxidative activity of extracts from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*)", *Pakistan Journal of Analytical and Environmental Chemistry*, Vol. 9, pp. 78-83.
- Cho, S.J., Juillerat, M.A. and Lee, C.H. (2007), "Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55 No. 26, pp. 10599-10604.

- Christiane, K.F., Ellen, N. and Helene, L. (2009), "Allergenicity and antigenicity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) proteins in foods", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 123 No. 1, pp. 187-194.
- Cicero, A.F.G., Fogacci, F. and Colletti, A. (2017), "Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review", *British Journal of Pharmacology*, Vol. 174 No. 11, pp. 1378-1394.
- Council of European Communities (1986), "Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations", *Official Journal of the European Communities (JO 86/609/ CEE)*, Vol. L358, pp. 1-18. Brussels.
- Devrim, E., Ergüder, I.B., Ozbek, H. and Durak, I. (2008), "High-cholesterol diet increases xanthine oxidase and decreases nitric oxide synthase activities in erythrocytes from rats", *Nutrition Research*, Vol. 28 No. 3, pp. 212-215.
- Duka, A., Fotakis, P., Georgiadou, D., Katefides, A., Tzavlaki, K., Von Eckardstein, L., Stratikos, E., Kardassis, D. and Zannis, V.I. (2013), "ApoA-IV promotes the biogenesis of apoA-IV-containing HDL particles with the participation of ABCA1 and LCAT", *Journal of Lipid Research*, Vol. 54 No. 1, pp. 107-115.
- Eckerson, H.W., Wyte, C., La. and Du, B.N. (1983), "The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism", *American Journal of Human Genetics*, Vol. 35, pp. 1126-1138.
- El Khoury, D. and Anderson, G.H. (2013), "Recent advances in dietary proteins and lipid metabolism", *Current Opinion in Lipidology*, Vol. 24 No. 3, pp. 207-213.
- Elmnan, A., Balgees, A. and Mangara, J.L. (2012), "Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed dietary levels on lipid profile and body weight gain of rats", *Pakistan Journal of Nutrition*, Vol. 11 No. 11, pp. 1004-1008.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V. and Reiner, E. (2003), "Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment", *Analytical Biochemistry*, Vol. 312 No. 2, pp. 224-227.
- Fassini, P.G., Noda, R.W., Ferreira, E.S., Silva, M.A., Neves, V.A. and Demonte, A. (2011), "Soybean glycinin improves HDL-C and suppresses the effects of rosuvastatin on hypercholesterolemic rats", *Lipids in Health and Disease*, Vol. 10, pp. 165-171.
- Ferreira, E.S., Amaral, A.L.S., Demonte, A., Zanelli, C.F., Capraro, J., Duranti, M. and Neves, V.A. (2015), "Hypocholesterolaemic effect of rat-administered oral doses of the isolated 7S globulins from cowpeas and adzuki beans", *Journal of Nutritional Science*, Vol. 4, pp. 1-9.
- Ferrières, J., Bongard, V., Dallongeville, J., Arveiler, D., Cottel, D., Haas, B., Wagner, A., Amouyel, P. and Ruidavets, J.B. (2009), "Trends in plasma lipids, lipoproteins and dyslipidaemias in French adults, 1996-2007", *Archives of Cardiovascular Diseases*, Vol. 102 No. 4, pp. 293-301.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. (1957), "A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues", *Journal of Biology and Chemistry*, Vol. 226, pp. 497-509.
- Garcia, M.C., Puchalska, P., Esteve, C. and Marina, M.L. (2013), "Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities", *Talanta*, Vol. 106, pp. 328-349.
- Guallar-Castillón, P., Gil-Montero, M., León-Muñoz, L.M., Graciani, A., Bayán-Bravo, A., Taboada, J.M., Banegas, J.R. and Rodríguez-Artalejo, F. (2012), "Magnitud y manejo de la hipercolesterolemia en la población adulta de España, 2008-2010, el estudio ENRICA", *Revista Española de Cardiología*, Vol. 65 No. 6, pp. 551-558.
- Habib-Martin, Z., Hammad, H., Afifi, F., Zihlif, M., Al-Ameer, H., Saleh, M., Abaza, I. and Nassar, Z. (2017), "In vitro and in vivo evaluation of the antiangiogenic activities of *Trigonella foenum-graecum* extracts", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 7 No. 8, pp. 732-738.
- Hafiane, A. and Genest, J. (2013), "HDL, atherosclerosis, and emerging therapies", *Cholesterol*, available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/891403>

- He, X., Chen, F., McGovern, M.M. and Schuchman, E.H. (2002), "A fluorescence based, high-throughput sphingomyelin assay for the analysis of Niemann-Pick disease and other disorders of sphingomyelin metabolism", *Analytical Biochemistry*, Vol. 306 No. 1, pp. 115-123.
- Hojjati, M.R. and Jiang, X.C. (2006), "Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine", *Journal of Lipid Research*, Vol. 47 No. 3, pp. 673-676.
- Horwitz, W. (2000), *Official Methods of Analysis of AOAC International: Food Composition, Additives, Natural Contaminants*, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Hubáček, J.A., Bobková, D., Bohuslavová, R. and Poledne, R. (2008), "Differences in expression of cholesterol 7 α -hydroxylase between PHHC and wistar rats", *Folia Biologica*, Vol. 54 No. 1, pp. 18-23.
- Institut National de Santé Publique (2007), "Enquête nationale santé: transition épidémiologique et système de santé. Projet TAHINA", *Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière*, El Biar.
- Kang, S. and Davis, R.A. (2000), "Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1529 Nos 1/3, pp. 223-230.
- Kapravelou, G., Martínez, R., Andrade, A.M., Sánchez, C., Chaves, C.L., López-Jurado, M., Aranda, P., Cantarero, S., Arrebola, F., Fernández-Segura, E., Galisteo, M. and Porres, J.M. (2013), "Health promoting effects of lupin (*lupinus albus* var. multolupa) protein hydrolyzate and insoluble fiber in a diet-induced animal experimental model of hypercholesterolemia", *Food Research International*, Vol. 54 No. 2, pp. 1471-1481.
- Khorshidian, N., Asli, M.Y., Arab, M., Mirzaie, A.A. and Mortazavian, A.M. (2016), "Fenugreek: potential applications as a functional food and nutraceutical", *Nutrition and Food Sciences Research*, Vol. 3 No. 1, pp. 5-16.
- Ktari, N., Belguith-Hadriche, O., Ben Amara, I., Ben Hadj, A., Turki, M., Makni-Ayedi, F., Boudaouara, T., El Feki, A., Boualga, A., Ben Salah, R. and Nasri, M. (2015), "Cholesterol regulatory effects and antioxidant activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in cholesterol-fed rats", *Food and Function*, Vol. 6 No. 7, pp. 2273-2282.
- Lemes, A.C., Sala, L., Ores, J.C., Braga, A.R.C., Egea, M.B. and Fernandes, K.F. (2016), "A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 17 No. 6, pp. 950-973.
- León-Espinosa, E.B., Sánchez-Chino, X., Garduño-Siciliano, L., Álvarez-González, R.I., Dávila-Ortiz, G., Madrigal-Bujaidar, E., Téllez-Medina, D.I. and Jiménez-Martínez, C. (2016), "Hypocholesterolemic and anticarcinogenic effect of vicia faba protein hydrolyzates", *Nutrition and Cancer*, Vol. 68 No. 5, pp. 856-864.
- López-Barrios, L., Gutiérrez-Urbe, J.A. and Serna-Saldívar, S.O. (2014), "Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients", *Journal of Food Science*, Vol. 79 No. 3, pp. 273-283.
- Madhava Naidu, M., Shyamala, B.N., Pura, N., J., Sulochanamma, G. and Srinivas, P. (2011), "Chemical composition and antioxidant activity of the husk and endosperm of fenugreek seeds", *Food Science and Technology*, Vol. 44, pp. 451-456.
- Meghwal, M. and Goswami, T.K. (2012), "A review on the functional properties, nutritional content, medicinal utilization and potential application of fenugreek", *Journal of Food Processing Technology*, Vol. 3, pp. 181-190.
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. and Schrezenmeir, J. (2008), "Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects", *European Journal of Nutrition*, Vol. 47 No. 4, pp. 171-182.
- Mowla, A., Alauddin, M., Rahman, M.A. and Ahmed, K. (2009), "Antihyperglycemic effect of trigonella foenum-graecum (fenugreek) seed extract in alloxan-induced diabetic rats and its use in diabetes mellitus: a brief qualitative phytochemical and acute toxicity test on the extract", *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, Vol. 6 No. 3, pp. 255-261.

