



HAL
open science

Interactions lipides-protéines issus d'oléo-protéagineux : impact sur leur digestibilité et intérêt dans la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement

Lina Toutirais

► To cite this version:

Lina Toutirais. Interactions lipides-protéines issus d'oléo-protéagineux : impact sur leur digestibilité et intérêt dans la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement. Santé. Université Clermont Auvergne, 2024. Français. <NNT : 2024UCFA0194>. <tel-05128994>

HAL Id: tel-05128994

<https://theses.hal.science/tel-05128994v1>

Submitted on 25 Jun 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization



Université Clermont Auvergne

École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement

UFR de Médecine et des Professions Paramédicales Unité de Nutrition
Humaine – UMR 1019 Équipe ASMS

Interactions lipides-protéines issus d'oléo-protéagineux : impact sur leur digestibilité et intérêt dans la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement

Lina TOUTIRAIS

Doctorat en Biologie-Santé

Directeur/rices de Thèse : M. Stéphane WALRAND et Mme. Carole VAYSSE

Soutenue publiquement le 16 décembre 2024

Membres du jury :

Mme. Claire Gaudichon

Professeure, AgroParisTech, Université Paris-Saclay

Rapportrice

M. Jean-Michel Chardigny

Directeur de recherche, INRAE Paris

Rapporteur

M. Steven Le Feunteun

Chargé de recherche, Institut agro Rennes Angers

Rapporteur

Mme. Véronique Santé Lhoutellier

Directrice de recherche, INRAE Theix

Examinatrice

Mme. Marine Gueugneau

Chargée de recherche, INRAE, Université Clermont Auvergne

Examinatrice

M. Yves Boirie

Professeur des Université-Praticien Hospitalier, Université Clermont Auvergne

Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Mme. Claire Gaudichon, M. Steven Le Feunteun et M. Jean-Michel Chardigny, pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteur.ice.s de cette thèse, ainsi que Véronique Sante-Lhoutellier, Marine Gueugneau et Yves Boirie d'avoir accepté d'intégrer le jury en tant qu'examineur.ice.s.

À Carole et Stéphane, je vous remercie sincèrement pour votre expertise, vos conseils et la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce projet. Votre soutien a joué un rôle important dans l'accomplissement de cette thèse.

Merci également Valérie Micard et Frédéric Carrière, membres de mon comité de thèse, pour le temps que vous m'avez consacré, vos conseils et avis pertinents mais également pour vos mises en garde.

Merci à toi, Alexandre pour ton soutien pendant ces 3 années de thèse. J'ai eu la chance de t'avoir comme parrain, tu as toujours été de bon conseil, présent pour me remotiver et pour partager un verre. 😊

Je remercie chaleureusement l'équipe de nutrition d'ITERG : Leslie, Benjamin, Ikram, Corentin, Hélène et Karène, pour leur présence et leur aide précieuse. Un grand merci également à l'ensemble de l'équipe ASMS, en particulier à Christelle, Yves, Marine, Alex, Corinne, Fred, Olivier, Christophe M., Marie-Laure, Irène, Jérôme, Véro, Christophe G, Mathieu et Jérémie. Merci pour votre accueil chaleureux et vos encouragements.

Merci au bureau des "bb-thésou", pour votre joie de vivre, votre fraîcheur et vos petits mots gentils qui ont adouci mes derniers mois de thèse.

Un grand merci au bureau des "Thésou-loulous". Benjamin, merci pour tes briks au pélardon et ton accent du Sud qui évoquent les vacances ! Ophélie, tes anecdotes du CHU et ta bonne humeur ont égayé chaque mardi. Mathilde, merci d'avoir migré de bureau pendant deux mois et d'avoir apporté des rires, des ginger beers, et des conseils de chats dans ma vie. Aline (que dis-je ?), ma chère Mademoiselle Aline, tu es une personne extraordinaire. Être ta voisine de bureau a été un vrai plaisir et une source de joie. J'espère que tu viendras bientôt me rendre visite en Bretagne pour découvrir la plus belle région de France et peut-être, qui

sait, que tu voudras t'y installer ! Et enfin Lisa, que dire... tu as été ma partenaire et un vrai pilier pendant ces sombres journées et soirées de rédactions. Ton amitié a rythmé mon année à Clermont, entre un max de courses à pied, de gouters, de pintes (ou de vins chauds selon la saison), de balades, de ciné et de ralages mais aussi de discussions profondes sur la vie. Bref, je te dois énormément dans cette fin de thèse, et j'espère de tout mon cœur que nous nous reverrons après !

Un énorme merci à mes deux copines d'amour, Lola et Chloé, avec qui j'ai partagé mon bureau d'ITERG pendant quelques mois. Vous êtes devenus de véritables amies avec qui j'ai déjà partagé tant de beaux moments. Chloé, nos soirées à Rennes puis à Bordeaux et notre voyage au Canada resteront des souvenirs inoubliables. Lola, merci pour toutes ces soirées et festivals, merci pour avoir bravé la distance pour venir me voir au fin fond de la France, et merci pour ce nouvel an dingus à Londres.

Ma cloclo, ma claudus, ma claude, mon amie de toujours. Je suis infiniment chanceuse de t'avoir à mes côtés depuis tant d'années. On a tout traversé ensemble, les moments les plus sombres, mais aussi les plus joyeux pendant le collège, le lycée, la fac de bio et maintenant le doctorat ! Je pense qu'inconsciemment c'est en partie grâce (ou à cause !) de toi que j'ai fait cette thèse. Alors merci d'être toujours là.

Merci également de tout cœur à Elisabeth et Ivan, pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans votre famille. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance à mon égard depuis toutes ces années.

À mes cousins et cousines, Margot, Morgane, Lola, Martin, Chloé, et plus particulièrement Léo, mon chou, je vous aime fort et merci d'être dans ma vie. Merci aussi à Benoît, Sonia, Mamie, Papi, et Babou, pour tout votre amour et votre soutien.

Papa, merci de m'avoir toujours soutenu et d'avoir cru en moi. Merci aussi d'avoir fait semblant de comprendre ce que je te racontais quand je t'expliquais ma thèse. Merci d'être le meilleur papou du monde.

Lalou, mon loulou, mon amour, tu n'imagines pas à quel point tu es précieuse dans ma vie. Tu es l'être que j'aime le plus au monde. Tu es un véritable rayon de soleil dans ma vie et je ne te remercierai jamais assez pour tout.

Gaet, mon amour, tu as été mon roc durant toute cette thèse, et bien au-delà. Ton soutien, ton amour, ton humour, et ta patience ont été une source de force sans laquelle je n'aurais pu aller jusqu'au bout. Merci pour tout, de tout mon cœur.

Pour terminer, je dédie cette thèse à ma maman, partie beaucoup trop tôt dans la vie d'une jeune adolescente, mais dont son amour me guide toujours.

RÉSUMÉ

La demande en protéines alimentaires augmente, principalement en raison de la croissance démographique mondiale. Les ressources limitées et l'impact écologique de la production de protéines animales ont conduit à une augmentation des modalités de végétalisation de l'alimentation. Les ingrédients protéiques issus des graines oléagineuses, généralement utilisés dans l'alimentation animale, pourraient devenir une nouvelle source protéique pour l'alimentation humaine. Les oléagineux offrent un double intérêt nutritionnel en fournissant des protéines et des lipides riches en acides gras polyinsaturés (AGPI). Cependant, il est nécessaire de mieux connaître la valeur nutritionnelle de ces protéines pour pouvoir les recommander dans l'alimentation humaine, en particulier dans des situations où le besoin protéique est augmenté comme chez la personne âgée. Dans cette population, la sarcopénie est une pathologie définie par la perte de la masse musculaire et des fonctions musculaires associée à un bilan protéique net négatif. Elle peut être prévenue par une augmentation des apports en protéines de bonne qualité nutritionnelle et en AGPI. Étant riches en ces nutriments, les oléagineux pourraient jouer un rôle dans la prévention de la sarcopénie.

