

L'extrait phénolique de l'enveloppe charnue d'amande (*Prunus amygdalus* L.) restaure le métabolisme lipidique chez la souris hyperlipidémique et prévient l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques

Phenolic Extract of Almond (*Prunus amygdalus* L.) Pericarpa Restores Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Mice and Prevents Plasma Lipoprotein Oxidation

M. Harnafi · I. Touiss · S. Khatib · O. Bekkouch · M. Rouis · K. Ouguerram · H. Harnafi · S. Amrani

© Lavoisier SAS 2019

Résumé Ce travail a été conçu pour étudier l'effet d'un extrait riche en polyphénols de l'enveloppe charnue de l'amande douce sur le profil lipidique plasmatique chez la souris rendue hyperlipidémique par le Triton WR-1339 ainsi que sur la prévention de l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques en comparaison avec le fénofibrate et l'hydroxyanisole butylé. On note que l'extrait phénolique réduit significativement le cholestérol total plasmatique de 58 % ($p < 0,001$) et les triglycérides de 62 % ($p < 0,001$). Par ailleurs, cet extrait réduit significativement le taux élevé du cholestérol-LDL de 61 % ($p < 0,05$) et augmente le cholestérol-HDL de 71 % ($p < 0,05$). Un tel extrait abaisse aussi significativement la valeur de l'indice d'athérogénicité de -72 % ($p < 0,01$) et celle du rapport LDL/HDL de 55 % ($p < 0,05$). En outre, cet extrait possède un effet antiradical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl dose-dépendant avec une $CI_{50} = 18,8 \pm 0,55$ µg/ml et inhibe significativement l'oxydation du plasma riche en lipoprotéines ($CI_{50} = 13,8 \pm 0,57$ µg/ml). Nos résultats montrent que l'extrait est riche en polyphénols à caractère polaire (polyphénols totaux : $342,63 \pm 3,44$ mg/g, tannins : $144,67 \pm 6,83$ mg/g, flavonoïdes : $20,66 \pm 0,92$ mg/g) qui pourraient améliorer le métabolisme lipidique et prévenir l'oxydation des lipoprotéines et ainsi avoir un effet bénéfique

dans la prévention de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires qui en résultent.

Mots clés Cholestérol · Hyperlipidémie · Oxydation des lipoprotéines · Indice d'athérogénicité · *Prunus amygdalus* · Polyphénols

Abstract This work was designed to study the effect of a polyphenol-rich extract from the pericarpa of sweet almond (*Prunus amygdalus* L.) on the plasma lipid profile in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice and on the prevention of lipoprotein oxidation. It is noted that the phenolic extract significantly reduces total plasma cholesterol by 58% ($P < 0.001$) and triglycerides by 62% ($P < 0.001$). In addition, this extract significantly reduces the elevated LDL-cholesterol level by 61% ($P < 0.05$) and increases HDL-cholesterol by 71% ($P < 0.05$). The extract also significantly lowered the value of the atherogenicity index by -72% ($P < 0.01$) and that of the LDL/HDL ratio by 55% ($P < 0.05$). On the other hand, this extract has a dose-dependent 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl anti-radical effect with an $IC_{50} = 18.8 \pm 0.55$ µg/ml and significantly inhibits the oxidation of the lipoprotein-rich plasma ($IC_{50} = 13.8 \pm 0.57$ µg/ml). Our results show that the extract is rich in polar polyphenols (total polyphenols: 342.63 ± 3.44 mg/g, tannins: 144.67 ± 6.83 mg/g, flavonoids: 20.66 ± 0.92 mg/g), which could improve lipid metabolism and prevent the oxidation of lipoproteins and thus have a beneficial effect in the prevention of atherosclerosis and the related cardiovascular diseases.

M. Harnafi (✉) · I. Touiss · S. Khatib · O. Bekkouch · H. Harnafi · S. Amrani
Laboratoire de biochimie et biotechnologies, faculté des sciences, M-60000 Oujda, Maroc
e-mail : harnafimohamed01@gmail.com

M. Rouis
Institut de biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS, Inserm ERL U-1164, Biological Adaptation and Ageing (B2A), UMR-8256, université de Sorbonne, F-75252 Paris, France

K. Ouguerram
INRA, UMR 1280 PhAN, F-44000 Nantes, France

Keywords Cholesterol · Hyperlipidemia · Lipoprotein oxidation · Atherogenic index · *Prunus amygdalus* · Polyphenols

Introduction

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales ont montré que les désordres du métabolisme lipidique et le stress oxydatif sont positivement corrélés au développement et à la progression de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires qui en résultent, ces maladies constituent la cause la plus commune de décès dans le monde [1]. En effet, plusieurs études cliniques ont montré que l'augmentation du cholestérol plasmatique lié aux lipoprotéines de basse densité (cholestérol-LDL [C-LDL]) joue un rôle clé dans le développement précoce de l'athérosclérose, tandis que le cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (cholestérol-HDL [C-HDL]) est un paramètre antiathérogène [2,3]. Par ailleurs, les triglycérides (TG) plasmatiques représentent également un facteur de risque potentiel d'athérosclérose en particulier chez les sujets diabétiques [4]. En outre, le stress oxydant conduisant à l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL) constitue le point de départ de la formation des cellules spumeuses déclenchant le processus athérosclérotique [5]. Ainsi, toute gestion de l'athérosclérose et des événements cardiovasculaires associés devrait reposer essentiellement sur le traitement de l'hyperlipidémie et la protection des LDL contre l'oxydation [6]. Dans ce contexte, la recherche de traitements hypolipémiants plus sains a conduit à la découverte des produits naturels issus de plantes médicinales [7]. Au Maroc, comme dans de nombreux pays en développement, plusieurs personnes hyperlipidémiques ont recours à la médecine traditionnelle pour traiter l'hyperlipidémie et le stress oxydant et ainsi prévenir la maladie athéromateuse. Par conséquent, et dans le but de valoriser la flore médicinale du Maroc oriental, il est fort intéressant de rechercher de nouvelles ressources naturelles riches en substances à activités hypolipémiante et antioxydante.