- Nasri, M. (2017), "Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits: a review", in Toldrá, F. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press, Cambridge, pp. 109-159.
- Navab, M., Hama, S.Y., Hough, G.P., Subbanagounder, G., Reddy, S.T. and Fogelman, L.M. (2001), "A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids", *Journal of Lipid Research*, Vol. 42 No. 8, pp. 1308-1317.
- Navarro, M.A., Carpintero, R., Acin, S., Arbones-Mainar, J.M., Calleja, L., Carnicer, R. and Surra, J.C. (2005), "Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation", *Cytokine*, Vol. 31 No. 1, pp. 52-63.
- Reddy, R.R.L. and Srinivasan, K. (2011), "Dietary fenugreek and onion attenuate cholesterol gallstone formation in lithogenic diet-fed mice", *International Journal of Experimental Pathology*, Vol. 92 No. 5, pp. 308-319.
- Röhl, C. and Stangl, H. (2013), "HDL endocytosis and resecretion", *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1831 No. 11, pp. 1626-1633.
- Ruiz, J.C.R., Ancona, D.B. and Campos, M.R.S. (2014), "Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential", *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 29, pp. 776-784.
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. (2010), "Antioxidative peptides from food proteins: a review", *Peptides*, Vol. 31 No. 10, pp. 1949-1956.
- Sedlak, J. and Lindsay, R.H. (1968), "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent", *Analytical Biochemistry*, Vol. 25, pp. 192-205.
- Shahidi, F., Janitha, P.K. and Wanasundara, P.D. (1992), "Phenolic antioxidants", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 32 No. 1, pp. 67-103.
- Soufleros, E. and Bertrand, A. (1998), "Evaluation d'une méthode CLHP adaptée au dosage des acides aminés du vin", *Vitis-Journal of Grapevine Research*, Vol. 37, pp. 43-53.
- Srinivasan, K. (2013), "Dietary spices as beneficial modulators of lipid profile in conditions of metabolic disorders and diseases", *Food & Function*, Vol. 4 No. 4, pp. 503-521.
- Tóth, P.P., Potter, D. and Ming, E.E. (2012), "Prevalence of lipid abnormalities in the United States: the national health and nutrition examination survey 2003-2006", *Journal of Clinical Lipidology*, Vol. 6 No. 4, pp. 325-330.
- Udenigwe, C.C. and Howard, A. (2013), "Meat proteome as source of functional biopeptides", *Food Research International*, Vol. 54 No. 1, pp. 1021-1032.
- Udenigwe, C.C. and Rouvinen-Watt, K. (2015), "The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 16 No. 12, pp. 9303-9313.
- Wang, Y.M., Zhang, B., Xue, Y., Li, Z.J., Wang, J.F., Xue, C.H. and Yanagita, T. (2010), "The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats", *Lipids in Health and Disease*, Vol. 9, pp. 4-9.
- Yahia, S., Benomar, S., Dehiba, F., Allaoui, A., Guillen, N., Rodriguez-Yoldi, M.J., Osada, J. and Boualga, A. (2017), "Hypocholesterolemic and antioxidant efficiency of chickpea (*cicer arietinum*) protein hydrolysates depend on its degree of hydrolysis in cholesterol-fed rat", *Nutrition and Food Science*, Vol. 47 No. 2, pp. 254-269.
- Yang, S.C., Liu, S.M., Yang, H.Y., Lin, Y.H. and Chen, J.R. (2007), "Soybean protein hydrolysate improves plasma and liver lipid profiles in rats fed high-cholesterol diet", *The Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 26 No. 5, pp. 416-423.



Composés bioactifs

Etude du potentiel antioxydant de quatre fractions obtenues par ultrafiltration membranaire d'hydrolysats de protéines de fenugrec (*Trigonella foenum graecum*)

Antioxidant properties of ultrafiltration membrane fractions obtained from fenugreek proteins hydrolysates (*Trigonella foenum graecum*)

Amine ALLAOUI ^{1*}, Khadidja ZOUD ^{1*}, Moncef NASRI ², Ahmed BOUALGA ¹

¹Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Oran1, Algérie. ²Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie, Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax, Tunisie

Auteur correspondant :boualga.ahmed@univ-oran1.dz

Reçu le 17 novembre 2018, Révisé le 15 décembre 2018, Accepté le 31 décembre 2018

Résumé Introduction. Vu leur richesse en protéines, les légumineuses peuvent constituer une source potentiel de biopeptides. Ces biopeptides peuvent être libérés des protéines par une hydrolyse enzymatique contrôlée. Les hydrolysats ainsi obtenus sont formés d'un mélange de peptides. **Objectif.** Cette étude vise à évaluer *in vitro* l'activité antioxydante d'hydrolysats protéiques de fenugrec et de leurs fractions. **Matériel et méthodes.** Les protéines sont purifiées à partir de la farine de fenugrec délipidée, par précipitation au point isoélectrique. Ces protéines sont ensuite hydrolysées par deux enzymes : l'Espérase et la Purafect. Les hydrolysats obtenus (PFHE et PFHP, respectivement pour protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase et Purafect) sont alors fractionnés par ultrafiltration membranaire aux seuils de coupure moléculaire 30, 10 et 5 kDa. Chacune des fractions a été évaluée pour ses propriétés antioxydantes par la détermination de la capacité de piégeage du diphenyl picryl hydrazyl et du pouvoir de réduction de l'ion ferrique. **Résultats.** Les PFHE montrent des propriétés antioxydantes supérieures à celles enregistrées avec les PFHP. Les activités antioxydantes des deux hydrolysats varient d'une fraction à une autre, avec de meilleures activités enregistrées avec les fractions <5kDa et >30 kDa. Les fractions ont montré des propriétés antioxydantes inférieures ou égales à celles des hydrolysats. **Conclusion.** Les hydrolysats de protéines de fenugrec possèdent des propriétés antioxydantes. Par ailleurs, ces propriétés ne sont pas significativement améliorées après fractionnement.

Mots clés : *Activité antioxydante, hydrolysat, protéines de fenugrec, fractions, ultrafiltration, DPPH, FRAP.*

Abstract/Introduction. Legumes may be a potential source of biopeptides. These biopeptides can be released from proteins by controlled enzymatic hydrolysis. However, the obtained hydrolysates are formed of a mixture of peptides. **Aim.** This study was conducted to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of fenugreek protein hydrolysates and their fractions. **Material and methods.** Fenugreek proteins were hydrolyzed by two endopeptidases: Esperase and Purafect. Esperase- (EFPH) and Purafect-fenugreek proteins hydrolysates (PFPH) were then fractionated by membrane ultrafiltration at the molecular cutoff thresholds of 30, 10 and 5 kDa. The obtained hydrolysates and fractions were then assayed and compared for their antioxidant activity by two antioxidant test: diphenyl picryl hydrazyl scavenging activity and ferric reducing activity power. **Results.** EFPH exhibited higher antioxidant properties compared to PFPH. Among the fractions, those <5kDa and >30kDa showed the best antioxidant activities. However, the fractions showed antioxidant properties less than or equal to those of the hydrolysates. **Conclusion.** Fenugreek protein hydrolysates have antioxidant properties. Moreover, these properties are not significantly improved after fractionation.