Ce projet de thèse vise à évaluer la valeur nutritionnelle des protéines issues oléagineux en examinant les interactions entre les lipides et les protéines et leur impact sur la digestibilité. Par la suite, le potentiel de ces protéines pour limiter la sarcopénie liée au vieillissement a été exploré.

Ces travaux ont confirmé que contrairement aux protéines de tournesol qui sont déficientes en lysine, le profil en acides aminés du colza répond aux besoins nutritionnels humains en acides aminés indispensables. La digestibilité *in vitro* des protéines de colza et de tournesol est comparable à celle du pois, soulignant leur potentiel nutritionnel. L'ajout de lipides dans les matrices protéiques oléagineuses a produit des effets variables sur la digestibilité des protéines mesurée *in vitro*, en fonction de la composition des matrices. Cet ajout a ainsi amélioré la digestibilité des protéines, notamment dans les matrices concentrées en protéines et pauvres en lipides constitutifs et en glucides. Cependant, la digestibilité lipidique de l'huile de colza était réduite lorsque des matrices protéiques ont été incorporées. Ces résultats montrent le potentiel nutritionnel prometteur des protéines oléagineuses, mais nécessitent d'être confirmés *in vivo*.

L'étude *in vivo* réalisée chez des rats âgés a démontré que la digestibilité azotée apparente, la valeur biologique et l'utilisation protéique nette étaient non significativement différentes entre les protéines de tournesol, la caséine et les protéines de pois. De ce fait, la synthèse et la dégradation musculaire, ainsi que la masse musculaire étaient équivalentes après la consommation de ces trois sources protéiques. Cependant, le métabolisme lipidique semble être perturbé par la consommation de protéines de tournesol, entraînant une accumulation intramusculaire d'acides gras libres et de diacylglycérols, ainsi qu'un gain de masse grasse. Cette dérégulation pourrait refléter une diminution de la capacité à oxyder les acides gras dans les tissus périphériques, favorisant ainsi le stockage des lipides et l'augmentation de la masse grasse. Enfin, une augmentation de l'incorporation des AGPI oméga-3 dans le muscle *plantaris* a été observée après deux mois de consommation d'un régime riche en acide alpha-linolénique, sans affecter le métabolisme protéique musculaire.

Ainsi, les protéines issues des graines oléagineuses, en particulier les protéines de colza et de tournesol, se révèlent être des sources prometteuses pour l'alimentation humaine. Leur digestibilité et leur effet bénéfique sur le métabolisme protéique musculaire, comparable à celui des protéines de pois et de caséine, en font des candidats intéressants comme nouvelles sources protéiques alimentaires.

ABSTRACT

Currently, the demand for dietary proteins is high and is expected to increase over the next decade due to global population growth. Limited resources and the ecological impact of animal protein production have led to an increase in plant-based dietary approaches. Protein ingredients from oilseeds, which are generally present in the animal feed market, could emerge as a new protein source for human nutrition. Oilseeds offer dual nutritional benefits by providing both proteins and lipids rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs). However, a better understanding of the nutritional value of proteins derived from oilseeds is needed before they can be recommended for human consumption, especially in situations where protein needs are increased, such as in the elderly. In this population, sarcopenia is a condition defined by the loss of muscle mass and muscle function, associated with a negative net protein balance. It can be prevented by increasing the intake of high-quality proteins and PUFAs. Being rich in these nutrients, oilseeds could play an important role in preventing sarcopenia.

This thesis project aims to evaluate the nutritional value of proteins from oilseeds by examining the interactions between lipids and proteins and their impact on digestibility. Subsequently, the potential of these proteins to limit age-related sarcopenia was explored.

The findings confirmed that, unlike sunflower proteins, which are deficient in lysine, the amino acid profile of rapeseed meets human nutritional requirements for essential amino acids. The *in vitro* digestibility of rapeseed and sunflower proteins is comparable to that of pea protein, highlighting their nutritional potential. The addition of lipids to oilseed protein matrices had varying effects on *in vitro* protein digestibility, depending on the composition of the matrices. Specifically, lipid addition improved protein digestibility, especially in protein-concentrated matrices low in constitutive lipids, starch, and fiber. However, the lipid digestibility of rapeseed oil was reduced when protein matrices were incorporated. These results suggest the promising nutritional potential of oilseed proteins but need to be confirmed *in vivo*.

The *in vivo* study conducted in aged rats showed that apparent nitrogen digestibility, biological value, and net protein utilization were not significantly different between sunflower proteins, casein, and pea proteins. Consequently, muscle synthesis and degradation, as well as muscle mass, were equivalent after the consumption of these three protein sources. However, lipid metabolism appeared to be disrupted by a diet based on sunflower proteins,

leading to intramuscular accumulation of free fatty acids and diacylglycerols, as well as an increase in fat mass. This dysregulation could reflect a reduced capacity to oxidize fatty acids in peripheral tissues, thus promoting lipid storage and fat mass gain. Finally, an increase in omega-3 PUFA incorporation into the *plantaris* muscle was observed after two months of a diet rich in alpha-linolenic acid, without affecting muscle protein metabolism.

Thus, proteins derived from oilseeds, particularly rapeseed and sunflower proteins, are emerging as promising sources for human nutrition. Their digestibility and beneficial effect on muscle protein metabolism, comparable to that of pea and casein proteins, make them interesting candidates as new dietary protein sources.

RÉSUMÉ GRAND PUBLIQUE

La demande en protéines augmente avec la croissance démographique mondiale. Les graines oléagineuses, comme le tournesol et le colza, sont riches en protéines et en lipides, et pourraient devenir une nouvelle source de protéines pour l'alimentation humaine. Ce projet de thèse a étudié leur valeur nutritionnelle et leur potentiel à prévenir la sarcopénie, une perte de la masse et des fonctions musculaires liée à l'âge. Les résultats montrent que ces protéines présentent une digestibilité comparable à celle du pois, et que les protéines de tournesol peuvent contribuer à prévenir la perte de masse musculaire, de manière similaire aux protéines de pois et à la caséine. Cependant, les protéines de tournesol semblent perturber le métabolisme des lipides. En conclusion, les protéines de colza et de tournesol sont prometteuses pour l'alimentation humaine, mais des recherches cliniques sont nécessaires pour confirmer leurs effets bénéfiques, notamment chez les personnes âgées.

.....

The demand for protein is increasing with global population growth, but animal protein production has a significant ecological impact. Oilseeds, such as sunflower and rapeseed, are rich in proteins and lipids and could become a new source of protein for human consumption. This thesis project studied their nutritional value and potential to prevent sarcopenia, the loss of muscle mass and function associated with aging. The results show that sunflower and rapeseed proteins have digestibility comparable to that of pea protein, and that sunflower proteins can help prevent muscle mass loss in a similar way to pea and casein proteins. However, a sunflower protein-based diet appears to disrupt lipid metabolism. In conclusion, rapeseed and sunflower proteins are promising for human nutrition, but clinical research is needed to confirm their beneficial effects, especially in older adults.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	6
Partie 1 : La digestion chez l'Homme	6
1. Le système digestif et mécanismes de digestion	6
2. Les facteurs impactant la digestibilité	11
3. Les différentes approches expérimentales pour étudier la digestion	28
Partie 2 : Qualité nutritionnelle des protéines d'oléagineux	35
1. Evaluation de la qualité des protéines	35
2. Un focus sur les oléo-protéagineux	38
Partie 3. Rôle des protéines et des lipides dans la prévention de la sarcopénie	50
1. Métabolisme protéique musculaire	50
2. La sarcopénie	55
3. Prévention par l'apport protéique	68
4. Prévention par l'apport en AGPI	74
OBJECTIFS ET STRATEGIES EXPERIMENTALES	80
Objectifs	80
Etude de la digestibilité <i>in vitro</i>	81
Etude de la digestibilité des protéines et de la synthèse protéique musculaire chez le rat	85
ARTICLE 1	88
ARTICLE 2	121
ARTICLE 3	148
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	183
1. Etude de l'influence de la composition de la matrice alimentaire sur la digestion des protéines et des lipides <i>in vitro</i> .	185
2. Etude de la qualité nutritionnelle des protéines oléagineuses	189
3. Etude de l'effet de la consommation de protéines de tournesol sur le métabolisme protéique musculaire du rat âgé	194
4. Conclusion	198
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	202
ANNEXES	226
Annexe 1 : Liste des figures	226
Annexe 2 : Liste des tableaux	228
Annexe 3 : Valorisations scientifiques	229
Annexe 4 : Revue publiée dans Food & Function	230
Annexe 5 : Revue publiée dans Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care	245