L'amandier (*Prunus amygdalus* L.) est une culture typique du climat méditerranéen dont le fruit contient une enveloppe charnue constituant le sous-produit le plus intéressant aussi bien du point de vue qualité que quantité. Ces enveloppes sont surtout destinées à l'alimentation animale. Au Maroc oriental, on les utilise traditionnellement en infusion pour traiter les hyperlipidémies et prévenir l'athérosclérose. Ainsi, ce travail a été conçu pour rechercher l'effet des enveloppes de l'amande sur les paramètres lipidiques plasmatiques chez la souris hyperlipidémique ainsi que sur la protection du plasma riche en lipoprotéines contre l'oxydation.

Matériel et méthodes

Préparation de l'extrait des enveloppes charnues d'amandes

Les enveloppes charnues d'amandes (*Prunus amygdalus* L.) ont été collectées en période de cueillette dans la région de

Rislane (Tafoughalt-Maroc oriental) pendant le mois d'août 2017. Les échantillons sont séchés à l'air libre et ensuite réduits en poudre fine à l'aide d'un mixeur électrique. L'infusât est préparé selon une méthode similaire à celle utilisée en médecine traditionnelle avec quelques légères modifications. Ainsi, 20 g de la poudre sont infusés dans de l'eau distillée bouillante pendant 30 minutes. L'extrait ainsi obtenu est filtré sur papier Whatman, et le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif à 50 °C sous pression réduite et ensuite séché à l'étuve aérée à 40 °C pendant 24 heures. Le rendement d'extraction est de 32,3 g d'extrait sec pour 100 g de poudre de plante.

Dosage des polyphénols totaux de l'extrait des enveloppes d'amandes

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait aqueux des enveloppes d'amandes est déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu [8]. À 0,5 ml d'échantillon sont ajoutés 0,25 ml du réactif de Folin et 0,5 ml de la solution de carbonate de sodium 20 %. Après agitation, la coloration bleue est laissée se développer pendant 45 minutes à l'obscurité. Les absorbances sont mesurées au spectrophotomètre à 725 nm contre le tube blanc dont l'échantillon est remplacé par 0,5 ml d'eau distillée. Le taux des polyphénols est calculé à partir d'une gamme d'étalonnage de catéchine et exprimé en milligramme de catéchine par gramme d'extrait sec. Toutes les mesures sont faites en triple.

Dosage des tannins

Les tannins sont dosés après leur précipitation au polyvinylpyrrolidone (PVP) [9]. Ainsi, 50 ml de chaque échantillon (1 mg/ml) sont homogénéisés avec 0,1 g de PVP, le mélange est agité pendant 30 minutes. Le complexe tannin-PVP est laissé se former pendant deux heures et la solution est ensuite centrifugée à 4 000 rpm/15 min. Les composés phénoliques non adsorbés appelés non-tannins (constituant le surnageant) sont dosés par la méthode de Folin-Ciocalteu comme précédemment décrit. Les valeurs obtenues sont soustraites du taux de polyphénols totaux pour avoir la teneur en tannins exprimée en milligramme de catéchine par gramme d'extrait sec. Les essais sont faits en triple.

Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode au chlorure d'aluminium [8]. Cinq millilitres de l'échantillon à analyser sont additionnés de 2,5 ml du réactif au chlorure d'aluminium $AlCl_3$ (133 mg d' $AlCl_3$ et 400 mg d'acétate de sodium dans 100 ml de méthanol). La coloration jaune des échantillons est mesurée à 430 nm contre le tube blanc (5 ml d'échantillon + 2,5 ml de méthanol). La teneur en

flavonoïdes est déterminée à partir de la gamme d'étalonnage de la rutine et exprimée en milligramme de rutine par gramme d'extrait sec. Les dosages sont faits en triplicata.

Étude de l'effet sur les lipides plasmatiques chez la souris hyperlipidémique

Vingt-quatre souris mâles albinos adultes pesant 28–30 g sont élevées à l'animalerie du département de biologie (faculté des sciences d'Oujda, Maroc) dont la température de la salle est fixée à 22 ± 02 °C et la photopériode à 12 heures lumière/12 heures obscurité.

Ces animaux sont répartis en quatre groupes de huit animaux chacun :

- groupe TNL : animaux témoins normolipidémiques (TNL) gavés à l'eau distillée ;
- groupe THL : animaux témoins hyperlipidémiques (THL) recevant le Triton (200 mg/kg dans le NaCl 9 %, pH : 7,4) par injection intrapéritonéale et gavés avec de l'eau distillée ;
- groupe extrait des enveloppes charnues d'amandes (EEAC) : animaux recevant le Triton et gavés à l'EECA à la dose de 500 mg/kg ;
- groupe Fénofibrate : animaux recevant le Triton et gavés au fénofibrate à la dose de 500 mg/kg.