Keywords : Antioxidant activity, fenugreek proteins, hydrolysate, membrane fraction, DPPH, FRAP.

Introduction

Les protéines de légumineuses peuvent constituer une source potentielle de peptides biologiquement actifs [1]. Ces peptides bioactifs sont des séquences d'acides aminés (2-50 acides aminés) encryptées dans la molécule protéique et demeurent inactives jusqu'à ce qu'elles soient libérées par digestion gastro-intestinale ou par hydrolyse enzymatique *in vitro* [2,3]. La propriété antioxydante est une des propriétés biologiques attribuées aux hydrolysats et aux peptides. Les travaux sur les protéines de légumineuses et leurs hydrolysats, rapportent que le soja est le mieux étudié [4,5]. Cependant, d'autres légumineuses ont fait l'objet de certains travaux. Setti *et al.* [6] ont rapporté que les propriétés antioxydantes des protéines de fenugrec semblent augmenter après leur fermentation. De même, Sbroggio *et al.* [7] ont noté que l'activité antioxydante, *in vitro*, des protéines de l'okara (sous-produit du soja) augmente après leur hydrolyse avec Alcalase et Flavourzyme.

Selon Sbroggio *et al.* [7], l'activité antioxydante dépend fortement du degré d'hydrolyse (DH), qui définit, en partie, la taille du peptide. Abu-Salem *et al.* [8] ont également noté que les peptides de soja, ayant un poids moléculaire faible, ont une meilleure propriété antioxydante, comparés aux peptides ayant un poids moléculaire élevé. Cette relation entre le DH et l'activité antioxydante est aussi observée avec les hydrolysats de protéines de pois chiche et de sésame [2,9]. Par ailleurs, les propriétés antioxydantes des peptides peuvent aussi dépendre de la protéase

utilisée, la nature des peptides libérés et leur composition en acides aminés [10].

Étant donné qu'un hydrolysate est formé d'un ensemble hétérogène de peptides, et dont l'activité biologique peut varier d'un peptide à un autre, de nombreux essais ont été réalisés pour l'isolement, la purification et l'identification des fractions avec l'activité biologique désirée. Parmi ces techniques, on cite l'ultrafiltration, la chromatographie d'exclusion de taille, la chromatographie échangeuse d'ions ou encore la chromatographie en phase inverse. Ces procédés peuvent séparer les biopeptides dans les hydrolysats de protéines en fractions selon leurs propriétés physico-chimiques, tels que leur taille, leur charge ou leur caractère hydrophobe [3,11]. Le fenugrec reste très peu étudié, malgré sa richesse en protéines qui peuvent présenter une source potentielle de peptides bioactifs.

A cet effet, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antioxydante des différentes fractions des protéines hydrolysées de fenugrec afin d'identifier la ou les fractions les plus actives.

Matériel et méthodes

Matière première

Les grains de fenugrec utilisés dans ce protocole sont achetés dans un marché local (Tiaret, Ouest algérien). Ils sont nettoyés, moulus puis tamisés pour obtenir une poudre fine (farine) qui est ensuite délipidée au Soxhlet (*Labotech LT-6, Allemagne*) avec du *n*-hexane (*Biochem Chemopharma, Royaume-Uni*).

Préparation de l'isolat de protéines de fenugrec

Les protéines de fenugrec (PF) sont extraites par précipitation au pH isoélectrique [12]. La farine de fenugrec délipidée est mise en suspension dans l'eau distillée à un rapport 1:20 (p/v), sous agitation continue, et le pH du mélange est ensuite ramené à 10 avec du NaOH (1N). Après 30 minutes d'incubation sous agitation, cette suspension est centrifugée à 2000g pendant 30 min à 4°C. Les protéines dans le surnageant sont récupérées par précipitation à pH 4.5 (HCl 2N), suivie d'une centrifugation (3000g, 30 min). Le culot est ensuite récupéré après deux lavages successifs à l'eau distillée. Les protéines ainsi obtenues sont alors lyophilisées et conservées à 4°C comme isolat de protéines de fenugrec (IPF).

Préparation des hydrolysats des protéines de fenugrec

L'hydrolyse des protéines de fenugrec est réalisée selon la technique du pH-stat [13] qui consiste à effectuer une hydrolyse enzymatique des protéines dans un milieu non tamponné, par l'ajout continu de soude afin de maintenir le pH de la réaction constant au cours de l'hydrolyse. Ceci permet de suivre le degré d'hydrolyse (DH) en temps réel. Deux hydrolysats sont préparés moyennant deux endopeptidases :

- PFHE : PF hydrolysées avec Espérase® 0.8L (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) (pH 9 ; 50°C).
- PFHP : PF hydrolysées avec Purafect® 2000E (*Genencor International, Etats-Unis*) (pH 10 ; 50°C).

L'IPF est d'abord solubilisé dans de l'eau distillée à raison de 50 g/L. La température et le pH de la solution sont ensuite ajustés selon les recommandations du fournisseur de chaque enzyme. Après stabilisation du pH, l'enzyme est ajoutée au mélange avec un rapport enzyme/substrat de 5 U.mg⁻¹. Le produit de l'hydrolyse est continuellement titré par une solution de soude (2N) pour maintenir le pH constant.

Après 5 heures d'hydrolyse, la solution d'hydrolysat est chauffée à 90°C pendant 10 min afin d'inactiver l'enzyme. Après refroidissement, la solution est centrifugée à 5000g pendant 15 min, et le surnageant contenant l'hydrolysat est lyophilisé et conservé à l'abri de l'humidité.

Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH), défini comme le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques coupées (h) et le nombre total de liaisons peptidiques de la protéine ($h_{tot}=7,8 \text{ meq.g}^{-1}$), est calculé à partir de la quantité de

base (NaOH) ajoutée au milieu réactionnel durant l'hydrolyse, selon la formule :

$$DH (\%) = \frac{V_B \times N_B}{mp} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

où : V_B est le volume de base (en litre) ajouté, N_B est la normalité de la base, mp est la masse de la protéine (en kg), et α est le facteur de dissociation des groupements $\alpha\text{-NH}_2$ libérés durant l'hydrolyse (dans cette étude $\alpha=1$).

Electrophorèse des protéines

Une électrophorèse des échantillons en conditions dénaturantes est réalisée selon la technique de Laemmli, [14] sur un gel de polyacrylamide contenant du dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE) composé d'un gel de concentration à 5% et d'un gel de séparation à 20%. Après migration, les bandes protéiques sont mises en évidence par coloration au bleu de Coomassie R-250 (*Bio-Rad Laboratories, Mexique*) à 0,025% dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (15/5/80 ; v/v/v), puis lavage avec un mélange de méthanol/eau/acide acétique (5/4/1 ; v/v/v).

Fractionnement des hydrolysats de fenugrec

Les hydrolysats des protéines de fenugrec sont fractionnés par ultrafiltration (UF) baro-membranaire frontale sur des membranes en triacétate de cellulose aux seuils de coupure de 30, 10 et 5 kDa, successivement. 50 ml d'une solution d'hydrolysat (1 mg.ml⁻¹) sont introduits dans une cellule d'ultrafiltration (*Millipore Amicon Stirred Cell 8050, Etats-Unis*). A la fin des ultrafiltrations, quatre fractions sont obtenues : >30, entre 10-30, entre 5-10 et <5 kDa. Les fractions sont lyophilisées, pesées et enfin testées pour leurs propriétés antioxydantes.

