

Composés bioactifs

Effets de deux hydrolysats de protéines de poisson (*Sardina pilchardus* et *Sardinella aurita*) sur le transport inverse du cholestérol et le statut redox, chez le rat soumis à un régime enrichi en cholestérol

Effects of two fish protein hydrolysates (*Sardina pilchardus* and *Sardinella aurita*) on reverse cholesterol transport and redox status, in rat fed a cholesterol-enriched diet

Nora Athmani ^{1*}, Faiza Dehiba ¹, Amine Allaoui ¹, Ahmed Barkia ², Ali Bougatef ², Myriem Y Lamri-Senhadji ¹, Moncef Nasri ², Ahmed Boualga ¹

¹Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran1 Ahmed Ben Bella, 31000 Oran, Algérie

²Laboratoire de Génie Enzymatique et Microbiologique, Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax, Tunisie

Reçu le 10 juillet 2016, Révisé le 09 octobre 2016, Accepté le 14 décembre 2016.

*Auteur correspondant : nora.athmani@yahoo.fr

Résumé Introduction. Plusieurs travaux ont rapporté que les peptides marins possèdent une action antioxydante. Cependant, peu d'études se sont focalisées sur leur effet hypocholestérolémiant. **Objectif.** Le but de ce travail est d'évaluer les effets des hydrolysats de protéines de sardine (*Sardina pilchardus*) et de sardinelle (*Sardinella aurita*) sur le transport inverse du cholestérol et le statut antioxydant, chez le rat soumis à un régime enrichi en cholestérol. **Matériel et Méthodes.** Dix huit rats mâles Wistar pesant 350±15g sont répartis en 3 groupes homogènes et sont soumis à un régime à 20% de caséine et 1% de cholestérol pendant 15 jours. Durant cette période, deux groupes reçoivent par gavage une solution d'hydrolysats de protéines de sardine (HPS) ou de sardinelle (HPA). Le 3^{ème} groupe reçoit de l'eau (GC). **Résultats.** La cholestérolémie est 1,7-fois plus faible chez les groupes consommant les hydrolysats. L'activité de la lécithine: cholestérol acyltransférase (LCAT) est respectivement 1,7- et 1,6-fois plus élevée chez HPS et HPA. Les teneurs en phospholipides des lipoprotéines de haute densité (PL-HDL₃) sont 1,4-fois plus faibles chez HPS vs GC. Les valeurs des esters de cholestérol des HDL₂ (EC-HDL₂) sont 1,7- et 1,5-fois plus élevées chez HPS et HPA, respectivement. Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) du foie et du muscle sont réduites de 68% et 29% chez HPS, et de 48,5% et 63,6% chez HPA. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) du foie et du muscle est respectivement augmentée de 32% et 78%, chez HPA. **Conclusion.** Les HPS et HPA semblent agir

de façon favorable sur le transport inverse du cholestérol et atténuent le stress oxydant, chez le rat consommant un régime enrichi en cholestérol.

Mots-Clés: *Cholestérolémie, Hydrolysats, Sardine, Sardinelle, LCAT, Statut antioxydant*

Abstract Introduction. Several studies have reported that marine peptides have antioxidant effect. However, few studies have focused on their cholesterol-lowering effect. **Objective.** The purpose of this study was to evaluate the effects of sardine (*Sardina pilchardus*) and sardinelle (*Sardinella aurita*) protein hydrolysates on reverse cholesterol transport, and antioxidant status, in rat fed a cholesterol-enriched diet. **Materials and methods.** Eighteen male Wistar rats (350±15g) were divided into three groups, and fed 20% casein and 1% cholesterol for 15 days. During this period, two groups received by gavage sardine protein hydrolysates (HPS) or sardinelle (*Sardinella aurita*) (HPA) solution. The 3rd group received water (GC). **Results.** Cholesterolemia was 1.7-fold lower in hydrolysates fed groups. The lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) activity was respectively, 1.7- and 1.6-fold higher in HPS and HPA groups. Phospholipids values of high density lipoprotein (PL-HDL₃) were 1.4-fold lower in HPS compared with GC group. Cholesteryl esters amounts of HDL₂ (CE-HDL₂) were respectively, 1.7- and 1.5-fold higher in HPS and HPA groups. Liver and muscle thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were respectively reduced by 68% and 29% in HPS and 48.5% and 63.6% in HPA group. Superoxide dismutase (SOD) activity was increased by 32% in liver and 78% in muscle of HPA. **Conclusion.** It seems that HPS and HPA act favorably on reverse cholesterol transport, and improve oxidative stress, in rat fed cholesterol- enriched diet.

Keywords: *Cholesterolemia, Hydrolysates, Sardine, Sardinelle, LCAT, Antioxydant status*

Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) comme l'athérosclérose, l'infarctus de myocarde sont des problèmes de santé publique dans le monde entier. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé [1], les MCV représentent la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde. Plusieurs facteurs de risque interviennent dans le déclenchement de ces MCV, comme la dyslipidémie, l'augmentation de la pression artérielle, l'obésité, et l'insulino-résistance [2]. L'hypercholestérolémie est le principal facteur de risque des MCV, en particulier l'athérosclérose [3], une maladie silencieuse d'évolution lente [4]. Au cours de ces dernières années, il a été confirmé que le stress oxydatif est un facteur dominant du risque de MCV [5]. Il induit en association avec l'hypercholestérolémie,

une augmentation de la production des radicaux libres [5], impliquée dans le déclenchement du processus athéromateux [6]. Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et la capacité antioxydante de l'organisme [7].