ABREVIATIONS

ABC

AA : Acide amine

AAI : Acide aminé indispensable

ADNmt : Acide désoxyribonucléique mitochondrial

AGCC : Acide gras à chaîne courte

AGL : Acide gras libre

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

AKT (ou PKB) : Protéine kinase B

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNt : Acide ribonucléique transfert

ATP : Adénosine triphosphate

BIA : impédance bioélectrique

BPN : bilan protéique net

BPN : bilan protéique net

CG : chromatographie en phase gazeuse

DEF

D2O : oxyde de deutérium

DEXA : absorptiométrie biphotonique

DH : degré d'hydrolyse

DHA : acide docosahexaénoïque

DIDGI : Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal

DPM : dégradation des protéines musculaires

DPM : dégradation des protéines musculaires

eEF2 : facteur d'élongation eucaryote 2

EPA : l'acide eicosapentaénoïque

FAN : facteur antinutritionnel

FSR : taux de synthèse fractionnaire

HJ

HPLC : La chromatographie en phase liquide haute performance

IGF1 : le facteur de croissance analogue à l'insuline 1

IL : interleukine

IRM : imagerie par résonance magnétique

mno

MAFbx : Muscle atrophy F-box

MAG : monoglycéride

mCK : créatine kinase

MG : masse grasse

MM : masse maigre

mTOR : cible de la rapamycine chez les mammifères

MuRF1 : Muscle Ring-Finger 1

NF-κB : facteur nucléaire kappa B

ONU : organisation des nations unies

OPA : Ortho-Phthalaldéhyde

P

p70S6k : protéine ribosomique S6 kinase 1

P8 MAPk : protéines kinase activée par le mitogène p38

pl : point isoélectrique

PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase

RST

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SPM : synthèse des protéines musculaires

SPM : synthèse protéique musculaire

TAG : triglycérides

TDM : tomodensitométrie

TIM : TNO Gastro-Intestinal Model

TNF α : facteur de nécrose tumorale α

INTRODUCTION GÉNÉRALE



INTRODUCTION GENERALE

Selon l'Organisation des Nations Unis (ONU), la population mondiale devrait passer de 8 milliards en 2022 à 9,7 milliards d'habitant d'ici 2050 (Nations Unies). Cette croissance démographique pose d'importants défis en matière de sécurité alimentaire et de durabilité environnementale. En particulier, répondre à la demande croissante en protéines animales s'avère complexe, car il serait nécessaire de plus que doubler la production d'ici 2050. Compte tenu des ressources environnementales limitées et de l'impact écologique de la production de protéines animales, l'ONU recommande de rééquilibrer les apports en protéines animales et végétales.

En Europe, la consommation de protéine reste majoritairement d'origine animale (environ 60%), mais tend vers une place importante des protéines végétales (FAOSTAT). Le marché des protéines végétales, longtemps considéré comme un segment de niche pour végétariens et végétaliens, devient ainsi un véritable marché stratégique pour l'industrie agroalimentaire et devrait s'intensifier à l'échelle mondiale. Cependant, malgré leur potentiel, les sources de protéines végétales consommées restent peu diversifiées, se limitant souvent au blé, au soja et au pois (Estève-Saillard 2016) (Figure 1). Dans un contexte où les ressources naturelles deviennent de plus en plus limitées, il devient essentiel d'explorer de nouvelles sources protéiques et de mieux valoriser les ressources disponibles.

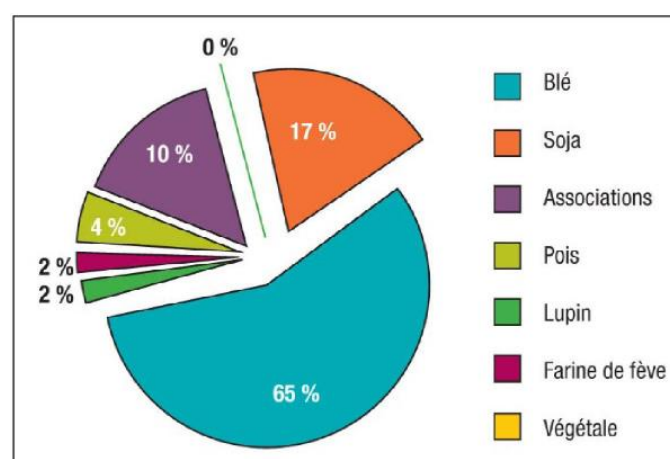


Figure 1. Part des différentes sources de protéines végétales dans les produits alimentaires en France (Estève-Saillard 2016).

Les sous-produits de l'industrie de l'huile, appelés tourteaux, sont riches en protéines, fibres et en micro-nutriments, mais sont principalement utilisés pour l'alimentation animale (Arrutia *et al.* 2020 ; Terres Univia). Dans l'Union Européenne, le soja, le tournesol et le colza sont les principaux oléagineux produits (Terres Univia). Contrairement au soja, largement intégré dans les produits alimentaires, les tourteaux de tournesol et de colza restent sous-exploités pour la consommation humaine. Cette sous-utilisation s'explique en partie par les défis industriels, tels que la présence de facteurs antinutritionnels (FAN), la complexité du fractionnement des protéines, et la teneur élevée en lipides, qui complique leur transformation et peut altérer la qualité nutritionnelle des protéines (Arrutia *et al.* 2020). Dans ce contexte, peu d'études se sont jusqu'à présent intéressées à la digestibilité des protéines de tournesol et de colza, et encore moins à l'influence de la matrice de l'ingrédient protéique sur la digestibilité de ces protéines. Pourtant, mieux comprendre ces interactions permet d'optimiser la formulation des ingrédients protéiques avec la digestibilité la plus optimale et de maximiser leur valorisation.

Ainsi, l'un des objectifs principaux de cette thèse est d'évaluer la **digestibilité des protéines issues du tournesol et du colza, *in vitro***, en les comparant à une légumineuse de référence, le pois, utilisé dans les études de digestibilité des protéines végétales pour sa bonne digestibilité. Cette recherche vise également à analyser **l'impact de la matrice alimentaire sur la digestibilité des protéines d'oléagineux**. Dans un second temps, **l'effet de la lipolyse et la présence de lipides sur la digestion des protéines, ainsi que l'influence réciproque des protéines sur la digestion des lipides** dans une matrice plus ou moins complexe, seront explorés.