Test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

L'activité antiradicalaire des hydrolysats et des fractions fenugrec est mesurée selon la méthode décrite par Jridi *et al.* [15]. 500 µl d'échantillon à tester (concentration finale 1 mg.ml⁻¹) ou de butyle hydroxyanisole (BHT) sont incubés avec 375 µl d'éthanol pur et 125 µl d'une solution de DPPH (*Sigma Chemical, Etats-Unis*) à 0,02 mM dans l'éthanol pur. Un blanc (500 µl d'échantillon et 500 µl d'éthanol) est préparé pour chaque concentration. Un témoin est préparé en remplaçant l'échantillon par l'eau ultrapure. Les tubes sont incubés pendant 1h, à l'obscurité, et l'absorbance est ensuite mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est calculée comme suit :

Activité antioxydante (%)

$$= \left(1 - \frac{DO_{\text{éch.}} - DO_{\text{blanc}}}{DO_{\text{témoin}}} \right) \times 100$$

Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur (*ferric reducing antioxidant power*; *FRAP*) des hydrolysats et des fractions est déterminé selon la méthode de Oyaizu [16]. 0,5 ml d'échantillon (concentration finale 1 mg.ml⁻¹) est incubé avec 1,25 ml de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6.6) et 1,25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium à 10 g.l⁻¹ (*Normapur, France*) pendant 30 minutes à 50°C. Après, 1,25 ml d'acide trichloroacétique (10%) est ajouté et le tout est centrifugé 10 min à 3000g. 1,25 ml de surnageant est repris et mélangé avec 1,25 ml d'eau bi-distillée et 0,25 ml de FeCl₃ (1 g.l⁻¹). Après une incubation de 10 minutes, l'absorbance est mesurée à 700 nm. La vitamine C est utilisée comme témoin positif.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm écart type (ET). Après analyse de la Variance (Anova à un facteur), la classification des moyennes est effectuée par le test de rang multiple de LSD-Fisher.

Résultats

Cinétique et degré d'hydrolyse

Le suivi de l'hydrolyse de l'isolat protéique, *via* le calcul du degré d'hydrolyse, a donné deux profils différents selon l'enzyme utilisée. Comme il est montré dans la figure 1, la cinétique d'hydrolyse avec les deux enzymes est caractérisée par une phase initiale très rapide. Cependant, cette phase initiale d'hydrolyse en présence de l'Espérase prend plus de temps pour atteindre le plateau, comparée à celle de la Purafect (60 min vs. 15 min, respectivement). De plus, avec un même rapport E/S, le degré d'hydrolyse obtenu avec l'Espérase (DH=19%) est largement supérieur à celui de la Purafect (DH=9%).

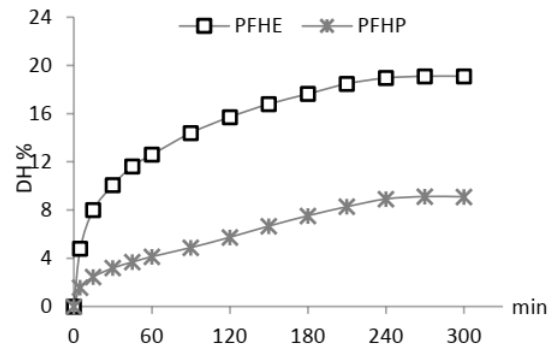


Fig. 1. Cinétique d'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect

E/S=5 U.mg⁻¹ protéine, [protéines]=5%.

Profil électrophorétique de l'isolat et des hydrolysats des protéines (figure 2)

Le profil électrophorétique de l'isolat de protéines de fenugrec (colonne A), analysé par une SDS-PAGE en conditions dénaturantes, se caractérise par la présence de six bandes. Après hydrolyse, les bandes 1, 2, 3 et 4 ont disparu avec l'Espérase, alors qu'avec la Purafect la bande 3 subsiste, mais elle est moins dense. Par ailleurs, les bandes 5 et 6 présentes dans l'isolat protéique (A) se retrouvent également dans les hydrolysats (B et C) mais avec une plus forte densité.

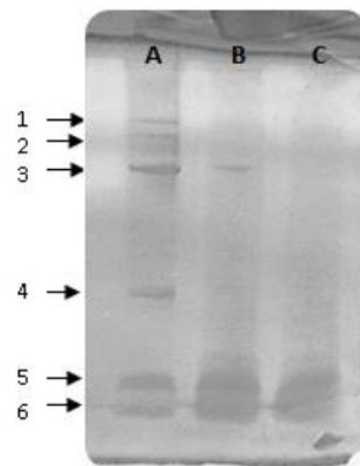


Fig. 2. Profil électrophorétique de l'isolat et des hydrolysats de protéines de fenugrec

(A) IPF: isolat de protéines de fenugrec. (B) PFHP: protéines de fenugrec hydrolysées avec Purafect. (C) PFHE: protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase.

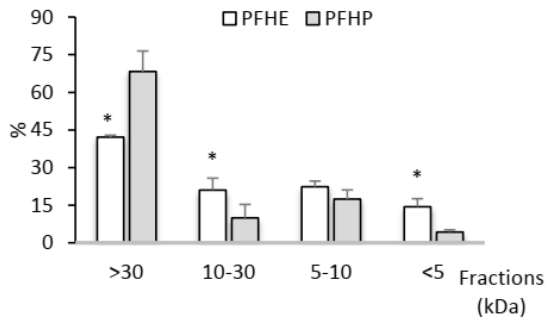


Fig.3. Distribution des protides issus de l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec l'Espérase et la Purafect

PFHE : protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase.. PFHP : protéines de fenugrec hydrolysées avec Purafect. Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm ET$ de 3 échantillons. La comparaison des moyennes entre PFHE et PFHP réalisée par le test LSD-Fisher. * $P \leq 0,05$.

Pourcentage pondéral de la fraction (%) = $\frac{\text{masse pondérale de la fraction}}{\text{somme des masses pondérales des fractions}}$

Répartition des protides en fonction de leur poids moléculaire (figure 3)

Comparées aux PFHP (DH=9%), PFHE (DH=19%) contiennent moins de protides de poids moléculaire (PM) >30 kDa (68% vs. 42%, respectivement), et plus de protides de PM compris entre 10-30 kDa et particulièrement pour la fraction <5 kDa qui en contient 3,5-fois plus.

Propriété de piégeage du radical DPPH

Les protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase montrent une activité antioxydante supérieure à celle enregistrée avec les protéines hydrolysées avec la Purafect (60% vs. 40%, respectivement). Après fractionnement, les résultats montrent que les fractions >30, 5-10 et <5 kDa des PFHE ont une activité antioxydante (AOx) supérieure à 50% (figure 4). Cette activité est similaire à celle de leur hydrolysate et au BHT. Pour ce qui est des PFHP, c'est la fraction <5 kDa qui présente l'activité la plus intéressante et dont la valeur est 1,6-fois plus élevée comparée à celle de son hydrolysate.

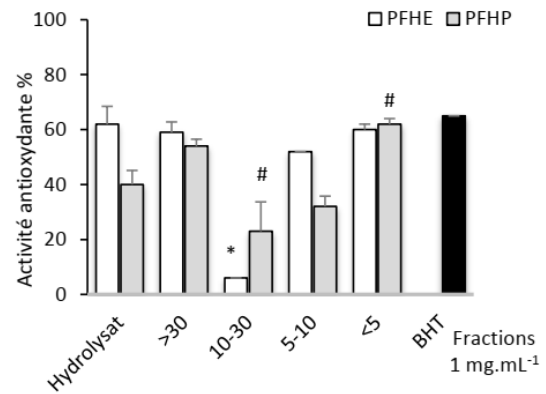


Fig. 4. Pouvoir inhibiteur DPPH par les différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec

Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm ET$ de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD-Fisher. Les moyennes portant des signes distincts sont significativement différentes ($P \leq 0,05$). * Fractions PFHE vsHydrolysate PFHE. # : Fractions PFHP vsHydrolysate PFHP.