Les organismes marins qui constituent approximativement la moitié de la biodiversité globale, représentent des réservoirs riches en divers composants biofonctionnels, en particulier de nature protéique [8]. En effet, certains organismes marins constituent un matériel protéique idéal pour la production des peptides bioactifs [9]. Plusieurs études ont montré l'effet hypotensif [10], antioxydatif et immuno-modulateur des hydrolysats de protéines de poisson. Peu d'études se sont focalisées sur l'effet hypocholestérolémiant des hydrolysats de poisson [4]. Des études

expérimentales ont montré chez le rat Wistar, que la consommation des hydrolysats de protéines de poisson est associée à une diminution du cholestérol plasmatique avec une augmentation importante du C-HDL [11]. De plus, Hosomi *et al.* [12] ont rapporté que les hydrolysats de protéines de poisson inhibent efficacement l'absorption du cholestérol et des acides biliaires. En effet, Ben khaled *et al.* [13] ont montré dans une étude réalisée *in vivo* que les hydrolysats de sardinelle ont un effet hypolipémiant.

Le mécanisme exact expliquant l'activité antioxydante des peptides bioactifs n'est pas bien établi. Toutefois, certaines études ont montré que les hydrolysats et les peptides peuvent jouer le rôle de piègeur des radicaux libres [14]. Récemment, il a été rapporté que certains hydrolysats de protéines extraits de différentes sources possèdent des activités antioxydantes remarquables, les plus connus sont les peptides à activité antioxydante isolés à partir du poisson. En effet, Wang *et al.* [15] ont rapporté que les hydrolysats extraits des moules bleues (*Mytilus edulis*) possèdent un peptide bioactif avec une haute activité antioxydante du radical hydroxyle et de l'anion superoxyde. De plus, l'effet antioxydant des hydrolysats de protéines de sardinelle a été testé chez le rat par d'autres auteurs [13] qui ont montré que ces hydrolysats possédaient un excellent effet antioxydant en diminuant la peroxydation lipidique et en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes. Dans cette étude, le choix de la sardine (*Sardina pilchardus*) et sardinelle (*Sardinella aurita*) est justifié par le faible coût et la forte consommation de ces deux poissons en Méditerranée, en particulier en Algérie.

Matériel et Méthodes

Extraction et purification des protéines de la sardine et de la sardinelle

Les protéines de poisson ont été isolées à partir du muscle de la sardine fraîche et de la sardinelle, obtenues à partir d'un marché de poissons local. La purification des protéines a été réalisée selon la technique de Guillaume *et al.* [16] comme détaillée précédemment par Louala *et al.* [17]. Le degré de pureté des protéines a été estimé par un

dosage d'azote (N). La quantité de protéines purifiées est ensuite calculée ($N \times 6,25$) et représente 88%.

Préparation des hydrolysats de protéines de poisson et estimation du degré d'hydrolyse

Les protéines de sardine et de sardinelle sont solubilisées et homogénéisées dans un volume équivalent d'eau distillée (30%, P/V) pendant 2min, puis hydrolysées par l'Alcalase 2.4L (Novozyme, Denmark), dans des conditions optimales (pH 8,0 et à une température de 50°C), selon la méthode de Balti *et al.* [18]. L'enzyme est ajoutée à la réaction avec un rapport enzyme/substrat de 3U/mg. Durant la réaction, le pH du mélange est maintenu constant par l'ajout d'une solution de NaOH 4N. A un degré d'hydrolyse DH=8%, la réaction est stoppée par chauffage de l'homogénat à 80°C pendant 20min pour inactiver l'enzyme. Les hydrolysats de protéines de poisson sont obtenus par centrifugation du mélange réactionnel à 5000 x g pendant 20min, le surnageant est lyophilisé et les hydrolysats sont ensuite conservés à -20°C.

Animaux et régimes

Des rats mâles de souche Wistar (n=18, Institut Pasteur, Alger, Algérie), pesant 350±15g sont répartis en trois groupes de six rats chacun et sont soumis pendant 15 jours à un régime standard contenant 20% de caséine supplémenté avec 1% de cholestérol alimentaire et 0,5% d'acide cholique (Tableau I). Les animaux sont placés dans une animalerie où la température est maintenue à 22°C, avec un rythme circadien de 12h jour/12h nuit et une hygrométrie constante de 60%. L'eau et la nourriture sous forme de poudre sont données *ad libitum*. Les conseils pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire sont suivis [19].

Trois mL d'eau distillée sont administrés quotidiennement au groupe contrôle (GC) par gavage à l'aide d'une sonde (Eickemeyer, DE). Les deux autres groupes ont été traités respectivement avec 3mL (100 mg/mL) d'hydrolysats de protéines de sardine (HPS) et de sardinelle (HPA).

Prélèvement du sang et des organes

Au 15^{ème} jour de l'expérimentation, après 12 heures de jeûne, les rats sont pesés puis anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution de chloral (10%) à raison de 3mL.kg⁻¹ de poids corporel. Le sang est prélevé par ponction de l'aorte abdominale, recueilli dans des tubes secs et centrifugé à 1000 x g pendant 20 min à 4°C. Le sérum est conservé à -20°C avec de l'EDTA-Na₂ à 0,1% (P/V). Le foie et le muscle gastrocnémien sont prélevés, rincés avec une solution glacée de NaCl à 0,9%, séchés, pesés et conservés à -70°C.