Par ailleurs, la croissance démographique mondiale s'accompagne d'une augmentation rapide de la population âgée. D'ici 2050, le nombre de personnes âgées de 60 ans et plus devrait doubler, passant de 12% en 2015 à 22%, avec une proportion particulièrement élevée dans les pays développés (OMS, WHO). Dans ce contexte, la sarcopénie associée au vieillissement, caractérisée par une perte progressive et généralisée de la masse, de la force et de la fonction musculaire, est devenu un enjeu majeur de santé publique. En effet, elle affecte gravement la qualité de vie des personnes âgées et augmente le risque de morbidité et de mortalité (Cruz-Jentoft et Montero-Erasquin 2018). Plusieurs stratégies ont été proposées pour lutter contre la sarcopénie, notamment une alimentation riche en protéines (1 g de protéines/kg de poids corporel/jour), avec un profil en acides aminés indispensables (AAI) adéquat pour répondre aux besoins humains. De plus, certaines études ont montré des

effets bénéfiques encourageants des AGPI oméga 3 sur la prévention de la sarcopénie, en diminuant l'inflammation, en favorisant l'anabolisme post-prandial et en améliorant la force et la fonctionnalité musculaire (Cornish et Chilibeck 2009 ; Smith et Morton 2011 ; Cornish *et al.* 2022). Les oléagineux, riches en protéines et en AGPI, dont les oméga-3, pourraient donc représenter une stratégie intéressante pour prévenir la sarcopénie liée au vieillissement. Cependant, les protéines de tournesol et de colza sont déficientes en lysine, un AAI, comparé à la protéine de référence déterminée par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO). Il serait donc nécessaire de les compléter avec des protéines à profil en AAI complémentaire, comme celles des légumineuses.

Ainsi, dans la dernière partie de cette thèse, l'impact des **protéines d'oléagineux, en particulier celles issues du tournesol, sur la prévention de la sarcopénie liée au vieillissement** sera exploré. Pour ce faire, la **qualité nutritionnelle des protéines de tournesol** sera comparée à celles d'autres sources protéiques, telles que la **caséine et le pois, chez des rats âgés**. Par ailleurs, l'effet d'un régime **mixte associant protéines de tournesol et de pois**, ainsi que **l'apport en AGPI oméga-3** sur la qualité de ces protéines, sera également examiné. Enfin, l'influence de ces différents régimes sur le **métabolisme protéique musculaire**, indicateur clé de la santé musculaire, sera analysée chez ces animaux.

Ce travail s'articule autour d'une étude bibliographique (**Chapitre 1**) qui détaille les mécanismes de la digestion humaine, les facteurs influençant la digestibilité des protéines et des lipides, ainsi que les méthodes utilisées pour évaluer cette digestibilité (**Partie 1**). Ensuite, elle examine la qualité nutritionnelle des protéines, en mettant particulièrement l'accent sur celles issues des oléagineux (**Partie 2**). La sarcopénie est ensuite abordée, en se concentrant sur son développement et les stratégies nutritionnelles, notamment les apports protéiques et AGPI oméga-3 pour sa prévention (**Partie 3**).

La seconde partie du document est consacrée aux objectifs et aux stratégies expérimentales (**Chapitre 2**). Les chapitres suivants présentent les résultats expérimentaux obtenus : la digestibilité *in vitro* des protéines d'oléagineux (**Chapitre 3**), les interactions entre les lipides et les protéines lors de l'hydrolyse des ingrédients oléagineux (**Chapitre 4**), ainsi que la digestion *in vivo* de ces ingrédients chez le rat âgé et leur impact sur la sarcopénie (**Chapitre 5**).

Enfin, la dernière partie discute des résultats expérimentaux obtenus au cours de ces trois années de doctorat et conclut sur la qualité nutritionnelle des protéines oléagineuses,

l'importance de la matrice alimentaire sur la digestion et l'intérêt des protéines oléagineuses dans la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE



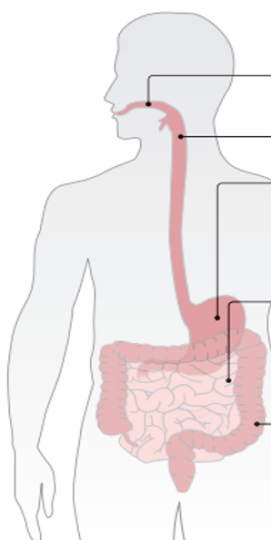
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : La digestion chez l'Homme

1. Le système digestif et mécanismes de digestion

La digestion est un processus complexe de transformation des aliments en nutriments absorbables et utilisables par l'organisme. Seule la digestion des macronutriments sera traitée car les micro-constituants ne sont pas abordés dans ce travail de thèse.

La digestion implique plusieurs réactions enzymatiques qui décomposent les polysaccharides en monosaccharides, les triacylglycérols (TAG) en acides gras libres (AGL) et en monoacylglycérols (MAG), et les protéines en peptides et acides aminés (AA). En parallèle aux réactions enzymatiques, des mécanismes mécaniques, chimiques et biologiques contribuent à la dégradation des aliments (Bornhorst et Paul Singh 2014). Les principaux mécanismes de la digestion des macronutriments sont illustrés dans la figure 2, et se divise en quatre phases principales.



Organes	Actions mécaniques	Actions biochimiques
Bouche	Mastication : rupture de la matrice alimentaire et formation du bolus Temps de transit : 10-100s	Hydrolyse enzymatique : action limitée de l' α -amylase salivaire et lipase linguale Sécrétion de salive pH : neutre
Œsophage	Péristaltisme : transport du bolus	
Estomac	Péristaltisme : formation du chyme, dégradation mécanique Filtre de la taille des particules (<2mm) Temps de transit : 1-2h	Hydrolyse enzymatique : lipase gastrique et pepsine Dénaturation des protéines avec acidité pH : acide
Intestin grêle	Péristaltisme et segmentation : transport et mélange le long de l'intestin pour faciliter l'absorption Absorption : nutriments Temps de transit : 3-4h	Hydrolyse enzymatique : Protéases : trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidase, élastase Lipases : lipase pancréatique, phospholipase Amylase : α -amylase pancréatique, amyloglucosidase pH : neutre
Côlon	Péristaltisme : transport et mélange et formation de fèces Absorption : sous produits de la fermentation et eau Temps de transit : 24-48h	Fermentation : acide gras à chaîne courte et autres sous produits pH : neutre

Figure 2. Principaux phénomènes mécaniques et biochimiques intervenant lors de la digestion chez l'Homme (Adapté de Bornhorst et Paul Singh 2014 ; Boland 2016).

Phase orale : Les aliments pénètrent dans le tube digestif par la bouche, dans laquelle débute le processus de mastication et de salivation. Cette phase est assez courte, variant de quelques secondes pour les aliments liquides jusqu'à 100s pour les aliments solides (Boland 2016). La salive, sécrétée par les glandes salivaires à raison de 1 à 1,5 litre par jour, joue un

rôle crucial dans cette étape (Fatima *et al.* 2020). Avec un pH neutre et une composition à 99,5% d'eau, d'électrolytes, et de protéines telles que les mucines et les enzymes salivaires (α -amylase salivaire et lipase linguale) (Li *et al.* 2020), la salive, combinée à la mastication, permet de transformer les aliments en *bolus* alimentaire plus ramolli, lubrifié et exposé aux enzymes digestives. Ce processus facilite ensuite le passage du *bolus* à travers l'œsophage jusqu'à l'estomac lors de la déglutition, soutenue par le péristaltisme (Van Aken 2010).

Phase gastrique : Une fois dans l'estomac, le bol alimentaire subit des transformations chimiques et physiques. L'estomac est fonctionnellement divisé en deux régions : l'estomac proximal qui agit comme réservoir et s'adapte au volume du bol, et l'estomac distal responsable de la dégradation physique des aliments (Bornhorst et Singh 2014). La motilité gastrique, contrôlée par les contractions des muscles lisses de l'estomac, permet de broyer et de tamiser les aliments solides en petites particules (Smith et Morton 2011). Elle mélange également le bol alimentaire avec les sucs gastriques, pour former une masse semi-liquide appelée chyme. Chaque jour, environ 2 litres de suc gastrique sont sécrétés par les cellules pariétales et principales de la muqueuse gastrique. Ce suc contient de l'acide chlorhydrique, qui abaisse le pH gastrique à 3-4, des ions bicarbonates et de l'eau, qui protègent l'épithélium de l'acidité, ainsi que du mucus, qui lubrifie le chyme et protège l'épithélium gastrique. Il renferme également des hormones (somatostatine, gastrine, cholécystokinine et glucagon) qui régulent la digestion, et des enzymes gastriques, dont la lipase et le pepsinogène, précurseur inactif de la pepsine (Smith et Morton 2011).