Pouvoir réducteur de l'ion ferrique

Aucune différence du pouvoir réducteur n'a été enregistrée entre PFHE et PFHP. Après fractionnement, ce sont les fractions >30 kDa et <5 kDa des PFHP qui montrent le pouvoir réducteur le plus important comparées à leur hydrolysate (figure 5).

Discussion

La qualité d'un hydrolysate dépend d'un certain nombre de paramètres : l'enzyme utilisée, les conditions d'hydrolyse, la nature du substrat, le rapport enzyme/substrat et le degré d'hydrolyse. Ce dernier exprime le nombre de liaisons peptidiques clivées par rapport aux liaisons peptidiques totales dans la protéine.

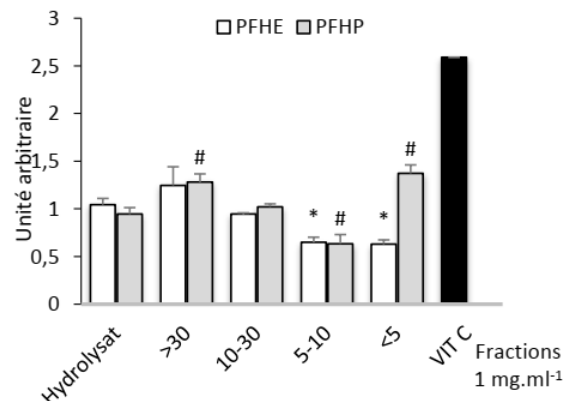


Fig. 5. Pouvoir réducteur des différentes fractions d'hydrolysats de protéines de fenugrec

*Les résultats sont exprimés sous forme de $M \pm ET$ de 3 échantillons. La comparaison des moyennes est réalisée par le test LSD-Fisher. Les moyennes portant des signes distincts sont significativement différentes ($P \leq 0,05$). * Fractions PFHE vs Hydrolysats PFHE. # Fractions PFHP vs Hydrolysats PFHP.*

Il renseigne également sur la taille des peptides libérés et la spécificité du catalyseur [3, 10]. Dans ce travail, l'isolat de protéines de fenugrec a fait l'objet d'une hydrolyse poussée au moyen de deux enzymes ; Purafect ou Espérase. Ces deux enzymes ont donné deux profils d'hydrolyse différents. En effet, même si la cinétique de l'hydrolyse a montré une phase initiale très rapide pour les deux enzymes avant d'atteindre un plateau. Cependant, cette phase dure plus longtemps avec l'Espérase et a permis de produire un hydrolysats avec un degré d'hydrolyse supérieur à celui de la Purafect. Ceci suggère une présence plus importante de protides de faible poids moléculaire dans les PFHE comparées aux PFHP.

Cette différence entre les deux cinétiques d'hydrolyse pourrait s'expliquer par plusieurs mécanismes. Notamment, la spécificité des enzymes vis-à-vis du substrat ; l'épuisement des sites accessibles pour l'enzyme ; la dénaturation des enzymes et/ou leur inhibition par les produits de l'hydrolyse [17]. Néanmoins, les deux courbes restent typiques aux profils d'hydrolyse des protéines de légumineuses ou celles d'autres végétaux [7, 18, 19].

Afin de confirmer l'étendu de l'hydrolyse des protéines, une électrophorèse de l'isolat et des hydrolysats de fenugrec, dans des conditions dénaturantes, a été réalisée. L'électrophorèse de l'IPF montre la présence de six bandes qui correspondent à de PM différents. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Hrčková *et al.*, [20], et Surówka *et al.*, [21], qui ont travaillé avec les hydrolysats de protéines de soja, qui rapportent qu'une électrophorèse dans des conditions dénaturantes d'isolats de protéines de légumineuses est caractérisée par la présence de cinq bandes correspondant aux sous unités α' , α et β - de la 7S globuline (β -conglycinine) et aux deux sous unités, acide et basique, de la 11S globuline (glycinine), et d'une bande de protides de faible poids moléculaire.

Lorsque l'IPF est hydrolysé avec la Purafect, la fraction β - de la sous-unité 7S (bande 3) n'a pas été complètement dégradée. En revanche, avec l'Espérase, toutes les fractions de la sous-unité 7S sont dégradées. Par ailleurs, la sous-unité 11 basique (bande 5) n'a pas été hydrolysée par les deux enzymes. Hrčková *et al.*, [20], et Surówka *et al.*, [21], rapportent que les fractions de la sous-unité 7S sont hautement

sensibles à l'action des enzymes protéolytiques, alors que la sous-unité 11S basique est caractérisée par sa résistance à la protéolyse ce qui rejoint les résultats de cette étude. Les résultats montrent également la présence d'une large bande dense au fond du gel après hydrolyse des protéines. Cette bande aurait probablement résulté de la diminution du PM des protides et leur accumulation à la base du gel. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans les travaux de Hrčková *et al.*, [20], et Surówka *et al.*, [21]. Le degré d'hydrolyse peut renseigner sur la taille des protides. En effet, plus les liaisons peptidiques sont coupées, et plus le DH est élevé, et par conséquent la taille des protides diminue. De plus, la taille des protides représente un paramètre essentiel dans leur bioactivité [3]. Dans le but de confirmer cette relation taille-DH, un fractionnement par ultrafiltrations successives a été réalisé, afin de quantifier les proportions de peptides de petite taille. Les résultats montrent que l'hydrolyse des protéines de fenugrec avec Espérase (DH=19%) produit plus de protides de petite taille et moins de protides de grande taille, comparé à la Purafect (9%).

D'après Chi *et al.* [22], l'activité antioxydante des hydrolysats dépend d'un certain nombre de paramètres dont le degré d'hydrolyse, sa composition et la séquence en acides aminés de ses peptides constitutifs.

Les résultats ont montré que les PFHE possèdent une activité inhibitrice du DPPH plus importante que celle des PFHP. Ces résultats rejoignent ceux de Sbroggio *et al.* [7], qui rapportent que l'activité antioxydante dépend du degré d'hydrolyse et de la spécificité d'enzyme. En effet, l'hydrolyse pourrait faire apparaître des peptides avec de nouvelles extrémités portant des acides aminés antioxydants et des fonctions libres, qui diffèrent selon l'enzyme utilisée, et pouvant interagir avec les radicaux libres [23].

Nous nous sommes ainsi proposé d'étudier l'activité antioxydante des différentes fractions des hydrolysats de fenugrec afin d'identifier la ou les fractions les plus actives. Après fractionnement, les résultats ont montré que l'activité antioxydante varie d'une fraction à une autre. Cependant, nous n'avons pas trouvé de relation entre la taille et l'activité antioxydante des fractions, au moins pour les tests anti-DPPH et FRAP. En revanche, pour le même PM, l'activité antioxydante diffère selon l'enzyme utilisée. Ces observations démontrent que l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la taille des protides, mais probablement aussi de d'autres critères, comme il a été rapporté par Lemes *et al.* [1].

Ces observations sont en accord avec d'autres travaux [24, 25]. Mundi et Aluko, [25], suggèrent que l'activité antioxydante dépend plus de l'hydrophobicité des acides aminés et des peptides que de leur taille. Par ailleurs, Maestri *et al.*, [26], ont démontré qu'en plus de la taille des peptides, l'activité antioxydante des hydrolysats de soja dépend également de leur composition en acides aminés et de leur position dans la séquence peptidique.