Analyse des lipides et des protéines du sérum et des lipoprotéines

La technique utilisée pour la séparation et la caractérisation des fractions de lipoprotéines sériques a été précédemment détaillée par Bouderbala *et al.* [20]. Les VLDL et les LDL-HDL₁ sont isolés par précipitation du chlorure de magnésium à 2 M et du phosphotungstate de sodium (pH=7,6) (Sigma-Aldrich Chimie, Allemagne) selon le procédé de Burstein *et al.* [21]. Les HDL₂ et les HDL₃ ont été séparées par précipitation selon le procédé de Burstein *et al.* [22] en utilisant le MgCl₂ et le sulfate de dextran PM 500 000 (Sigma-Aldrich Chimie, Allemagne).

Les concentrations en cholestérol total (CT) ont été mesurées par méthode enzymatique colorimétrique (kit CHOD-POD, Spinreact, Espagne). Les teneurs en cholestérol libre (CL) sont déterminées par méthode enzymatique colorimétrique (Kit CHOD-PAP, Biolabo SA, Maïzy, France). Le cholestérol estérifié (CE) est obtenu par différence entre le CT et le CL puis multiplié par 1,67 (poids moléculaire moyen d'un acide gras qui estérifie le cholestérol) pour calculer les EC. Le dosage des PL est réalisé par méthode enzymatique colorimétrique (Kit CHO-POD, Cypress Diagnostics, Belgique). Les teneurs en triglycérides (TG) sont déterminées par une méthode enzymatique colorimétrique (Kit GPO-POD, Spinreact, Espagne). Les teneurs en protéines du sérum, des lipoprotéines et des tissus ont été estimées selon la méthode de Lowry *et al.* [23], en utilisant la sérum albumine bovine comme standard.

Tableau I. Composition des régimes en g/kg de régime¹.

Ingrédients	g/kg de régime
Caséine ²	200
Méthionine ³	3
Amidon de maïs ⁴	532
Saccharose ⁵	40
Huile de tournesol ⁶	100
Cellulose ⁷	50
Mélange vitaminique ⁸	20
Mélange minéral ⁹	40
Cholestérol ¹⁰	10
Acide cholique ¹¹	5

¹Le régime est donné sous forme de poudre préparé au niveau du Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique (LNCM).²Prolabo-Paris France.^{3,10,11}Sigma-Aldrich, Allemagne. ⁴ONAB, Sidi Bel Abbes, Algérie.⁵Sucre cristallisé, ENASUCRE, Stisef, Algérie.⁶Produit de commerce : Huile de tournesol (13% AGS, 22% AGMI, 65% AGPI avec 65% oméga 6), Cevital, SPA, Bejaia.⁷Prolabo-Paris, France.⁸UAR 200 (Villemoisson, 91360, Epinay, S/Orge, France), Mélange vitaminique (mg/kg de régime): Vit A, 39600UI; Vit D3, 5000UI; Vit B1, 40; Vit B2, 30; Vit B3, 140; Vit B6, 20; Vit B7, 300; Vit B12, 0,1; Vit C, 1600; Vit E, 340; Vit K3,80; Vit PP, 200; Choline, 2720; Acide folique, 10; Acide PAB, 100; Biotine, 0,6.⁹UAR 205B (Villemoisson, 91360, Epinay, S/Orge, France), Mélange minéral (mg/kg de régime) CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO₂, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄, 7H₂O, 200; MnSO₄, H₂O, 98; CuSO₄, 5H₂O, 20; ZnSO₄, 7H₂O, 80; CuSO₄, 7H₂O; KI, 0,32.

Mesure de l'activité de la lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT, EC 2. 3. 1. 43)

L'activité de la LCAT est déterminée selon la méthode endogène de Chen & Lacko [24], basée sur la disparition des molécules de CL qui sont transformées en CE sous l'action de la LCAT après 4 heures d'incubation à 37°C.

L'activité de la LCAT est exprimée en nanomoles de cholestérol estérifié. h⁻¹. mL⁻¹ de sérum. Elle est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité LCAT} = (\text{CL } t_0 - \text{CL } t_4) / 4 \text{ h d'incubation}$$

Evaluation du statut redox

Détermination de la peroxydation lipidique tissulaire

La peroxydation lipidique du foie et du muscle est réalisée par la mesure des TBARS selon la technique d'Ohkawa *et al.* [25]. Cent mg de tissu

sont broyés dans 0,9mL de KCl à 1,15%. Le milieu réactionnel contient 0,2mL d'homogénat tissulaire. Une solution de 0,2mL contenant du SDS à 8,1% et 1,5mL d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 1,5mL d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0,8% sont rajoutés, le volume final est ajusté avec 4mL d'eau distillée. Le mélange est ensuite vortexé pendant 30 secondes et chauffé à 95°C pendant 1 heure dans un bain marie. Un mL d'eau distillée et 5mL de butanol sont ensuite rajoutés. Les tubes sont agités et centrifugés à 1000xg pendant 10min. Les TBARS tissulaires sont estimés par spectrophotométrie à 532nm.