La digestion des protéines commence dans l'estomac, initiée par la pepsine. Elle est activée de manière autocatalytique à pH acide, à partir du pepsinogène, son précurseur (Erickson et Kim 1990 ; Bornhorst et Paul Singh 2014). La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques des AA aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine). Elle est responsable d'environ 15% de la digestion des protéines, avec une variabilité dépendant de plusieurs paramètres, tels que l'état et la nature des protéines, la composition de la matrice alimentaires...(Smith et Morton 2011) (*Cf* partie 1.2.b). La phase gastrique permet de dénaturer les protéines via l'acidité, exposant des sites potentiels de clivage enzymatique et facilitant ainsi leur accessibilité aux protéases intestinales (Ajomiwe *et al.* 2024). Cependant, cette phase n'est pas essentielle pour la digestion des protéines, car la digestion et l'assimilation des protéines peuvent se poursuivre même sans estomac (Erickson et Kim 1990).

La phase gastrique entraîne également une digestion limitée des lipides, représentant environ 10% (pour un repas solide-liquide) à 25% (repas liquide pré-émulsifié) (Carrière 2013).

Cette étape est malgré tout importante pour préparer les lipides à la digestion intestinale. En effet, pour augmenter la disponibilité des lipides pour l'action de la lipase pancréatique dans le duodénum, l'émulsification des lipides est nécessaire et est possible par la motilité gastrique et par la présence de composés tensio-actifs alimentaires (phospholipides (PL) et protéines) et endogènes (Gallier *et al.* 2017). De plus, la lipase gastrique est active et stable à un pH de 2 à 7 (optimal entre 4 et 5,5), elle reste donc active dans le duodénum et participe à la lipolyse intestinale (Carrière 2013 ; Gallier *et al.* 2017).

À la fin de la digestion gastrique, les particules alimentaires inférieures à 2 mm passent à travers le sphincter pylorique pour atteindre le duodénum. La vidange gastrique dure en moyenne 1 à 2 heures, dépendant de plusieurs facteurs tels que la consistance des aliments, leur composition en macronutriments, le sexe, l'âge et l'activité physique de l'individu (Li *et al.* 2020).

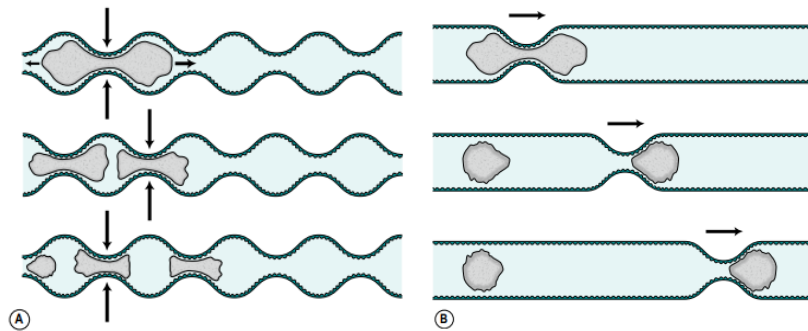


Figure 3. Motilité dans l'intestin grêle. (A) Segmentation. (B) Périlstaltisme (Smith et Morton 2011).

Phase intestinale : L'intestin grêle est le principal site de digestion et d'absorption des nutriments. Il se compose du duodénum, où se produit la majeure partie de la digestion, ainsi que du jéjunum et de l'iléon, où a lieu l'absorption des nutriments (Li *et al.* 2020). Le chyme est transporté à travers l'intestin grêle par la motilité intestinale via des contractions musculaires, appelées périlstaltisme et segmentation, prenant en moyenne 3 à 4 heures (Figure 3). L'entrée du chyme dans le duodénum stimule la sécrétion du suc pancréatique alcalin et la bile, contenant les acides biliaires et les PL, synthétisés par le foie et transportés sous forme de micelles mixtes jusqu'à l'intestin grêle (Mackie et Macierzanka 2010). Le suc pancréatique contient du mucus, des enzymes pancréatiques, communément appelées pancréatine, ainsi que du bicarbonate qui neutralise l'acidité gastrique. Au fur et à mesure de son passage dans l'intestin grêle, le pH du chyme augmente passant de 5-6 dans le duodénum

à 7-8 à l'extrémité de l'iléon, ce qui est crucial pour l'action des enzymes pancréatiques et l'absorption des nutriments (Van Aken 2010).

Pour la digestion des protéines, les cellules acineuses du pancréas sécrètent quatre enzymes protéolytiques principales, sous forme de précurseurs inactifs : trypsinogène, chymotrypsinogène, pro-élastase et pro-carboxypeptidase. Les villosités sur la surface apicale des entérocytes contiennent des entéro-peptidases qui activent les protéases pancréatiques (Rogers 2010 ; Ganapathy 2012). Une fois activées, ces enzymes hydrolysent les polypeptides en AA et petits peptides composés de 2 à 6 AA (Erickson et Kim 1990). La trypsine, la chymotrypsine et l'élastase sont des endo-peptidases spécialisées dans le clivage des liaisons peptidiques internes des protéines et des polypeptides. Chaque enzyme a une spécificité de clivage. La trypsine agit sur les liaisons peptidiques du côté carboxyle des AA basiques tels que l'arginine et la lysine, tandis que la chymotrypsine hydrolyse les liaisons peptidiques où le groupe carbonyle est associé à des AA aromatiques. Les carboxypeptidases A et B sont les principales exopeptidases présentes dans les sécrétions pancréatiques et éliminent les AA des extrémités carboxy-terminales des protéines et des oligopeptides (Erickson et Kim 1990). De plus, les tensioactifs physiologiques (acides biliaires et PL) contribuent à la protéolyse en dénaturant les protéines, ce qui les rend plus sensibles aux protéases.

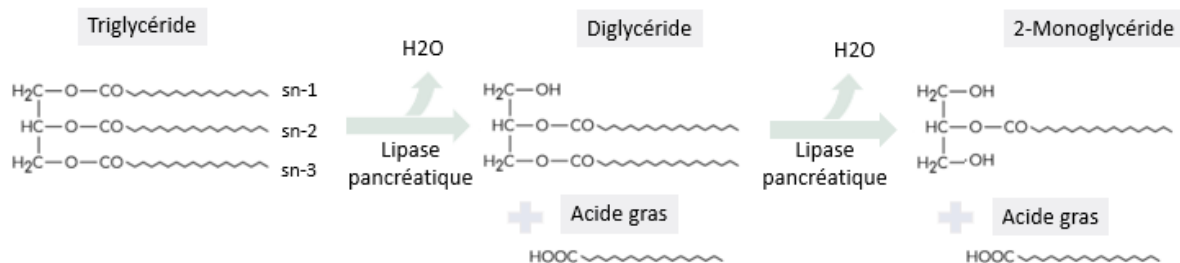


Figure 4. Digestion des triglycérides par la lipase pancréatique (Adapté de Smith et Morton 2011 ; Basile *et al.* 2024).

La lipase pancréatique contribue à 75% de l'hydrolyse des TAG (Carrière 2013). Etant hydrosoluble, son action dépend de sa capacité à s'adsorber à la surface des lipides. Les acides biliaires sécrétés sont essentiels car, de par leur nature amphiphile, ils vont se placer à l'interface des gouttelettes lipidiques et favoriser l'adsorption de la lipase pancréatique, via la formation d'un complexe avec une colipase (Gallier *et al.* 2017). La lipase pancréatique hydrolyse les TAG et DAG aux positions sn-1 et 3, pour former des 2-MAG et AGL (Figure 4).