Cependant, les fractions des hydrolysats de fenugrec n'ont pas montré une différence importante de l'activité antioxydante comparées aux hydrolysats. Il apparaît donc que le fractionnement n'améliore pas l'activité antioxydante des hydrolysats des protéines de fenugrec.

Conclusion

Les protéines de fenugrec hydrolysées avec la Purafect et l'Espérase possèdent des propriétés antioxydantes importantes. Par ailleurs, les protéines de fenugrec hydrolysées avec Espérase ont montré un meilleur potentiel antioxydant, comparées à celles hydrolysées avec Purafect, probablement en raison du degré d'hydrolyse élevé et/ou de la nature des peptides libérés par cette enzyme. En revanche, l'activité antioxydante des hydrolysats n'est pas améliorée après leur fractionnement.

Conflits d'intérêt

Aucun conflit d'intérêt.

Références

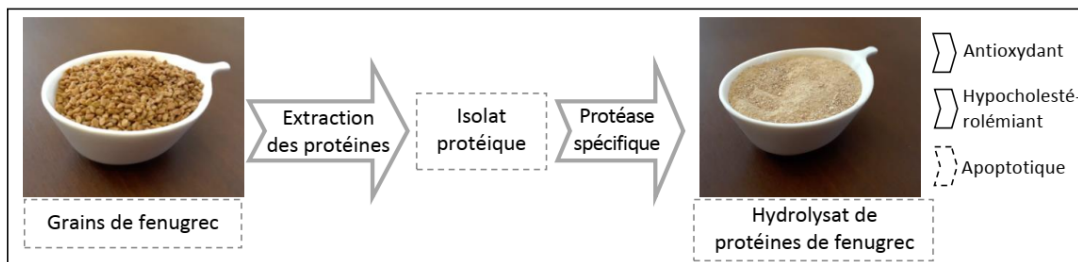
1. Lemes AC., Sala L., Ores JC., Braga ARC., Egea MB., Fernandes KF. A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *Int J Mol Sci* 2016;17:950-73.
2. Yust MdM., Millán-Linares MdC., Alcaide-Hidalgo JM., Millán F., Pedroche J. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *J Sci Food Agric* 2012;92(9):1994-2001.
3. Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. In: Toldrá F, editor. *Advances in Food and Nutrition Research*: Academic Press; 2017, p. 109-59.
4. Gao C., Sun R., Xie YR., Jiang AL., Lin M., Li M., Chen ZW., Zhang P., Jin H., Feng JP. The soy-derived peptide Vglycin inhibits the growth of colon cancer cells in vitro and in vivo. *Exp Biol Med* 2017;242(10):1034-43.
5. Ruiz-Ruiz JC., Betancur-Ancona DA., Segura-Campos MR. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutr Hosp* 2014;29(4):776-84.
6. Setti K., Kachouri F., Hamdi M. Improvement of the antioxidant activity of fenugreek protein isolates by *Lactococcus lactis* Fermentation. *Int J Pept Res Ther* 2017;24(4):499-509.
7. Sbroggio MF., Montilha MS., de Figueiredo VRG., Georgetti SR., Kurozawa LE. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Sci Technol* 2016;36(2):375-81.
8. Abu-Salem FM., Mahmoud MH., El-Kalyoubi MH., Gibriel AY., Abou-Arab AA. Characterization of antioxidant peptides of soybean protein hydrolysate. *Int J Biol Vet Agric Food Eng* 2013;7(7):238-42.
9. Amza T., Balla A., Tounkara F., Man L., Zhou HM. Effect of hydrolysis time on Nutral, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *Int Food Res J* 2013;20(5):2081-90.
10. Nwachukwu ID., Aluko ER. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *J Food Biochem* 2019;43:e12761.
11. Zou TB., He TP., Li H-B., Tang HW., Xia EQ. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Mol* 2016;21(1):72-85.
12. Boye JL., Aksay S., Roufik S., Ribéreau S., Mondor M., Farnworth E., Rajamohamed SH.. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res Int* 2010;43:537-46.
13. Adler-Nissen J. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolases. *J Chem Tech Biotechnol* 1982;32:138-56.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat* 1970;227:680-5.
15. Jridi M., Lassoued I., Nasri R., Ayadi MA., Nasri M., Souissi N. Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by

- different microbial proteases. *BioMed Res Int* 2014; <http://dx.doi.org/10.1155/2014/461728>.
16. Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 1986;44:307-15.
17. Guerard F., Guimas L., Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B Enzym* 2002;19(20):489-98.
18. León-Espinosa EB., Sánchez-Chino X., Garduño-Siciliano L., Álvarez-González RI., Dávila-Ortiz G., Madrigal-Bujaidar E., Téllez-Medina DI., Jiménez-Martínez C. Hypocholesterolemic and anticarcinogenic effect of *Vicia faba* protein hydrolysates. *Nutr Cancer* 2016;68(5):856-64.
19. Zhao Q., Xiong H., Selomulya C., Chen XD., Zhong H., Wang S., Sun W., Zhou Q. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chem* 2012;134:1360-7.
20. Hřčková M., Rusňáková M., Zemanovič J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech J Food Sci* 2002(20):7-14.
21. Surówka K., Żmudziński D., Surówka J. Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends Food Sci Technol* 2004;15:153-60.
22. Chi CF., Hu FY., Wang B., Li ZR., Luo HY. Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Mar Drugs* 2015;13:2580-601.
23. Das R., Bhattacharjee C. In vitro evaluation of antioxidant activity and radical scavenging activity of sesame bioactive peptides. *Int J Emerg Technol Adv Eng* 2013;3(11):521-7.
24. He R., Girgih AT., Malomo SA., Ju X., Aluko RE. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J Funct Foods* 2013;5:219-27.
25. Mundi S., Aluko RE. Inhibitory properties of kidney bean protein hydrolysate and its membrane fractions against renin, angiotensin converting enzyme, and free radicals. *Austin J Nutr Food Sci* 2014;2(1):1008-18.
26. Maestri E., Pavlicevic M., Montorsi M., Marmioli N. Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2018;18(1):3-30.

Salon National des Produits de la Recherche
Palais des Expositions, la SAFEX, Alger, les 2-3-4 Juillet 2018

Intitulé du produit :

Hydrolysats de protéines de fenugrec (hypocholestérolémiant et antioxydant)



Objectif du produit et utilité :

Le fenugrec est une légumineuse riche en protéines (environ 28%), généralement utilisée comme épice, aliment de bétail, ainsi qu'à des fins thérapeutiques. Les protéines de cette légumineuse peuvent constituer une source potentielle de peptides bioactifs. Parmi les applications des peptides bioactifs d'origine alimentaire, on a choisi de mettre en valeur les propriétés hypocholestérolémiantes, antioxydantes et apoptotiques d'un hydrolysats de protéines de fenugrec, moyennant une protéase spécifique, pour atteindre les objectifs suivants :

- Elaboration d'un aliment fonctionnel ou nutraceutique offrant ainsi de nouvelles applications thérapeutiques dans la prévention contre certaines maladies chroniques comme les MCV et les cancers.
- Dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, il peut être utilisé comme antioxydant naturel pour préserver la qualité nutritionnelle et organoleptique au cours des procédés de transformation.
- Il peut avoir aussi un intérêt dans la valorisation de cette légumineuse en un produit alimentaire intermédiaire à haute valeur ajoutée.

Domaine(s) d'application & utilisateurs potentiels :

- 1) Dans le domaine de la santé : Comme complément nutraceutique dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires ou des cancers colorectaux (industrie parapharmaceutique et agroalimentaire).
- 2) Dans l'agroalimentaire : Comme antioxydant naturel dans les produits alimentaires transformés (industries agroalimentaires).