À la fin de l'expérience (dix heures), les animaux sont légèrement anesthésiés par l'éther diéthylique, et le sang est récupéré du sinus rétro-orbital de l'œil dans des tubes contenant le citrate trisodique comme anticoagulant. Après centrifugation à 2 500 rpm/10 min, le plasma est récupéré pour le dosage des paramètres lipidiques.

Dosage des paramètres lipidiques plasmatiques

Dosage du cholestérol total

La méthode enzymatique de dosage du cholestérol consiste à hydrolyser les esters de cholestérol par une cholestérol ester hydrolase. Le cholestérol libre formé et celui préexistant sont ensuite oxydés par une cholestérol-oxydase avec production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier, en présence du 4-amino-antipyrine et de phénol, donne une quinoneimine colorée en rouge, dont on mesure l'absorbance à 510 nm. À 10 ml du plasma, on ajoute 1 ml de kit enzymatique (Reactivos GPL Kits, CHEMELIX SA, Barcelona, Spain). Après agitation et incubation pendant dix minutes à 37 °C, on mesure la densité optique au spectrophotomètre à 510 nm contre le blanc préparé de la même façon en remplaçant les 10 µl du plasma par 10 µl d'eau distillée.

La concentration en cholestérol total (CT) des échantillons est calculée comme suit :

$[CT] \text{ mg/dl} = [DO \text{ échantillon}/DO \text{ étalon}] \times \text{concentration en CT de l'étalon.}$

Dosage des triglycérides

Les TG plasmatiques sont quantifiés par une méthode enzymatique en utilisant le kit Reactivos GPL (CHEMELIX SA, Barcelona, Spain). Après hydrolyse des TG par les lipases, la formation du quinoneimine à partir de l' H_2O_2 , du 4-aminophénazone et du 4-chlorophénol sous l'action de la peroxydase est mesurée au spectrophotomètre. À 10 ml du plasma, on ajoute 1 ml de réactif de dosage, après agitation et incubation pendant 15 minutes à 37 °C, la densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 520 nm contre le blanc préparé de la même façon en remplaçant les 10 µl du plasma par 10 µl d'eau distillée. La concentration en TG est calculée comme suit :

$[TG] \text{ mg/dl} = (DO \text{ échantillon}/DO \text{ étalon}) \times \text{concentration de l'étalon.}$

Dosage du cholestérol-HDL

La fraction C-HDL est dosée après précipitation des lipoprotéines LDL et VLDL par l'acide phosphotungstique (PTA) en présence du chlorure de magnésium ($MgCl_2$). Dans un tube Eppendorf[®], on mélange 20 µl du plasma et 10 µl du réactif PTA/ $MgCl_2$ (Sigma Diagnostic 352-4). On laisse reposer 10 minutes après agitation, puis on centrifuge à 5 000 rpm pendant 15 minutes. Le cholestérol est dosé dans le surnageant en suivant le même protocole de dosage du CT. La concentration du C-HDL est calculée selon la formule suivante :

$[C-HDL] \text{ mg/dl} = (DO \text{ échantillon}/DO \text{ étalon}) \times \text{concentration de l'étalon} \times \text{facteur de dilution.}$

Calcul du cholestérol-LDL

Le C-LDL est calculé selon la formule de Friedwald et al. [10] :

$$C-LDL = CT - [(C-HDL + TG/5)].$$

Indice d'athérogénicité et rapport C-LDL/C-HDL

L'indice d'athérogénicité (IA) est calculé selon la formule suivante : $IA = (CT - C-HDL)/C-HDL$. Le rapport C-LDL/C-HDL est calculé comme étant la concentration en C-LDL par rapport au C-HDL.

Détermination de l'effet antiradicalaire de l'extrait d'enveloppes d'amandes et de l'hydroxyanisole butylé

L'effet antiradicalaire est déterminé par le test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) selon la méthode décrite par Ramchoun et al. [11]. Sous sa forme radicalaire, le DPPH absorbe la lumière visible à 517 nm, et après sa réduction par des antioxydants, son absorbance diminue. La mesure de la

diminution de l'absorption du DPPH permet donc de déterminer le pouvoir antiradicalaire des substances testées. Deux mille quatre cent quatre-vingt-quinze microlitres d'une solution méthanolique de DPPH 0,1 mM sont ajoutés à 5 µl de l'extrait d'enveloppes d'amandes à différentes concentrations (0,5, 10, 25, 50, 100 et 200 µg/ml). Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance du mélange est mesurée à 517 nm. L'antioxydant synthétique hydroxyanisole butylé (BHA) est aussi testé en tant que témoin positif dans les mêmes conditions expérimentales.

La capacité à piéger le radical DPPH est calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ effet antiradicalaire} = 100 \frac{(\text{DO}_{\text{blanc}} - \text{DO}_{\text{échantillon}})}{\text{DO}_{\text{blanc}}}$$

La concentration inhibitrice (CI₅₀) [concentration donnant 50 % d'inhibition] est calculée à partir du graphique représentant l'effet antiradicalaire en fonction des concentrations de l'extrait. Tous les tests sont faits en triplicata.