En plus de la lipase pancréatique, la phospholipase A2, qui hydrolyse les PL et la carboxyl ester hydrolase, une enzyme lipolytique non spécifique, sont également sécrétées (Carrière 2013). Les AGL et MAG formés s'associent aux acides biliaires et aux PL pour former des micelles, facilitant leur transport vers les entérocytes pour absorption (Gallier *et al.* 2017).

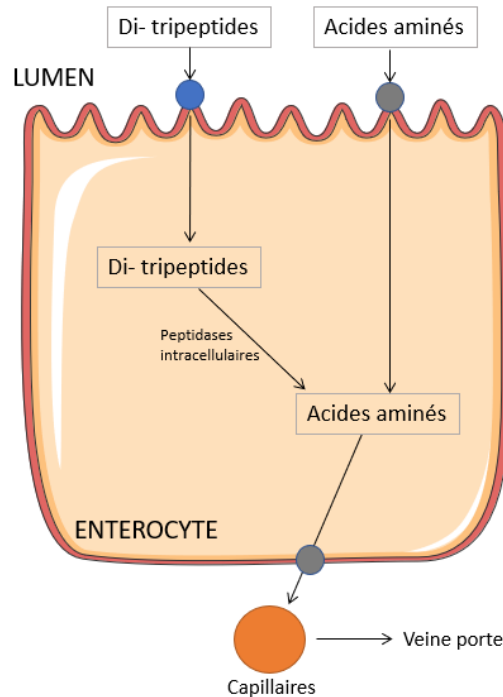


Figure 5. Mécanismes d'absorption des acides aminés (Adapté de Smith et Morton 2011 ; Basile *et al.* 2024).

Une fois hydrolysés, les produits de la digestion (AA, oligopeptides composés de 2 à 6 AA, mono et disaccharides, AG et MAG) atteignent les villosités de la paroi intestinale et sont absorbés par les entérocytes. Le transport des AA et des di et tripeptides à travers les membres des entérocytes se fait majoritairement par transporteurs actifs, puis à l'intérieur de l'entérocyte, les tri et di-peptidases hydrolysent les oligopeptides en AA, pour ensuite entrer dans le sang via la veine porte (Smith et Morton 2011 ; Basile *et al.* 2024) (Figure 5). Les AG et les MAG, se séparent de la micelle, traversent la membrane par diffusion simple, puis les AG à chaîne courte (AGCC) (<6C) et à chaîne moyenne (6C-12C) sont transportés, liés à l'albumine sérique et pénètrent comme les AA dans le système porte veineux. En revanche, les AG à longue chaîne (>12C) et les MAG sont resynthétisés en TAG dans les entérocytes puis sont associés avec du cholestérol, des lipoprotéines et d'autres lipides formant des chylomicrons. Ils pénètrent ensuite dans des canaux lymphatiques puis vers la circulation systémique (Guo *et al.* 2017 ; Basile *et al.* 2024). Les acides biliaires sont eux, absorbés et recyclés dans l'iléon.

La phase de fermentation : Certains résidus ne sont pas digérés, ou seulement partiellement, dans le tractus gastro-intestinal car ils sont résistants à l'hydrolyse enzymatique. Il s'agit principalement des fibres alimentaires composées de glucose reliées par des liaisons bêta-1,4, non hydrolysable par l'amylase, de protéines aux structures tridimensionnelles stables et toutes molécules protégées physiquement par une matrice non digestible. Ces résidus atteignent le côlon où ils sont métabolisés par le microbiote intestinal anaérobie, composé entre autre de 10^{13} bactéries chez l'adulte (Bornhorst et Singh 2014 ; Boland 2016). Environ 12 à 18g de protéines non digérées (comprenant les protéines alimentaires et endogènes) atteignent le colon chaque jour (Scott *et al.* 2013).

Dans le côlon, les fibres composant la paroi cellulaire végétale sont hydrolysées en monosaccharides, puis fermentées par les bactéries pour produire des AGCC, tels que l'acétate, le propionate et le butyrate. Ces AGCC sont bénéfiques pour la santé colique et représentent une source d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon (Grundy *et al.* 2016a). Les protéines, quant à elles, sont hydrolysées en AA et peptides par les protéases bactériennes. Ces composés sont ensuite dégradés par fermentation via des réactions de désamination et décarboxylation, conduisant à la production d'AGCC, d'AG à chaîne ramifiée, d'ammoniac, d'amines biogènes et de composés phénoliques et indoliques (Windey *et al.* 2012 ; Joye 2019).

Ce processus complexe de digestion, intégrant des interactions enzymatiques, chimiques, mécaniques et biologiques tout au long du tube digestif, assure la transformation des aliments en nutriments essentiels pour l'organisme. Cependant, la digestion dépend fortement de plusieurs paramètres, tels que l'accessibilité des enzymes digestives, de la structure de l'aliment, de la composition de la matrice alimentaire ou encore de leur propriété physico-chimique.

2. Les facteurs impactant la digestibilité

2.1. Les facteurs impactant la digestibilité des lipides

La digestion des lipides est un processus très efficace mais qui peut être impacté par plusieurs facteurs comprenant : l'état physique des lipides, la dispersion de l'huile sous forme

de gouttelettes, la composition des TAG, et la composition de la matrice alimentaire. Les parties suivantes détaillent les principaux facteurs impactant la digestibilité des lipides.

a. L'état physique

Les lipides alimentaires peuvent être consommés sous diverses formes : liquides (huile), emprisonnés dans des matrices solides, en émulsions eau dans huile ou en émulsions huile dans l'eau.

Dans les graines, les céréales et les noix, les lipides sont stockés sous forme d'oléosomes. Ces organites sphériques intracellulaires possèdent un noyau hydrophobe de TAG, stabilisé par une monocouche de PL et de protéines, principalement des oléosines (Bonsegna *et al.* 2011). L'encapsulation des lipides par les parois cellulaires et les couches d'émulsifiants peut limiter l'accès des enzymes digestives, en particulier la lipase pancréatique, aux lipides à hydrolyser (Gallier et Singh 2012 ; Grundy *et al.* 2016b). Lorsque les graines sont mastiquées seules, la plupart des parois cellulaires restent intactes et les lipides restent encapsulés et résistent à la digestion. Une mastication plus longue entraînerait une taille de particule plus petite, améliorant la bioaccessibilité des lipides et leur lipolyse (Paz-Yépez *et al.* 2019). La dégradation des parois cellulaires par la mastication ou des traitements mécaniques améliore également la biodisponibilité des lipides (Mandalari *et al.* 2008) car la concentration plasmatique des TAG après la consommation d'amandes entières était inférieure de 74% à celle observée après la consommation de farine et d'huile d'amande mélangées (Berry *et al.* 2008).

b. La dispersion sous forme de gouttelettes

Un aspect important de la lipolyse est l'adsorption de la lipase à l'interface suivie de la catalyse. Pour une lipolyse efficace, les lipides doivent être présents sous forme d'émulsion avec de petites gouttelettes, ce qui maximise la surface d'action pour les lipases. Les émulsifiants jouent un rôle crucial en stabilisant les émulsions contre l'agrégation et la coalescence, tout en permettant l'accès des enzymes aux TAG. La nature des émulsifiants détermine la stabilité de l'émulsion et donc l'efficacité de la digestion lipidique (Capuano et Janssen 2021). Il a été démontré que des émulsions stabilisées par des protéines, telles que les isolats de protéines de lactosérum, la β -lactoglobuline ou la β caséine sont moins stables

que celles stabilisées par des PL. En effet, l'hydrolyse progressive des protéines peuvent entraîner des agrégations et des coalescences des gouttelettes (Macierzanka *et al.* 2009 ; Sarkar *et al.* 2009 ; van Aken 2010). De plus, lorsque le pH atteint le pI (point isoélectrique) des protéines, la perte de charge entraîne la floculation des gouttelettes d'émulsion. Cela diminue la surface disponible pour l'action de la lipase, impactant la digestion des lipides (Day *et al.* 2014). Ainsi, la capacité de l'interface de l'émulsion à maintenir son intégrité structurale au cours de la digestion est un facteur clé de l'adsorption de la lipase à l'interface et est régulée par sa structure interfaciale.