Dans quel cadre ce produit a-t-il été développé

Ce produit a été développé et testé dans un projet de thèse de doctorat, par l'équipe « Protéines et Peptides Bioactifs (PPB) », Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique, Université Oran1.

Présentation du produit : ALLAOUI Amine, BOUALGA Ahmed, NASRI Moncef, OSADA Jésus.

Contact : Pr. BOUALGA Ahmed, Chef d'équipe « PPB », Université Oran1, tél : 0772599943, email : boualga.ahmed@univ-oran.dz.

Abstract

Fenugreek proteins (FP) and two of their hydrolysates (PFPH for Purafect-FP hydrolysate and EFPH for Esperase-FP hydrolysate) were assessed, in this study, for their antioxidant and hypocholesterolemic properties. EFPH and PFPH degrees of hydrolysis (DH) were 19% and 9%, respectively. The physicochemical analysis of FP and their hydrolysates showed a high nitrogen contents which increased with the increased DH. The fenugreek products were then assayed for their *in vitro* antioxidant properties. The results also showed that the antioxidant activity of FP is dose dependant. Moreover, PFPH, and especially EFPH, exhibited higher diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, ferric reducing (FRAP), β -carotene bleaching inhibition and DNA nicking inhibition activities, when compared to FP. In the aim to evaluate the *in vivo* hypocholesterolemic and antioxidant potential of FP and their hydrolysates, thirty (30) male Wistar rats (184 ± 7 g) were used as model. The rats, randomized into four groups of six each, were fed for 4 weeks a hypercholesterolemic (HC) diet and were given either casein (HC group), FP, PFPH or EFPH, by gavage ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ body weight). A fifth group, taken as control (C), received the same diet without cholesterol. Results showed that the elevated aspartate aminotransferase activity in HC group was significantly corrected by FP and EFPH administration (-33%). Serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) decreased by 53% and 20%, respectively, in FP treated rats compared to HC group. This decrease was associated with a high faecal cholesterol excretion (2.5-fold higher in FP vs. HC). Likewise, EFPH treated rats exhibited lower serum TC levels compared to HC rats. VLDL were the main affected lipoproteins in these two groups. Besides, there were no significant difference in apolipoproteins (Apo) B, A-I and A-IV between the different groups, with the exception of Apo A-IV which decreased by 20% in FP group compared to HC. On the other hand, the elevated liver lipids, TC and TG contents in HC group were not affected by FP and EFPH. Nevertheless, liver TG contents trended to decrease in FP rats vs. HC ($P=0.07$), while they were significantly reduced in the groups fed proteins hydrolysates. FP and EFPH also decreased aortic TC contents. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels in heart and liver were not affected by HC. Whereas, in aorta, they were 1.7-fold higher in HC vs. C group. In FP group, aorta TBARS contents decreased significantly by 33% compared to HC. In heart and liver, TBARS were lower in EFPH rats vs. HC (-15% and -55% , respectively). HDL of rats treated with protein hydrolysates showed a better protection against lipoproteins oxidation, compared to those of HC rats. Furthermore, rats treated with PFPH or EFPH exhibited an enhanced paraoxonase activity, as well as an increase in liver and heart thiols contents, when compared to non-treated HC group. Tissues antioxidant enzymes analysis showed that cardiac catalase activity was enhanced by 31% in EFPH compared to HC group. Whereas, FP improved both superoxide dismutase and catalase activities in aorta. The activities were, respectively, 1.7- and 1.5-fold higher in FP vs. HC. In conclusion, fenugreek proteins possess antioxidant property which is improved after their hydrolysis, especially by Esperase. However, the hypocholesterolemic effect doesn't seem to be improved after the protein hydrolysis. FP and EFPH could be used as nutraceutical in cardiovascular disease management.

Keywords: Fenugreek, proteins, hydrolysate, *in vitro*, rat, liver, HDL, heart, aorta, nutraceutic.

في هذه الدراسة، تم إبراز بعض خصائص بروتينات الحلبة (ب.ج) كمضادة للأكسدة واختلال الأيض الدهني، وكذا دراسة ما إذا كان تحللها بواسطة إنزيمي الإسيبراس (ب.م.إ) والبورافيكيت (ب.م.ب) يحسن هذه الخصائص. أظهرت نتائج تحليل مكونات المستخلص البروتيني للحلبة أن محتواها من البروتينات يقارب 80%، في حين أن هذه النسبة تزيد بعد تحلل البروتينات لتصل إلى 90% و 93% في "ب.م.ب" و "ب.م.إ"، على التوالي، متوافقاً بذلك مع درجة تحلل "ب.ج". بينت النتائج، أيضاً، أن "ب.ج" أبدت فعالية في تثبيط DPPH، إرجاع الحديد الثلاثي (Fe^{3+})، منع أكسدة البيتا كاروتين وكذا حماية DNA من الأكسدة. كما لوحظ أيضاً أن تحلل البروتينات، وبالأخص بواسطة الإسيبراس، يحسن هاته الخواص. إهتمت هذه الدراسة أيضاً بتجريب البروتينات، المنحلة أو لا، على جرذان ويستار (7 ± 184 غ)، تتناول غذاء غني بالكولسترول ومقسمة إلى أربع مجموعات بحيث تضم كل واحدة منها 6 جرذان. تتلقى كل مجموعة يومياً، ولمدة 28 يوم، إما كزيب الحليب (مجموعة ك)، "ب.ج"، "ب.م.ب" أو "ب.م.إ"، بكمية 1 غ.كغ⁻¹ من وزن الجرذ، إضافة إلى مجموعة خامسة (مرجعية: م) تتناول غذاء بدون كولسترول. أوضحت النتائج أن الغذاء الغني بالكولسترول رفع مستويات الكولسترول وثلاثي الغليسريد على مستوى الكبد والدم بالمقارنة مع المجموعة "م". لدى الفئران التي تلقت "ب.ج"، لوحظ أن تركيز الكولسترول وثلاثي الغليسريد في الدم انخفض بـ 53% و 20%، على التوالي، كان ذلك مرفقاً بطرح كبير للكولسترول عن طريق الفضلات مقارنة مع المجموعة "ك". من جهة أخرى، عند الجرذان "ب.م.إ"، مستوى الكولسترول في الدم كان 1.5 مرة أقل من المستوى المسجل عند الجرذان "ك". البروتينات الدهنية الجذ منخفضة الكثافة (VLDL) كانت الأكثر تأثراً بهذه التغيرات بحيث أن محتواها من الكولسترول انخفض لدى المجموعتين "ب.ج" و "ب.م.إ" في مقابل "ك". تحليل قياس البروتينات AI، B، AIV المرتبطة بالبروتينات الدهنية لم تظهر أي تباين بين مختلف المجموعات، باستثناء التركيز المنخفض للبروتين AIV عند المجموعة "ب.ج" (-20%) مقارنة مع المجموعة "ك". تم أيضاً ملاحظة أن مع "ب.ج"، وبصفة أفضل مع "ب.م.إ" و "ب.م.ب"، نقص محتوى الكبد من الغليسريدات بـ 28% بالمقارنة مع المجموعة "ك". في الشريان الأبهر، خفضت "ب.ج" و "ب.م.إ" تركيز الكولسترول. تطرقت هذه الدراسة بعد ذلك إلى تأثير بروتينات الحلبة، قبل وبعد تحللها، على مستويات الأكسدة عند الجرذان، وقد بينت النتائج أن المواد المتفاعلة مع حمض الثيوباربيتيريك (TBARS) كانت أقل تركيزاً على مستوى الكبد (-55%) والقلب (-15%) عند المجموعة "ب.م.إ" بالمقارنة مع نظيرتها "ك"، في حين أن الجرذان "ب.ج" أظهروا أقل مستويات TBARS على مستوى الشريان الأبهر (-33% مقابل "ك"). كما أن تناول بروتينات الحلبة المنحلة حسن فعالية HDL ضد الأكسدة، وكذا نشاط البراكسوناز (PON1) بالمقارنة مع المجموعة "ك". يبدو أيضاً أن بروتينات الحلبة المنحلة بالإسيبراس حسنت نشاط إنزيم الكاتالاس (catalase) (+31%) على مستوى القلب، في حين أن "ب.ج" رفعت نشاط إنزيمات الكاتالاس و SOD على مستوى الشريان الأبهر بـ 1.5 و 1.7 مرة أكثر، على التوالي، مقارنة مع الجرذان "ك". كخلاصة، فإن بروتينات الحلبة أظهرت فعالية في تخفيض مستويات الكولسترول في الدم كما أنها تتمتع بخاصية مضادة للأكسدة. الظاهر أيضاً أن تحليل هاته البروتينات إنزيمياً يحسن فعاليتها المضادة للأكسدة، الأمر الذي لا ينطبق على خاصيتها في تعديل الكولسترول. في الأخير، يمكن إدخال بروتينات الحلبة، المنحلة أو لا، في تطبيقات غذائية للحد من ارتفاع الكولسترول خاصة، واختلال الأيض الدهني عامة، وكذا استعمالها كمضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: الحلبة، بروتينات منحلة، جرد، الكبد، ليبوبروتينات، القلب، الشريان الأبهر.