Mesure de l'effet protecteur de l'extrait des enveloppes d'amandes et de l'hydroxyanisole butylé contre l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques

Comme produits secondaires de la peroxydation des lipoprotéines plasmatiques, les malondialdéhydes (MDA) sont quantifiés comme substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) selon la procédure décrite par Touiss et al. [8]. Le plasma riche en lipoprotéines utilisé comme substrat de l'oxydation est prélevé chez des souris traitées au Triton WR-1339 à la dose de 400 mg/kg pendant dix heures. Le plasma contient 90 ± 3 mg/dl de cholestérol-LDL (analysé par kit enzymatique comme décrit précédemment). Le processus oxydatif est induit par une solution de sulfate de cuivre selon le schéma décrit ci-après :

- témoin : 40 µl du plasma riche en lipoprotéines sont incubés avec de l'eau distillée uniquement ;
- lipoprotéines oxydées : 40 µl du plasma riche en lipoprotéines sont incubés avec 10 µl de solution de sulfate de cuivre (CuSO₄·5H₂O) [0,3 mg/ml] ;
- lipoprotéines traitées à l'EECA : 40 µl du plasma riche en lipoprotéines sont incubés avec 10 µl de solution de sulfate de cuivre et de l'extrait des enveloppes d'amandes à différentes concentrations (5, 12,5, 25, 50, 100 et 200 µg/ml) ;
- lipoprotéines traitées au BHA : 40 µl du plasma riche en lipoprotéines sont incubés avec 10 µl de solution de sulfate de cuivre et du BHA à différentes concentrations (5, 12,5, 25, 50, 100 et 200 µg/ml).

Les préparations sont mélangées vigoureusement et incubées pendant 24 heures à 37 °C. Ensuite, on ajoute à chaque tube 500 µl d'acide trichloroacétique à 20 % (pH : 3,5) et 500 µl de TBARS à 0,8 % (TBA), le mélange réactionnel est

chauffé à 95 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement, l'absorbance de la couleur rose résultante est enregistrée à 532 nm. Les quantités de TBARS ont été calculées et exprimées en équivalent MDA à partir d'une courbe d'étalonnage. Toutes les mesures ont été effectuées en triple.

Résultats

Induction de l'hyperlipidémie par le Triton WR-1339

Les taux du CT et celui des TG plasmatiques sont rapportés sur la figure 1. Comparativement au groupe témoin normolipidémique (TNL), le Triton WR-1339 a provoqué une augmentation significative du CT et des TG plasmatiques. En effet, le CT plasmatique est augmenté de 13 fois ($p < 0,001$) et les TG de plus de quatre fois ($p < 0,001$).

Les taux du cholestérol-HDL et LDL sont résumés sur la figure 2. Comme on peut le constater, le cholestérol-LDL est beaucoup plus élevé chez le groupe traité au Triton (+820 % ; $p < 0,001$) comparativement au témoin normolipidémique. En outre, le Triton a entraîné une augmentation significative du HDL-cholestérol de +428 % ($p < 0,001$) comparativement au témoin.

La figure 3 montre l'évolution de l'IA et du rapport LDL-C/HDL-C. Il apparaît clairement que l'administration du Triton affecte significativement ces marqueurs de risque cardiovasculaire. En effet, l'IA est statistiquement accru chez le groupe traité au Triton (+250 %) par rapport au groupe témoin ($p < 0,001$). Le rapport C-LDL/C-HDL est

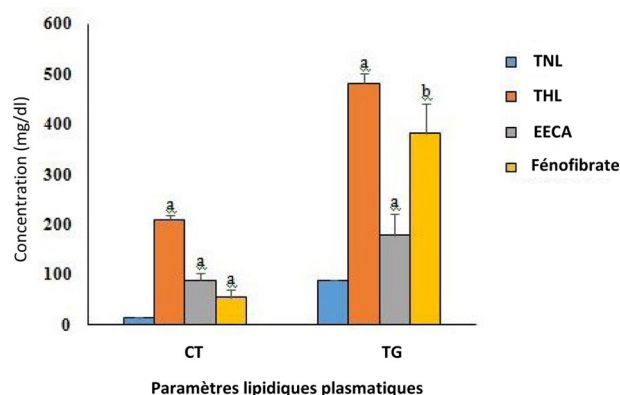


Fig. 1 Effet de l'extrait d'enveloppe charnue d'amande et du fénofibrate sur le cholestérol total et les triglycérides plasmatiques de la souris TNL : témoin normolipidémique ; THL : témoin hyperlipidémique ; EECA : groupe hyperlipidémique traité à l'extrait d'enveloppe charnue d'amande ; Fénofibrate : groupe hyperlipidémique traité au fénofibrate ; CT : cholestérol total ; TG : triglycérides Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM ($n = 8$) ; a : $p < 0,001$; b : $p < 0,05$: TNL vs THL ; groupes traités à l'EECA et fénofibrate vs THL