Les lipides sous forme liquide (huile) doivent être consommés en présence d'émulsifiants adéquats pour former une émulsion stable ; sinon, l'huile non dispersée entraîne une floculation et peut flotter sur le contenu aqueux de l'estomac en raison de sa densité plus faible. Cette séparation rend les lipides moins accessibles aux enzymes digestives, comme les lipases, ce qui ralentit la lipolyse et l'efficacité de la digestion (van Aken 2010 ; Capuano *et al.* 2018b). Ainsi, l'ingestion d'une matière grasse non émulsionnée entraîne une plus faible concentration plasmatique en TAG postprandiale qu'une matière grasse émulsionnée (Lundin *et al.* 2008 ; Vors *et al.* 2013).

La forme de l'émulsion est également cruciale pour la digestion des lipides. Il a été démontré que les émulsions solides (gel) entraînent une lipolyse moins efficace que les émulsions liquides (51 % contre 81 %, respectivement). Dans une matrice solide, les gouttelettes lipidiques sont piégées dans le réseau protéique, limitant l'accessibilité des enzymes au substrat. Ainsi, la digestion des lipides dans un gel dépend de la rapidité de dégradation des protéines qui entourent les lipides (Mat *et al.* 2016).

Le type de lipides (solides ou liquides) dans une émulsion joue également un rôle important dans sa digestion. Les émulsions qui conservent une petite taille de gouttelettes après exposition aux conditions gastriques sont facilement hydrolysées. En revanche, celles qui subissent une coalescence dans l'estomac voient leur efficacité de digestion réduite. Les lipides solides dans une émulsion favorisent une coalescence plus importante des gouttelettes, ce qui diminue la lipolyse (Day *et al.* 2014 ; Steingoetter *et al.* 2015). De plus, la viscosité des repas solides ralentit le processus de flottaison par rapport aux repas liquides. Dans les échantillons semi-solides comme le fromage et le yaourt, une grande partie des lipides est rapidement évacuée dans l'intestin, facilitant leur digestion. À l'inverse, dans les échantillons liquides (émulsion huile dans l'eau), le crémage des lipides retarde leur

disponibilité et leur digestion, en raison de la coalescence des gouttelettes qui réduit la surface d'action enzymatique (Mulet-Cabero *et al.* 2017).

Enfin, l'ordre d'arrivée des composants alimentaires influence la vidange gastrique des lipides et donc leur hydrolyse. Une consommation en premier des graisses entraîne une vidange plus rapide, provoquant un déplacement des graisses vers les zones distales de l'estomac. À l'inverse, une consommation en dernier retarde cette stratification (Kunz *et al.* 2005).

c. Composition des lipides

La longueur de la chaîne et le degré d'insaturation des AG influence l'étendue de la lipolyse. Parmi de nombreux aliments étudiés, il a été découvert qu'une teneur élevée en AG saturés (AGS), et donc un point de fusion des lipides plus élevé, favorisait la lipolyse, alors que des taux élevés d'acides gras monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) la réduisent (Calvo-Lerma *et al.* 2018). De plus, la lipase pancréatique favorise la digestion des TAG à chaîne courte en raison de leur meilleure solubilité dans l'eau par rapport aux TAG à chaîne longue (van Aken 2010). Aussi, les AG à chaîne longue peuvent s'accumuler à la surface des gouttelettes lipidiques, limitant l'accès des lipases, tandis que les AGCC ou moyenne se déplacent plus facilement dans la phase aqueuse et sont facilement absorbés (Guo *et al.* 2017).

De plus, les PL alimentaire, composant des lipides membranaires ont une structure amphiphile et peuvent affecter la digestion et l'absorption des lipides. Ils améliorent la capacité des acides biliaires à former des micelles mixtes, essentielles à l'absorption des lipides à travers la membrane des entérocytes (Guo *et al.* 2017).

d. Interaction avec les composés non lipidiques

Les lipides interagissent avec d'autres composants alimentaires, tels que les protéines et les glucides, ce qui peut modifier leur niveau de digestion. Des analyses statistiques ont révélé que, dans une sélection de 52 aliments, l'interaction de la teneur en protéines avec la teneur en lipides et avec les AGS avait un effet significatif sur l'étendue de la lipolyse. Une teneur élevée en protéines peut diminuer la lipolyse dans les aliments à moyenne ou faible teneur en

lipides (inférieure à 12g/100g), alors que cet effet n'est pas observé dans les aliments riches en lipides (Calvo-Lerma *et al.* 2018).

De plus, dans un régime riche en graisses, la présence de protéines de porc et de poulet entraîne une lipolyse plus faible que celle de soja et de caséine. Cela s'explique par le fait que les protéines solubles de porc et de poulet peuvent se lier aux sels biliaires pendant la phase intestinale, réduisant ainsi leur efficacité dans la lipolyse (Ding *et al.* 2023). Dans les végétaux, les corps huileux sont liés aux protéines en raison des interactions des oléosines à la surface des corps huileux, avec les protéines de la phase aqueuse. Ainsi, dans cette étude, lorsque ces protéines coagulent dans l'estomac, les lipides sont alors piégés dans un réseau de protéines de soja (Ding *et al.* 2023). Au fur et à mesure de la digestion, les lipides sont progressivement libérés, sans coalescence grâce à la présence des PL restés à la surface, facilitant ainsi la lipolyse (Wang *et al.* 2021). De même, une étude a évalué l'effet des protéines dans une émulsion contenant de l'huile de tournesol, de la lécithine de soja et de l'isolat de pois. Les résultats montrent que les protéines réduisent l'hydrolyse des lipides dans la phase gastrique. Les globulines de l'isolat de pois, sensibles au pH acide, forment des agrégats qui piègent les gouttelettes lipidiques, entravant l'accès des lipases gastriques. Cependant, dans la phase intestinale, ces protéines agrégées sont progressivement hydrolysées, ce qui permet l'accès à la lipase pancréatique et favorise une lipolyse complète (Guevara-Zambrano *et al.* 2022).

Enfin, une étude menée par Zhou *et al.* a exploré l'effet de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur la lipolyse en utilisant un film lipidique de cristal colloïdal de silice. Au début de la lipolyse intestinale, la BSA s'adsorbe sur la couche lipidique, entravant l'accès des lipases et ralentissant ainsi la dégradation des lipides. Cependant, à des stades plus avancés, la BSA stabilise la couche lipidique et accélère la lipolyse. L'augmentation de la concentration en BSA dans la solution de lipase intensifie ce processus (Zhou *et al.* 2024). Bien que cette étude montre clairement l'influence de la BSA sur la lipolyse, elle se limite à la phase intestinale mimée *in vitro* et ne prend pas en compte la protéolyse simultanée ni les conditions de digestion gastro-intestinale réelles, ce qui aurait pu modifier l'impact observé de la BSA sur la lipolyse.

Ainsi, l'impact des interactions entre les lipides et les protéines sur la lipolyse dépend à la fois de la teneur en lipides dans la matrice alimentaire, de la source protéique et de la protéolyse simultanée.

L'amidon, comme les protéines, influencent significativement la lipolyse, en particulier dans les aliments à faible teneur en lipides (Calvo-Lerma *et al.* 2018). Les glucides tels que l'amidon et les fibres peuvent altérer les propriétés physico-chimiques de l'intestin, notamment en augmentant la viscosité et en perturbant l'émulsification des lipides. Cela affecte la liaison des sels biliaires et des lipases, réduisant ainsi la digestibilité des lipides (Grundy *et al.* 2016a ; Calvo-Lerma *et al.* 2018 ; Capuano et Janssen 2021).