Détermination de la défense antioxydante enzymatique

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) est évaluée par la mesure de la dismutation de radicaux superoxydes générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine. L'activité SOD est exprimée en U/g de protéines (une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour la dismutation de 50% du radical superoxyde). L'activité de la glutathion réductase (GSSH-Red, EC 1.6.4.2) a été déterminée en mesurant l'oxydation du taux de NADPH en NADP⁺. Une unité d'enzyme réduit 1µmol de glutathion oxydé par minute à pH 7 à 25°C. L'activité de la glutathion peroxydase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) a été mesurée par une réaction couplée avec la glutathion réductase et le glutathion oxydé, produite lors de la réduction de l'hydroperoxyde par GSH-Px, est recyclé à l'état réduit par la glutathion réductase et le NADPH. Une unité de GSH-Px est définie comme l'oxydation par H₂O₂ de 1µmol de glutathion réduit par minute à pH 7 à

25°C. La vitesse de réaction a été déterminée à 340 nm en utilisant le coefficient d'extinction du NADPH 0.00622µM⁻¹. Une unité a été définie comme la quantité d'enzyme qui provoque l'oxydation de 1nmol de NADPH en NADP⁺ par minute à 25°C. Les différentes activités enzymatiques ont été déterminées à l'aide des kits (Cayman Chemical Company, MI).

L'activité de la catalase (CAT, EC1.11.1.6) a été mesurée dans le foie et le muscle selon la technique d'Aebi [26], procédé de mesure de la diminution linéaire de l'absorbance de l'eau oxygénée à 420nm. Deux cent cinquante µL de surnageant des homogénats de tissus (100mg /0,9ml de KCl) ont été ajoutés à 250µL de 30mmol de H₂O₂ préparés dans 50mmol de tampon phosphate à pH 7. Le mélange a été incubé pendant 5min; l'absorbance a été mesurée à 420nm et la concentration a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de H₂O₂ à 420nm de 39,4 M⁻¹.cm⁻¹. Une unité de catalase a été définie comme la dégradation de 1µmol de H₂O₂ par minute.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard (M±ES) de 6 rats par groupe. L'analyse statistique est effectuée par le Logiciel STATISTICA (Stat soft 97, version 4.1, Tulsa, OK, USA). Après analyse de variance, la comparaison des moyennes est réalisée par le test de rang multiple de Duncan (1955) [27]. Les moyennes portant des lettres (a, b, c) sont significativement différentes (P<0,05).

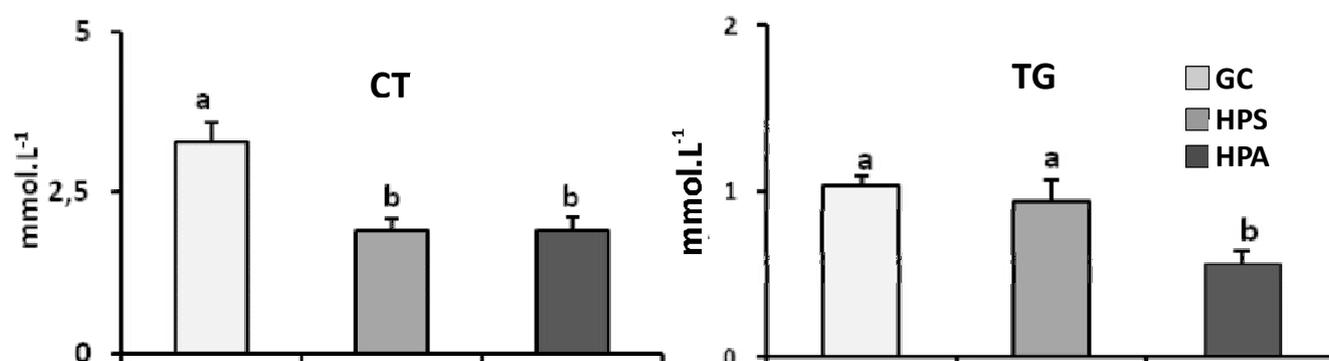


Fig. 1. Cholestérolémie et triglycéridémie

Chaque valeur représente la moyenne±ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test de rang multiple de Duncan (1955). Les moyennes portant des lettres différentes (a, b) sont significativement différentes (P<0,05). GC: Groupe témoin hypercholestérolémique non traité, HPS: Groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardine, HPA: Groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardinelle.

Résultats

Cholestérolémie et triglycéridémie

Les teneurs sériques en CT sont 1,7-fois plus faibles chez les rats traités HPS et HPA. Les concentrations en TG sont similaires chez les groupes HPS et GC, alors qu'elles sont 1,8-fois plus diminuées chez HPA par rapport au groupe GC (Fig. 1).

Activité de la lécithine: cholestérol acyltransférase

Après 15 jours de traitement, l'activité de la LCAT, est augmentée de 41 et 39% respectivement, chez les groupes HPS et HPA vs GC (Tableau II). Les teneurs en apolipoprotéines (apo) des HDL₃ sont

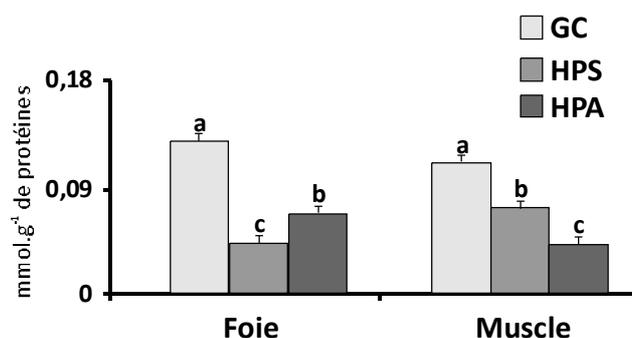


Fig. 2. Teneurs tissulaires en substances réactives à l'acide thiobarbiturique

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test de rang multiple de Duncan (1955). Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes ($P < 0,05$). GC: Groupe témoin hypercholestérolémique non traité, HPS: Groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardine, HPA: Groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardinelle.