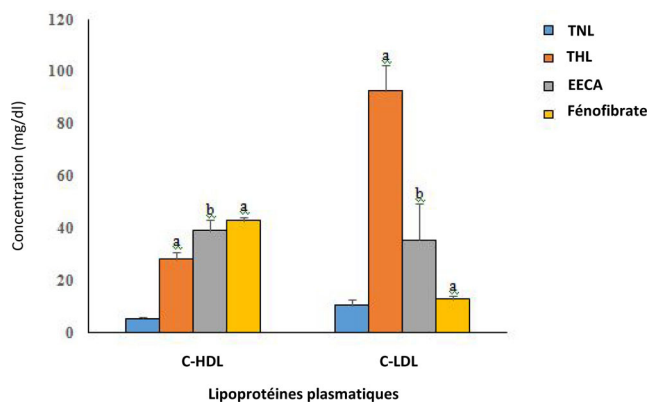


Fig. 2 Effet de l'extrait d'enveloppe charnue d'amande et du fénofibrate sur les lipoprotéines plasmatiques de la souris TNL : témoin normolipidémique ; THL : témoin hyperlipidémique ; EECA : groupe hyperlipidémique traité à l'extrait d'enveloppe charnue d'amande ; Fénofibrate : groupe hyperlipidémique traité au fénofibrate ; C-HDL : cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité ; C-LDL : cholestérol lié aux lipoprotéines de basse densité. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM ($n = 8$) ; $p < 0,001$; $b : p < 0,05$: TNL vs THL ; groupes traités à l'EECA et fénofibrate vs THL

également statistiquement augmenté comparativement au témoin (+86 % ; $p < 0,05$).

Effet de l'extrait d'enveloppes d'amandes sur le profil lipidique plasmatique chez la souris

Dix heures après l'administration de l'extrait aqueux des enveloppes charnues d'amandes aux souris traitées au Triton, le CT plasmatique et les TG sont significativement diminués de 58 % ($p < 0,001$) et de 62 % ($p < 0,001$), respectivement (Fig. 1). En outre, le cholestérol-LDL est réduit de 61% ($p < 0,05$) et le cholestérol-HDL est augmenté de 71 % ($p < 0,05$) (Fig. 2).

Des résultats prometteurs ont été obtenus en ce qui concerne la réduction de l'IA par l'extrait de l'enveloppe charnue de l'amande (Fig. 3). Ainsi, ce marqueur a été significativement réduit (-72 % ; $p < 0,01$) après dix heures lorsque les données sont comparées au témoin hyperlipidémique. Le rapport C-LDL/C-HDL est également un marqueur prédictif de l'incidence des maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'injection du Triton produit une augmentation significative de ce marqueur et l'extrait de l'enveloppe d'amande le ramène presque aux valeurs de base (-55 % ; $p < 0,05$) (Fig. 3).

Effet du fénofibrate sur le profil lipidique plasmatique chez la souris

Le fénofibrate est un médicament hypolipémiant que nous avons utilisé dans cette expérience comme témoin positif. Ainsi, ce médicament réduit significativement le taux du

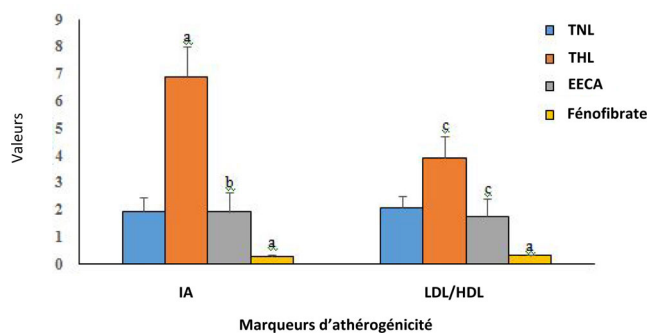


Fig. 3 Effet de l'extrait d'enveloppe charnue d'amande et du fénofibrate sur les marqueurs d'athérogénicité chez la souris TNL : témoin normolipidémique ; THL : témoin hyperlipidémique ; EECA : groupe hyperlipidémique traité à l'extrait d'enveloppe charnue d'amande ; Fénofibrate : groupe hyperlipidémique traité au fénofibrate ; IA : indice d'athérogénicité ; LDL/HDL : rapport cholestérol-LDL sur cholestérol-HDL. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM ($n = 8$) ; $a : p < 0,001$; $b : p < 0,01$; $c : p < 0,05$: TNL vs THL ; groupes traités EECA et fénofibrate vs THL

CT de 73 % ($p < 0,001$) et celui des TG de 31 % ($p < 0,05$) (Fig. 1). On note aussi que le traitement des souris par le fénofibrate diminue significativement le cholestérol-LDL de 86 % ($p < 0,001$) et augmente le cholestérol-HDL de 52 % ($p < 0,001$) (Fig. 2). En outre, le traitement a également abaissé l'IA de 95 % ($p < 0,001$) et le rapport LDL-C/HDL-C de 91 % ($p < 0,001$) (Fig. 3).

Activité antiradicalaire de l'extrait d'enveloppes d'amandes et de l'hydroxyanisole butylé

Les activités antiradicalaires de l'extrait de plante et du BHA sont mesurées contre le radical DPPH. Les pourcentages de l'effet antiradicalaire en fonction des concentrations sont illustrés sur la figure 4. On constate que plus on augmente la concentration plus l'effet antiradicalaire augmente. Ainsi, l'extrait d'enveloppes d'amandes piège le radical DPPH à 2, 25, 56,5, 93,5, 93,9 et 93,3 % aux concentrations de 0,5, 10, 25, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$. Par ailleurs, le BHA exerce un effet antiradicalaire de 2, 25, 50, 63, 77 et 90 % aux mêmes concentrations que celles de l'extrait. Pour mieux comparer les pouvoirs antiradicalaires, nous avons déterminé les valeurs de CI_{50} comme étant les concentrations de l'extrait ou du BHA nécessaires pour neutraliser 50 % du radical DPPH. On note que la CI_{50} de l'extrait ($18,8 \pm 0,55 \mu\text{g/ml}$) est légèrement inférieure à celle du BHA ($21,4 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) [$p = 0,01$].