Résumé

Cette étude a comme objectif d'évaluer les propriétés bioactives des protéines de fenugrec, et de voir si leur hydrolyse améliore leur bioactivité. Ce travail est réparti en deux grandes parties pour permettre l'étude de ces propriétés *in vitro* et *in vivo*. D'abord, l'isolat de protéines (IPF) est obtenu à partir de grains de fenugrec par précipitation au point isoélectrique. Ensuite, cet isolat protéique est hydrolysé par deux enzymes différentes pour obtenir les protéines de fenugrec hydrolysées avec la Purafect (PFHP) ou l'Espérase (PFHE), avec des degrés d'hydrolyse de 9% et 19%, respectivement. L'analyse physico-chimique montre que la pureté de l'isolat en protéines a augmenté après hydrolyse. Ensuite, les propriétés antioxydantes des protéines de fenugrec, hydrolysées ou non, sont étudiées *in vitro*. Les résultats ont montré que l'IPF possède une activité inhibitrice du radical diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) et de la décoloration du β -carotène, et un pouvoir réducteur (FRAP) importants. De plus, l'IPF a protégé contre l'oxydation de l'ADN. Après hydrolyse, ces propriétés sont améliorées, particulièrement avec les PFHE. L'IPF et ses hydrolysats ont été évalués, après, pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes. A cet effet, trente rats Wistar mâles (184 ± 7 g) sont randomisés en cinq groupes de six. Quatre groupes consomment un régime hypercholestérolémiant et reçoivent, pendant quatre semaines par gavage, 1 g.kg^{-1} de poids corporel de la caséine (groupe HC), d'IPF, de PFHP ou de PFHE. Un cinquième groupe est pris comme témoin (T) et consomme un régime sans cholestérol et reçoit par gavage la caséine. A la fin de l'expérimentation, les lipides hépatiques et sériques, en particulier le cholestérol total (CT) et les triglycérides (TG), ont significativement augmenté chez les rats HC vs. T. L'apport en IPF et en PFHE a diminué de 33% l'activité aspartate aminotransférase (ASAT) sérique, comparée aux valeurs HC. De même, la cholestérolémie est 2,1- et 1,5-fois plus faible respectivement chez les groupes IPF et PFHE comparés au groupe HC. Ce sont les VLDL qui sont les plus affectées par cette diminution du CT. L'IPF a également augmenté de 2,6-fois l'excrétion fécale du cholestérol, par rapport aux rats HC. De plus, la triglycéridémie des rats HC est diminuée de 1,3-fois après l'apport en IPF. Les teneurs sériques en apolipoprotéine AIV ont diminué de 20% chez le groupe IPF vs. HC. L'IPF et les PFHE ont également diminué les TG hépatiques, ainsi que le CT aortique. L'apport en PFHP ne semble pas corriger les paramètres lipidiques chez les rats HC. Les propriétés antioxydantes des protéines et de leurs hydrolysats ont été aussi analysées chez les rats. Le régime HC a principalement augmenté les teneurs de l'aorte en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), alors que chez les rats traités avec IPF, ces teneurs ont diminué de 33%, comparées à celles du groupe HC. En revanche, les teneurs du foie et du cœur en TBARS ont significativement diminué chez le groupe PFHE vs. HC. Les rats PFHE et PFHP ont également montré une augmentation de l'activité paraoxonase sérique, de la capacité antioxydante des HDL et des teneurs hépatiques et cardiaques en thiols, comparés aux rats HC. Enfin, par rapport au groupe HC, l'apport en IPF a augmenté les activités catalase et superoxyde dismutase au niveau de l'aorte, alors que l'apport en PFHE a augmenté l'activité catalase au niveau du cœur. En conclusion, l'IPF et les PFHE possèdent des propriétés antioxydantes et hypocholestérolémiantes, ce qui permet leur utilisation comme aliments nutraceutiques dans la prévention cardiovasculaire. Par ailleurs, l'hydrolyse des protéines de fenugrec améliore leurs propriétés antioxydantes mais pas leurs propriétés hypocholestérolémiantes.

Mots clés : Protéines, fenugrec, hydrolysats, *in vitro*, rat, foie, HDL, cœur, aorte, nutraceutique.

RESUME

Le but de l'étude est d'évaluer les propriétés bioactives d'un isolat de protéines de fenugrec (IPF) et d'étudier l'effet de son hydrolyse avec Purafect (PFHP) ou Espérase (PFHE) sur ses bioactivités. Dans une première partie de l'étude, les résultats ont montré que les protéines de fenugrec présentent des propriétés antioxydantes *in vitro* et que ces propriétés sont améliorées après hydrolyse. Dans la seconde partie de cette étude, IPF et ses hydrolysats ont été évalués pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes. A cet effet, quatre groupes de rats mâles Wistar sont soumis à un régime hypercholestérolémiant et reçoivent, pendant quatre semaines par gavage, 200mg de caséine, d'IPF, de PFHP ou de PFHE. Un cinquième groupe consommant un régime sans cholestérol est pris comme témoin. Le traitement avec IPF et PFHE a amélioré le profil des lipides en diminuant les teneurs en cholestérol sériques et des VLDL, ainsi que celles des triglycérides hépatiques, et du cholestérol aortique. Les propriétés antioxydantes des protéines et de leurs hydrolysats ont été également analysées chez le rat. IPF a diminué les teneurs de l'aorte en substances réactives à l'acide thiobarbiturique, alors que PFHE ont diminué ces teneurs dans le foie et le cœur. PFHE et PFHP ont également augmenté l'activité paraoxonase sérique, la capacité antioxydante des HDL et les teneurs hépatiques et cardiaques en thiols. Enfin, l'apport en IPF a augmenté les activités catalase et superoxyde dismutase au niveau de l'aorte, alors que l'apport en PFHE a augmenté l'activité catalase au niveau du cœur. En conclusion, IPF et PFHE possèdent des propriétés antioxydantes et hypocholestérolémiantes, ce qui permet leur utilisation comme aliments nutraceutiques. Par ailleurs, l'hydrolyse des protéines de fenugrec améliore leurs propriétés antioxydantes mais pas leurs propriétés hypocholestérolémiantes.

Mots clés :

Protéines; Fenugrec hydrolysats; In vitro; Rat; Foie; HDL; Cœur; Aorte; Nutraceutique.