Tableau II. Activité de la LCAT et teneurs en apo-HDL₃, CL-HDL₃, PL-HDL₃ et EC-HDL₂

	GC	HPS	HPA
LCAT (nmol.h ⁻¹ .mL ⁻¹ sérum)	69,14 \pm 7,80 ^b	118,04 \pm 11,34 ^a	113,48 \pm 11,27 ^a
Apo-HDL ₃ (g.L ⁻¹)	0,23 \pm 0,01 ^c	0,29 \pm 0,02 ^b	0,35 \pm 0,02 ^a
CL-HDL ₃ (mmol.L ⁻¹)	0,27 \pm 0,11 ^a	0,12 \pm 0,03 ^c	0,17 \pm 0,02 ^b
PL-HDL ₃ (mmol.L ⁻¹)	0,81 \pm 0,19 ^a	0,56 \pm 0,04 ^b	0,74 \pm 0,10 ^a
EC-HDL ₂ (mmol.L ⁻¹)	0,24 \pm 0,02 ^c	0,41 \pm 0,01 ^a	0,36 \pm 0,03 ^b

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test de rang multiple de Duncan (1955). Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes ($P < 0,05$). GC: Groupe témoin hypercholestérolémique non traité, HPS: Groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardine, HPA: Groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardinelle.

1,3- et 1,5-fois plus élevées respectivement, chez les groupes HPS et HPA par rapport au groupe GC. Cependant, les valeurs des PL-HDL₃ sont identiques chez les groupes HPA et GC, mais 1,4-fois plus faibles chez le groupe HPS. Une diminution significative des teneurs en CL-HDL₃ est notée chez les groupes HPS (-55%) et HPA (-37%) par rapport au groupe GC. Le contenu en EC-HDL₂ est augmenté de 41% et 33% respectivement, chez les groupes HPS et HPA comparé au groupe GC.

Teneurs tissulaires en substances réactives à l'acide thiobarbiturique

Au niveau du foie, le contenu en TBARS est diminué de 68% et 48,5% respectivement, chez les groupes HPS et HPA comparés au GC. De plus, au niveau du muscle gastrocnémien, les teneurs en TBARS sont

réduites de 29% et 63,6% respectivement, chez les groupes HPS et HPA vs GC (Fig 2).

Activités des enzymes antioxydantes

L'activité de la SOD est élevée respectivement, de 23% et 32% au niveau du foie et de 29% et 78% au niveau du muscle, chez les groupes HPS et HPA vs GC. L'activité de la GSH-Px du foie est similaire chez les groupes traités avec les hydrolysats, mais elle est augmentée de 55% comparé à GC et au niveau du muscle, elle est élevée de 61% chez les deux groupes comparés à GC (Fig 3).

L'activité de la GSSH-Red est 2- et 3-fois plus élevée dans le foie respectivement, chez les groupes HPS et HPA par rapport à GC. Au niveau du muscle, cette activité est similaire chez les groupes HPS et GC, par contre elle est 2,4-fois plus élevée chez le groupe HPA vs GC.