Effet de l'extrait de l'enveloppe d'amande et du BHA sur l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques

Dans cette expérience, nous avons quantifié les MDA en tant que produits secondaires de la peroxydation des

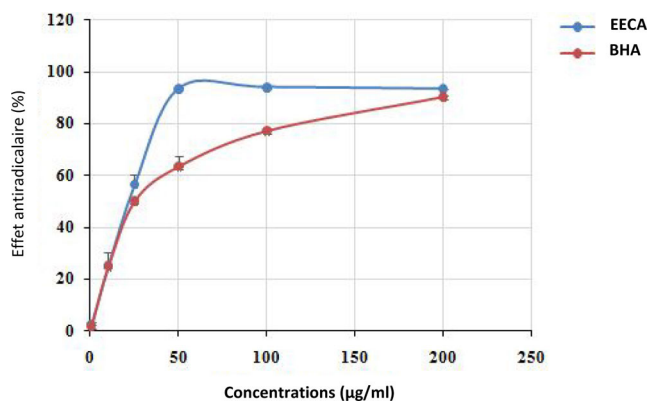


Fig. 4 Effet antiradicalaire de l'extrait d'enveloppe charnue d'amande et du BHA EECA : extrait d'enveloppe charnue d'amande ; BHA : hydroxyanisole butylé (antioxydant synthétique). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM ($n = 3$)

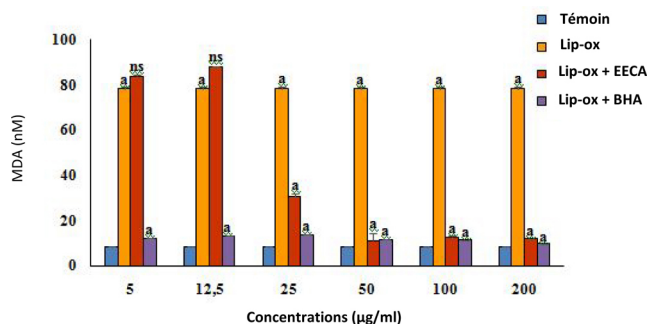


Fig. 5 Effet de l'extrait d'enveloppe charnue d'amande et du BHA sur l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques de la souris EECA : extrait d'enveloppe charnue d'amande ; BHA : hydroxyanisole butylé (antioxydant synthétique) ; lip-ox : lipoprotéines oxydées - Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm SEM ($n = 3$) ; a : $p < 0,001$; ns : non significatif (lip-ox vs témoin ; EECA et BHA vs lip-ox)

lipoprotéines plasmatiques. Le pourcentage d'inhibition de l'oxydation est mesuré et les CI_{50} sont calculées pour l'extrait d'enveloppes d'amandes et pour le BHA (Fig. 5). Ainsi, on constate d'abord une augmentation significative du taux des MDA dans le témoin soumis au sulfate de cuivre en comparaison avec le test sans cuivre (+850 % ; $p < 0,001$). Cependant, cette augmentation est significativement ralentie par l'extrait de plante. Les pourcentages de diminution sont de 59 % ($p < 0,001$), 83 % ($p < 0,001$), 84 % ($p < 0,001$) et 88 % ($p < 0,001$) respectivement aux doses de 25, 50, 100 et 200 µg/ml.

Dans les mêmes conditions, le BHA atténue l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques de 82 % ($p < 0,001$), 85 % ($p < 0,001$), 85,4 % ($p < 0,001$) et 87,5 % ($p < 0,001$) res-

pectivement aux mêmes doses. Après la détermination des CI_{50} , il apparaît que l'effet de l'extrait de plante ($CI_{50} = 13,8 \pm 0,57$ µg/ml) est relativement plus faible que celui du BHA ($CI_{50} = 8 \pm 0,05$ µg/ml) [$p < 0,001$].

Teneur en polyphénols de l'extrait d'enveloppes d'amandes

Les taux en différentes classes de composés phénoliques de l'extrait d'enveloppes d'amandes sont résumés dans le tableau 1. On note que l'extrait est riche en polyphénols totaux représentant $342,63 \pm 3,44$ mg/g. Les tannins représentent la fraction majeure des polyphénols analysés : $144,67 \pm 6,83$ mg/g, soit 42 % des polyphénols totaux. Les flavonoïdes dont la teneur est de $20,66 \pm 0,9$ mg/g représentent 6 % des polyphénols totaux.

Discussion

L'implication des désordres du métabolisme lipoprotéique et du stress oxydant dans la survenue des maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose, le diabète et l'hypertension artérielle est actuellement très documentée [1,12]. Ainsi, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie et l'oxydation des LDL constituent les majeurs facteurs de risque hautement corrélés avec le développement de la pathologie athéromateuse et des complications cardiovasculaires associées [12].

Le Triton WR-1339 est un détergent non ionique qui a été largement utilisé pour inhiber la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) et la lipoprotéine lipase et bloquer l'absorption des lipoprotéines plasmatiques par les tissus périphériques. Cette propriété est exploitée afin de produire des modèles animaux d'hyperlipidémie aiguë servant à l'étude du métabolisme lipidique et la recherche de substances à effet hypolipémiant [13]. Dans notre étude, ce modèle présente des changements importants dans le profil lipidique plasmatique des souris après dix heures. Cela démontre sa

Tableau 1 Teneur en polyphénols de l'extrait d'enveloppes charnues d'amandes

	Teneur en mg/g	Pourcentage
Polyphénols totaux ^a	$342,63 \pm 3,44$	100
Tannins ^a	$144,67 \pm 6,83$ mg/g	42
Flavonoïdes ^b	$20,66 \pm 0,92$ mg/g	6

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes \pm SEM ; $n = 3$

^a Exprimés en mg de catéchine par gramme d'extrait sec

^b Exprimés en mg de rutine par gramme d'extrait sec

faisabilité pour étudier l'effet de l'extrait aqueux de l'enveloppe charnue d'amandes sur les paramètres lipidiques plasmatiques et sur la protection des lipoprotéines contre l'oxydation.

Nos résultats montrent que l'extrait d'enveloppes d'amandes réduit significativement le taux plasmatique du CT chez la souris après dix heures de traitement. La diminution du CT est accompagnée d'une baisse significative de sa fraction LDL dite « mauvais cholestérol » qui constitue le principal facteur de risque modifiable et la cible thérapeutique de plusieurs médicaments hypolipémiants. Ainsi, on suggère que l'effet de l'extrait d'enveloppes d'amandes réside dans l'élimination du C-LDL du plasma vers le foie via les récepteurs LDL hépatiques comme démontré par Khanna et al. [14].

Par ailleurs, l'effet hypocholestérolémiant de l'extrait testé s'accompagne d'une augmentation du cholestérol-HDL. Le C-HDL dit « bon cholestérol » a été montré ayant un effet préventif du déclenchement du processus athéroscléreuse [15]. En effet, cette lipoprotéine assure la voie de retour dans le métabolisme du cholestérol et facilite ainsi sa mobilisation du plasma vers le foie où il est sécrété sous sa forme native ou sous forme de sels biliaires [16].

Il a été démontré aussi que les TG jouent un rôle primordial dans la régulation des interactions entre les lipoprotéines afin de maintenir l'homéostasie du métabolisme lipidique. En effet, des taux élevés en TG plasmatiques sont positivement corrélés à l'incidence des maladies cardiovasculaires liées aux dyslipidémies [17]. Ainsi, nous avons montré que l'extrait d'enveloppes charnues d'amandes réduit significativement les concentrations des TG plasmatiques chez les souris hyperlipidémiques. Ce résultat nous laisse suggérer que l'extrait testé pourrait restaurer le catabolisme des TG par activation de la lipoprotéine lipase impliquée directement dans l'hydrolyse des lipoprotéines plasmatiques riches en TG au niveau des tissus périphériques.

Par ailleurs, l'administration d'un tel extrait aux animaux hyperlipidémiques diminue aussi leur IA qui est étroitement lié à l'effet hypolipémiant. En outre, il est fortement désirable de maintenir faible le rapport C-LDL/C-HDL afin de prévenir l'athérogenèse, puisque ce rapport est hautement corrélé à l'incidence de la maladie athéromateuse. Ainsi, l'extrait de plante diminue significativement les valeurs élevées de ce rapport chez la souris hyperlipidémique et montre son effet bénéfique sur le métabolisme lipidique et la prévention de la maladie athéromateuse. On note que ces constatations s'accordent avec plusieurs travaux antérieurs traitant de l'effet bénéfique des substances naturelles sur le métabolisme lipidique et de la prévention des maladies cardiovasculaires [13,18].

Dans ce travail, on a aussi comparé l'effet hypolipémiant de l'extrait à celui du fénofibrate chez la souris traitée au Triton WR-1339, et on s'est rendu compte que l'effet de

l'extrait de plante est relativement comparable à celui du médicament. Cependant, ce dernier apparaît plus actif sur l'ensemble des paramètres lipidiques plasmatiques sauf les TG. On note à ce niveau que l'effet hypolipémiant du fénofibrate est en accord avec son mode d'action relatif à l'activation de l'expression du gène de la lipoprotéine lipase et à la diminution de la biosynthèse et la sécrétion des VLDL dans le plasma [19].

Outre l'hyperlipidémie, il a été démontré que les radicaux libres provoquent une modification oxydative des lipoprotéines plasmatiques contribuant au déclenchement du processus athérosclérotique [20]. L'inhibition de l'oxydation des LDL par des traitements antioxydants est l'une des principales stratégies de prévention de l'athérosclérose [21]. À cet égard, les antioxydants naturels sont très efficaces en tant que piègeurs de radicaux libres et offrent une protection contre l'oxydation des lipoprotéines et la progression de l'athérosclérose [22]. Notre étude expérimentale a démontré que l'extrait d'enveloppes d'amandes neutralise le radical DPPH et empêche l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques d'une manière significative et dose-dépendante. On note que l'activité observée pourrait être attribuée aux composés phénoliques contenus dans l'extrait qui sont connus par leur action via trois mécanismes principaux. En effet, les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et ainsi d'arrêter la réaction en chaîne de l'oxydation lipidique [23]. Ils peuvent également chélater les ions métalliques pro-oxydants qui favorisent la production de radicaux libres et aussi préserver l'activité de la paraoxonase associée aux HDL, ce qui empêche l'oxydation des lipoprotéines de faible densité [23].