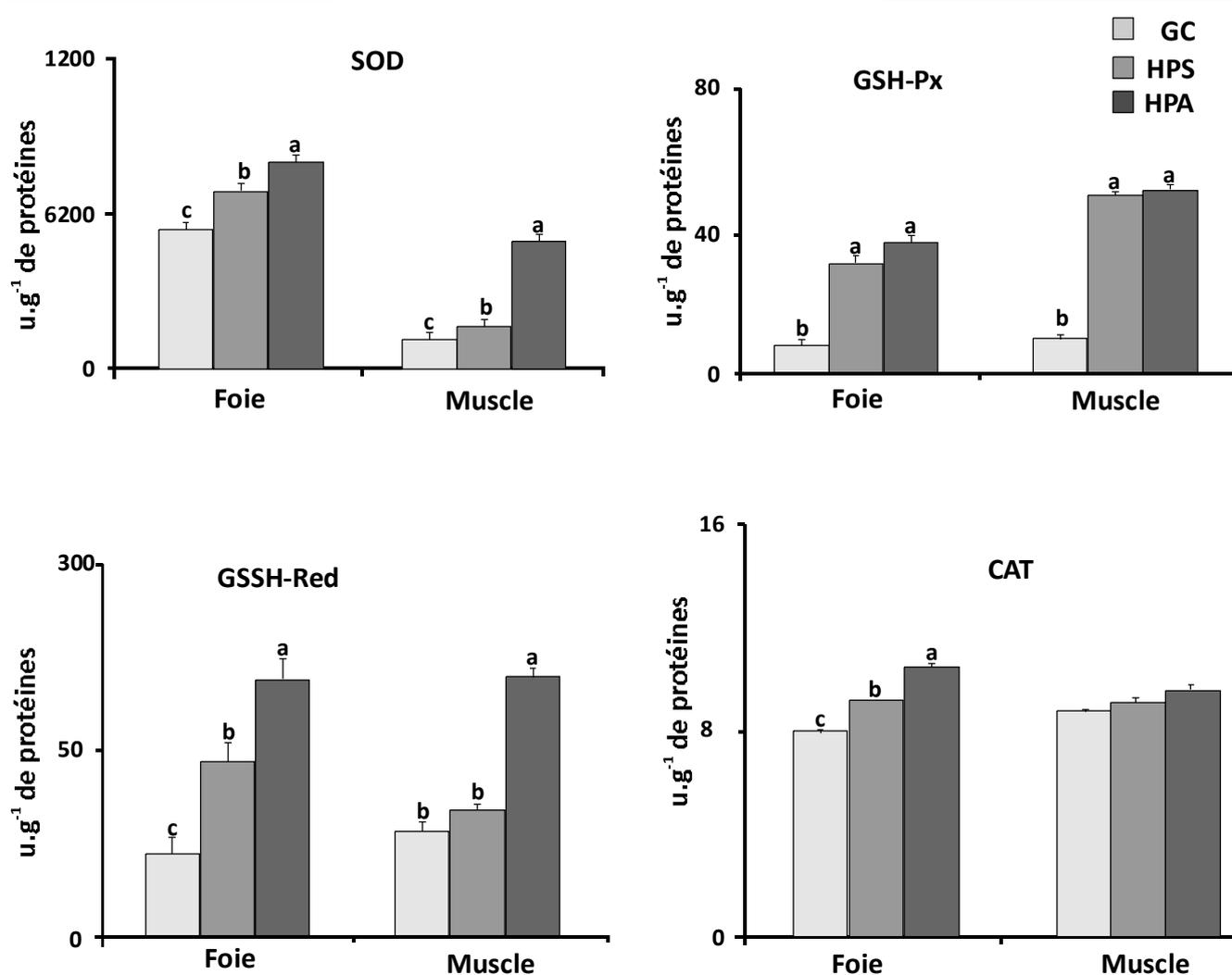


Fig. 4. Activités des enzymes antioxydantes tissulaires

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test de rang multiple de Duncan (1955). Les moyennes portant des lettres différentes (a, b, c) sont significativement différentes ($P < 0,05$). GC: groupe témoin hypercholestérolémique non traité, HPS: groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardine, HPA: groupe traité avec les hydrolysats de protéines de sardinelle.

Au niveau du foie, l'activité de la CAT est respectivement, 1,2- et 1,3-fois plus importante chez les groupes HPS et HPA vs GC. Cependant, au niveau du muscle, elle est similaire chez les groupes traités ou non avec les hydrolysats de protéines de sardine et de sardinelle.

Discussion

L'attention sur les effets bénéfiques du poisson et des produits de la mer pour la santé, a été attirée ces dernières années, par leurs apports en acides gras polyinsaturés (AGPI) à longue chaîne de la famille n-3 [28]. Ils ne peuvent être considérés uniquement comme sources d'AGPI n-3; leurs protéines et les peptides bioactifs qui peuvent en être libérés ont des actions propres, bien que

souvent synergiques des AGI n-3. En effet, les peptides marins, en particulier du poisson sont actifs contre les complications métaboliques des maladies de civilisation, tels que l'obésité, l'hypertension, les dyslipoprotéinémies, la résistance à l'insuline, responsables du risque cardiovasculaire et de mortalité précoce [4,29]. Il a été bien établi que les protéines alimentaires, et en particulier les hydrolysats de différentes espèces de poissons peuvent influencer le métabolisme du cholestérol et des triglycérides. Leur effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant a été démontré chez l'animal et chez l'homme par rapport à la caséine [30].

Nos résultats ont montré que le traitement avec les HPS et les HPA révèle un effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant, chez le rat

consommant un régime enrichi en cholestérol. La réduction du CT sérique peut être principalement due à une baisse du C-LDL-HDL₁ et à l'amélioration du C-HDL₃. Ces résultats sont en accord avec ceux montrés par Hosomi *et al.* [12] et Ben Khaled *et al.* [13]. En outre, cette diminution pourrait être expliquée par le fait que les HPS et les HPA peuvent réduire l'absorption intestinale du cholestérol et peuvent avoir la capacité d'inhiber l'absorption intestinale des acides biliaires et des stéroïdes neutres, et à améliorer l'activité de cholestérol-7 α -hydroxylase hépatique [12]. Une autre explication pourrait suggérer que les HPS et HPA peuvent diminuer la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A (HMG CoA) réductase, entraînant ainsi la réduction de la biosynthèse du cholestérol [12]. L'effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant des hydrolysats avait été également partiellement attribué à leur rôle dans l'amélioration de la régulation de l'expression des récepteurs des LDL, la faible synthèse des TG et à leur effet sur l'expression des gènes [31]. De plus, l'effet hypotriglycéridémiant des HPA est peut être dû à l'augmentation du catabolisme des lipoprotéines de faible densité (VLDL), fraction qui permet le transport des TG hépatiques. En effet, Liaset *et al.* [32] ont rapporté que les hydrolysats de protéines du poisson augmentent les concentrations plasmatiques en acides biliaires, et réduisent la triglycéridémie par l'activation de l'expression des récepteurs nucléaires FXR (Farnesoid X Receptor). Ces récepteurs FXR diminuent la transcription de l'apo CIII qui est le constituant majeur des VLDL [33]. Chez les groupes HPS et HPA, l'augmentation du cholestérol au niveau de la fraction HDL est due aux teneurs élevées de CL- et des EC-HDL₂. Les valeurs des apo-HDL₃, dont l'apo majeur est l'apo A-I, cofacteur-activateur de la LCAT, enzyme intervenant dans le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, sont significativement élevées chez les groupes HPS et HPA par rapport au groupe GC. En effet, une augmentation de l'activité LCAT est notée chez les groupes consommant les hydrolysats. De plus, les PL-HDL₃, substrat de l'enzyme, sont réduits chez HPS. Les teneurs en CL-HDL₃, accepteur du groupement acyl, sont également diminuées chez les groupes traités ; alors que le contenu en EC-HDL₂, produit de la réaction LCAT, est élevé de façon

significative chez les groupes HPS et HPA vs GC, ce qui permet de dire que les hydrolysats agissent de façon favorable sur le transport inverse du cholestérol.

L'hypercholestérolémie est caractérisée par un désordre métabolique des LDL et du cholestérol sérique. L'altération du métabolisme du cholestérol et des triglycérides, en tant que résultat de l'hypercholestérolémie, est associée à des modifications oxydatives des LDL et favorise la production des espèces réactives à l'oxygène (ERO) par différents mécanismes, conduisant à une augmentation de la peroxydation des lipides [34]. Notre étude a révélé que les HPS et les HPA entraînent une réduction significative des teneurs en TBARS hépatiques et musculaires. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Seriff *et al.* [35] qui ont montré que les hydrolysats de protéines du maquereau indien possèdent une importante capacité de pouvoir réducteur et un grand potentiel d'inhiber la peroxydation lipidique tissulaire. L'explication crédible de ces résultats pourrait être due au fait que les HPS et les HPA améliorent l'état oxydatif, chez le rat consommant un régime supplémenté en cholestérol.

Les taux réduits des TBARS tissulaires peuvent être attribués à une baisse de la production des ERO et/ou l'amélioration du système de défense antioxydante. Les enzymes antioxydantes, telles que la SOD, la GSH-Px, la GSSH-Red et la CAT, catalysent la conversion des ERO en espèces neutralisées [5]. La SOD est une enzyme protectrice puissante qui peut piéger sélectivement l'anion superoxyde (O₂⁻) en catalysant sa dismutation en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et O₂ [2]. La CAT catalyse la dégradation de H₂O₂ en H₂O et O₂ [2]. La GSH-Px est une enzyme importante existant *in vivo*, qui peut catalyser la réduction de H₂O₂ et des hydroperoxydes lipidiques par le glutathion (GSH). La GSSH-Red assure la régénération du glutathion en favorisant la conversion du GSSH en GSH par l'oxydation du NADPH en NADP⁺ [36]. Il a été démontré que l'augmentation des taux des ERO dans les cellules peut induire une diminution des enzymes antioxydantes [37]. De plus, une réduction significative des activités de la SOD, la GSH-Px et la GSSH-Red est notée chez des rats hypercholestérolémiques [5]. Nos résultats ont montré une élévation significative des activités de la SOD et la

GSH-Px hépatiques et musculaires, de la GSSH-Red et de la CAT musculaires, chez les groupes HPS et HPA. De plus, une augmentation significative de l'activité de la GSSH-Red musculaire est notée chez le groupe HPA comparé au GC. Ces résultats sont conformes avec ceux rapportés par Wang *et al.* [11]. De plus, Ben Khaled *et al.* [13] ont montré que le traitement avec HPA des rats soumis à un régime enrichi en cholestérol a augmenté les activités de la SOD et de la CAT. De même, il a été montré par You *et al.* [38] que les peptides bioactifs extraits à partir de la Loche (*Misgurums anguillicaudatus*) réduisent le stress oxydatif *in vivo* et améliorent les activités de la SOD, la CAT et la GSH-Px. L'augmentation des activités des enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GSH-Px et GSSH-Red) est probablement due à l'élévation des propriétés antioxydantes et du pouvoir piègeur des deux hydrolysats de protéines de poisson dans la désactivation de l'afflux des ERO générés par le régime enrichi en cholestérol.

Conclusion

Les hydrolysats de protéines de sardine, et en particulier de sardinelle, préparés par digestion *in vitro*, réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie. De plus, le traitement avec HPS et HPA entraîne une augmentation de l'activité de la LCAT, associée à une élévation des apo et des EC-HDL₂, ce qui laisse suggérer que ces hydrolysats peuvent jouer un rôle fondamental dans l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. En outre, la peroxydation des lipides dans le foie et le muscle, médiée par la supplémentation du régime en cholestérol, est diminuée par les hydrolysats, en particulier HPA. Ces résultats laissent suggérer que ces composés protègent efficacement ces deux tissus contre les effets délétères de la peroxydation lipidique en améliorant l'activité des enzymes antioxydantes.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (Projet DGRSDT PNR n° 45) du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS) et entre dans le cadre d'un projet commun de recherche

Algérie/Tunisie UO-06/2011).

Conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent qu'ils n'ont pas de conflit d'intérêts.

Références

1. OMS. Organisation Mondiale de la Santé. Fiche thématique sur les maladies cardiovasculaires, Québec. Les maladies cardiovasculaires 2009; p.1-22. https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/responsabilite-populationnelle/f005_maladies_cardiovasculaires.pdf.
2. Kertész A., Bombicz M., Priksz D., Balla J., Balla G., Gesztelyi R., *et al.* Adverse impact of diet-induced hypercholesterolemia on cardiovascular homeostasis in a Rabbit Model: Time-Dependent Changes in Cardiac Parameters. *Int J Mol Sci* 2013; 14:19086-108.
3. Huang C., Cen C., Wang CX., Zhan H., Ding X. Synergistic effects of colchicine combined with atorvastatin in rats with hyperlipidemia. *Lipids Health Dis* 2014; 13:67-73.
4. Parolini C., Vik R., Busnelli M., Bjørndal B., Holm S., Brattelid T., *et al.* A Salmon Protein Hydrolysate Exerts Lipid-Independent Anti-Atherosclerotic Activity in ApoE-Deficient Mice. *Plos one* 2014; 9 (5):1-9.
5. Otunola GA., Oloyede OB., Oladiji AT., Afolayan AJ. Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. *Biol Res* 2014; 47(1):5-11.
6. Ahmad A., Singhal U., Hossain MM., Islam N., Rizvil I. The role of endogenous antioxidant enzymes and malondialdehyde in essential hypertension. *J Clin Diagn Res* 2013; 7(6):987-90.
7. Yang RL., Shi YH., Hao G., Li W., Le GW. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43(3):154-8.
8. Kim SK., Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J Funct Foods* 2010; 2:1-9.
9. Harnedy PA., Fitz Gerald RJ. Bioactive proteins, peptides and amino acids from macroalgae. *J*