Nos résultats démontrent clairement que les composés bioactifs contenus dans l'extrait d'enveloppes d'amandes ont un caractère polaire, car ils sont plus solubles dans l'eau. Cela est en accord avec les rapports précédents montrant que plusieurs extraits hydrosolubles de plantes ont la capacité de moduler le métabolisme lipidique et de prévenir l'athérogenèse. En fait, les tannins et les flavonoïdes, un groupe hétérogène de polyphénols végétaux, présentent différentes activités pharmacologiques, notamment des effets hypolipémiants et antiathérogènes [24]. Ainsi, après quantification des polyphénols de l'extrait des enveloppes d'amandes, on suggère que les tannins et les flavonoïdes pourraient être les principaux composés responsables des activités hypolipémiante et antioxydante observées.

Conclusion

D'après ces résultats, on pourrait considérer l'enveloppe charnue d'amandes douces comme une source importante de composés bioactifs pour traiter l'hyperlipidémie et prévenir l'oxydation des lipoprotéines conduisant au

développement de l'athérosclérose. Ainsi, ces sous-produits utilisés en médecine traditionnelle pourraient être valorisés par extraction des composés actifs à effets hypolipémiant et antiathérogène.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- Viktorinova A, Svitekova K, Stecova A, et al (2016) Relationship between selected oxidative stress markers and lipid risk factors for cardiovascular disease in middle-aged adults and its possible clinical relevance. *Clin Biochem* 49:868–72
- Deedwania PC, Pedersen TR, DeMicco DA, et al (2016) Differing predictive relationships between baseline LDL-C, systolic blood pressure, and cardiovascular outcomes. *Int J Cardiol* 222: 548–56
- Lazo-Porras M, Bernabe-Ortiz A, Málaga G, et al (2016) Low HDL cholesterol as a cardiovascular risk factor in rural, urban, and rural-urban migrants: PERU MIGRANT cohort study. *Atherosclerosis* 246:36–43
- Talayero BG, Sacks FM (2011) The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Card Rep* 13:544–52
- Winklhofer-Roob BM, Faustmann G, Roob JM (2017) Low-density lipoprotein oxidation biomarkers in human health and disease and effects of bioactive compounds. *Free Radic Biol Med* 111:38–86
- Stone NJ (1996) Lipid management: current diet and drug treatment options. *Am J Med* 101:40S–9S
- Song DX, Jiang JG (2017) Hypolipidemic components from medicine food homology species used in China: pharmacological and health effects. *Arch Med Res* 48:569–81
- Touiss I, Khatib S, Bekkouch O, et al (2017) Phenolic extract from *Ocimum basilicum* restores lipid metabolism in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice and prevents lipoprotein-rich plasma oxidation. *Food Sci Hum Well* 6:28–33
- Makkar HPS, Blummel M, Borowy NK, et al (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 61:161–5
- Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502
- Ramchoun M, Sellam K, Harnafi H, et al (2015) Investigation of antioxidant and antihemolytic properties of *Thymus satureioides* collected from Tafilalet Region, south-east of Morocco. *Asian Pac J Trop Biomed* 5:93–100
- Hadjiphilippou S, Ray KK (2018) Lipids and lipoproteins in risk prediction. *Cardiol Clin* 36:213–20
- Surya S, Kumar RA, Carla B, et al (2017) Antihyperlipidemic effect of *Ficus dalhousiae* miq. stem bark on Triton WR-1339 and high fat diet-induced hyperlipidemic rats. *Bull Fac Pharm Cairo Univ* 55:73–7
- Khanna AK, Rizvi F, Chander R (2002) Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *J Ethnopharmacol* 82:19–22
- Parhofer KG (2015) Increasing HDL-cholesterol and prevention of atherosclerosis: a critical perspective. *Atherosclerosis Suppl* 18:109–11
- Lee-Rueckert M, Escola-Gil JC, Kovanen PT (2016) HDL functionality in reverse cholesterol transport-challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim Biophys Acta* 1861:566–83
- Boullart AC, de Graf J, Stalenoef AF (2012) Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta* 1821:867–75
- Rony KA, Ajith TA, Nima N, et al (2014) Hypolipidemic activity of *Phellinus rimosus* against Triton WR-1339 and high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. *Env Toxicol Pharmacol* 37:482–92
- Staels B, Dallongville J, Auwerx J, et al (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation* 98:2088–93
- Salvayre R, Negre-Salvayre A, Camare C (2016) Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie* 125:281–96
- Kong KW, Mat-Junit S, Ismail A, et al (2014) Polyphenols in *Barringtonia racemosa* and their protection against oxidation of LDL, serum and haemoglobin. *Food Chem* 146:85–93
- Plaza M, Batista AG, Cazarin CBB, et al (2016) Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: a pilot clinical study. *Food Chem* 211:185–97
- Harnafi H, Amrani S (2007) Flavonoids as potent phytochemicals in cardiovascular diseases prevention. *Pharm Rev* 1:193–202
- Zou B, Li CM, Chen JY, et al (2012) High molecular weight persimmon tannin is a potent hypolipidemic in high-cholesterol diet fed rats. *Food Res Intern* 48:970–7