- Phycol* 2011; 47:218-32.
10. Cinq-Mars CD., Hu C., Kitts DD., Li-Chan EC. Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport the angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides in Pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2008; 56:410-9.
 11. Wang H., Fu ZM., Han CC. The potential applications of marine bioactive against diabetes and obesity. *Am J Marine Sci* 2014; 1(2):1-8.
 12. Hosomi R., Fukunaga K., Arai H., Kanda S., Nishiyama T., Yoshida M. Fish Protein Hydrolysates Affect Cholesterol Metabolism in Rats Fed Non-Cholesterol and High-Cholesterol Diets. *J Med Food* 2012; 15(3): 299-306.
 13. Ben Khaled H., Ghiliss Z., Chtourou Y., Hakim A., Ktari N., Fatma MA. *et al.* Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Res Inter* 2012; 45:60-68.
 14. Chakrabarti S., Jahandideh F., Wu J. Food-Derived Bioactive Peptides on Inflammation and Oxidative Stress. *Bio Med Res Inter* 2014; ID 608979, 1-11.
 15. Wang B., Li L., Chi CF., Ma JH., Luo HY., Xu YF. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysates. *Food Chem* 2013; 2-3(138):1713-9.
 16. Guillaume J., Kaushik S., Bergot P., Métailler R. Fabrication des farines de poisson et contrôle de qualité: Principales matières premières d'origine animale. In : INRA (ed) Nutrition et alimentation des poissons et crustacés 1999; p. 346-51.
 17. Louala S., Hamza-Reguig S., Benyahia-Mostefaoui A., Boualga A., Lamri-Senhadji MY. Effects of highly purified sardine proteins on lipid peroxidation and reverse cholesterol transport in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Funct Foods* 2011; 3:321-8.
 18. Balti R., Bougatef A., El Hadj Ali N., Ktari N., Jellouli K., Nedjar-Arroume N. *et al.* Comparative Study on Biochemical Properties and Antioxidative Activity of Cuttlefish (*Sepia officinalis*) Protein Hydrolysates Produced by Alcalase and Bacillus licheniformis NH1 Proteases. *J Amino Acids* 2011; ID 107179:11p.
 19. Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. Official Journal European Communities (JO 86/609/CEE) Corrigendum Official Journal 1987; L358:1-28.
 20. Bouderbala S., Lamri-Senhadji M., Boualga A., Belleville J., Prost J., Bouchenak M. Reverse cholesterol transport in hypercholesterolemia rats fed different proteins and lipids origins. *Nutr Food Sci* 2009; 48:162-9.
 21. Burstein M., Scholnick HR., Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970; 11:583-95.
 22. Burstein M., Fine A., Atger V., Wirbel E., Girard-Globa A. Rapid method for isolation of two purified subfractions of high density lipoproteins by differential dextran sulfate-magnesium chloride precipitation. *Biochemistry* 1989; 71:741-6.
 23. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RI. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1957; 193:265-75.
 24. Chen A., Lacko M. Determinations of endogenous cholesterol esterification by Lecithin: cholesterol acyltransferase in plasma. *Methods Enzymol* 1986; 129:781-2.
 25. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals Biochem* 1979; 85:351-8.
 26. Aebi H. Catalase. In: Berg Meyer H, editor. Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. Weinheim: Verlag Chemie 1974; 673-84.
 27. Duncan DB. Multiple ranges and multiple range F-tests. *Biometrics* 1955; 11:41-2.
 28. Elavarasan K., Naveen Kumar V., Shamasundar BA. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla Catla*) as influenced by the nature of enzyme. *J Food Proc Preserv* 2014; Vol.38 Issue3 :1207-14.
 29. Bouglé D. Peptides fonctionnels marins. *Phytothérapie* 2007; 5(1):22-6.
 30. Shukla A., Bettzieche A., Hirche F., Brandsch C., Stangl GI., Eder K. Dietary fish protein alters blood lipid concentrations and hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in the rat model. *Br J Nutr* 2006; 96(4):674-82.

31. Staels B. & Fonseca VA. Bile acids and metabolic regulation: Mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* 2009; 32 (suppl.2):S237–S45.
32. Liaset B., Madsen L., Hao Q., Criales G., Mellgren G., Marschall HU., *et al.* Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimica Biophysica Acta* 2009; 1791:254-62.
33. Hageman J., Herrema H., Groen AK., Kuipers F. A Role of the Bile Salt Receptor FXR in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:1519-28.
34. Ahna CB., Kim JG., Je JY. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem* 2014; 147: 78-83.
35. Sheriff SA., Sundaram B., Ramamoorthy B., Ponnusamy P. Synthesis and *in vitro* antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. *Saudi J Biol Sci* 2014; 2: 19-26.
36. Deponte M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3217–66.
37. Dauqan EMA., Sani HA., Abdullah A. Effect of different concentrations of red palm olein and different vegetable oils on antioxidant enzymes in normal and stressed Rat. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. Book edited by M. Amr El-Missiry. 2012; 10:5772–48272.
38. You L., Zhao M., Regenstein JM., Ren J. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Food Chem* 2011; 124:188-94.