De plus, les fibres peuvent former un revêtement polymère à la surface des gouttelettes lipidique, empêchant l'adsorption de la lipase (Grundy *et al.* 2016a). Dans une autre étude, la digestion des lipides dans un analogue de viande de bœuf haché, principalement composé d'eau, de concentré de soja texturé et d'huile de canola, s'est avérée inférieure à celle observée dans un échantillon de bœuf haché. Ce phénomène a été attribué à la présence de fibres alimentaires dans l'analogue (Zhou *et al.* 2021). En effet, les fibres peuvent favoriser la floculation des gouttelettes lipidiques, interagir avec les sels biliaires et les AG libres, et ainsi réduire la digestion des lipides (Espinal-Ruiz *et al.* 2014). De plus, certaines fibres peuvent interagir directement avec les enzymes digestives, telles que la lipase pancréatique, affectant leur activité (Tsuji *et al.* 2007).

Ainsi, la digestibilité des lipides dépend de nombreux facteurs interdépendants, notamment la structure des aliments, les traitements mécaniques et thermiques, l'état physique et l'émulsification des lipides, leur composition chimique, et les interactions avec d'autres composants alimentaires.

2.2. Les facteurs impactant la digestibilité des protéines

La complexité des protéines réside dans leur composition en groupes fonctionnels, qui affectent leur structure. De nombreuses forces telles que les liaisons hydrogènes, disulfure, les interactions hydrophobes, électrostatiques et de van der Waals sont impliquées dans la stabilité de la structure des protéines et sont capables d'interagir avec d'autres protéines ou d'autres composants de la matrice (Turgeon et Rioux 2011). Ainsi, la digestibilité des protéines varie considérablement selon de nombreux paramètres, internes et externes, tels que leur profil en AA, leur structure, la zone de contact entre le substrat et l'enzyme, ainsi que la présence de facteurs non protéiques dans la matrice alimentaire.

a. Le profil en AA

Les peptidases présentent souvent une spécificité d'hydrolyse pour les liaisons peptidiques. Ainsi, la composition en AA des protéines dicte la sensibilité d'une protéine à être hydrolysée. La pepsine, hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant des AA aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine), ainsi que la leucine et la méthionine. De même, la chymotrypsine provoque l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre les AA aromatiques et la trypsine cible principalement les liaisons peptidiques impliquant l'arginine et la lysine (Ganapathy 2012 ; Maeda *et al.* 2022). Cependant, la lysine est sensible aux réactions de Maillard en présence de sucre, ce qui peut réduire sa disponibilité et par conséquent, la digestibilité des protéines contenant de la lysine (Ajomiwe *et al.* 2024). De même, la cystéine est vulnérable non seulement aux réactions de Maillard mais aussi à l'oxydation, ce qui peut altérer la structure des protéines et affecter leur hydrolyse enzymatique (Ajomiwe *et al.* 2024). La présence de proline dans les chaînes protéiques réduit leur flexibilité, rendant ces protéines plus résistantes à la protéolyse (Joye 2019).

b. Les sources de protéines : animales versus végétales

Les différences de digestibilité entre les protéines animales et végétales sont bien documentées dans la littérature. Les protéines animales, telles que celles présentes dans la viande, les œufs et le lait, affichent généralement une digestibilité supérieure, au-dessus de 90%, tandis que celle des protéines végétales varie entre 80% et près de 100% (Ismail *et al.* 2020).

Cette différence de digestibilité est en grande partie due à la présence de FAN et de fibres dans les matrices des protéines végétales, qui créent une résistance à la protéolyse (Cf Partie 1.2.2.e) (Sá *et al.* 2020b). De plus, les protéines végétales et animales diffèrent considérablement par leur organisation structurale, en raison de séquences polypeptidiques et d'environnements natifs différents (Xie *et al.* 2022). Les protéines végétales sont majoritairement des protéines de réserve, souvent encapsulées dans des parois cellulaires rigides qui limitent l'accès des enzymes protéolytiques (Cf Partie 1.2.2.c). De plus, elles sont généralement plus riches en feuillets bêta que les protéines animales. Or, les structures en feuillets β hydrophobes rendent résistantes les protéines à la digestion en raison de la formation de liaisons entre les protéines, créant des d'agrégats qui stabilisent leur structure (Carbonaro *et al.* 2012 ; Bai *et al.* 2016). À l'inverse, les protéines animales possèdent des structures plus variées et sont globalement plus solubles et flexibles, ce qui facilite leur

digestion. Par conséquent, les analogues de viande à base de protéines végétales, composées de soja, pois, riz ou d'haricot, présentent une digestibilité inférieure à celle des protéines animales de bœuf ou de porc. Cela s'explique non seulement par les différences de structure protéique (protéines globulaires végétales contre protéines fibreuses de viande), mais aussi par la présence de composés non protéiques dans les analogues, tels que des lipides, de l'amidon et des fibres (Zhou *et al.* 2021 ; Xie *et al.* 2022). Dans les prochaines parties, nous allons nous concentrer sur les protéines végétales.

c. Structure des protéines

La structure des protéines joue un rôle crucial dans leur résistance à la dégradation mécanique et à l'hydrolyse chimique, en influençant l'accessibilité des sites de clivage par les enzymes digestives.

Une digestion limitée par les enzymes gastriques et intestinales a été associée à des niveaux élevés de conformations β secondaires, en raison de leur forte hydrophobicité (Bai *et al.* 2016 ; Martínez-Velasco *et al.* 2018 ; Ding *et al.* 2022). Les interactions hydrophobes contribuent à stabiliser les structures natives des protéines globulaires, constituant un obstacle physique qui limite l'accessibilité des enzymes digestives aux liaisons peptidiques, faisant de la structure secondaire un bon indicateur de la digestibilité (Joye 2019).

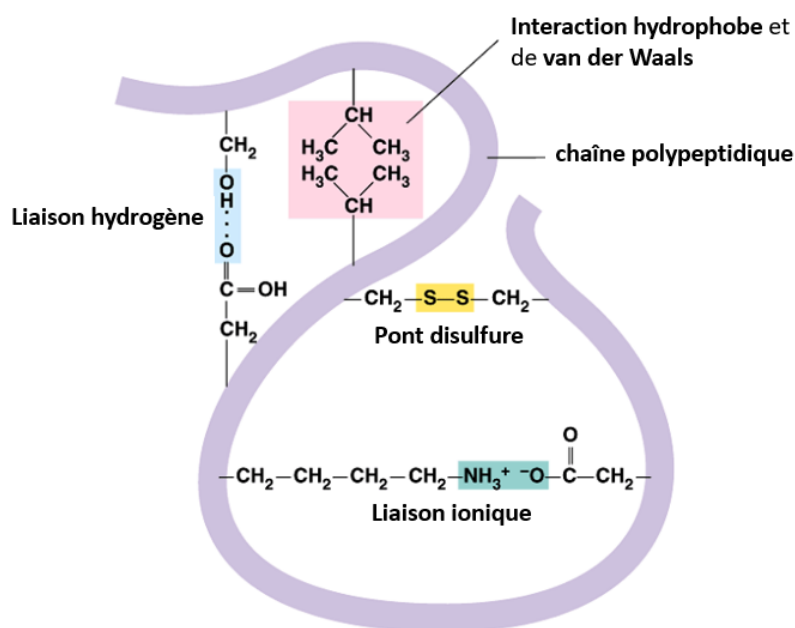


Figure 6. Les différentes interactions au sein d'une chaîne polypeptidique formant la structure tertiaire des protéines.

En plus des interactions hydrophobes, les liaisons hydrogènes, ioniques, les ponts disulfures et les interactions de van der Waals, contribuent à la stabilité des protéines (Mahler *et al.* 2009) (Figure 6). Ainsi, les protéines présentant une structure globulaire ou un noyau hydrophobe, telles que les protéines de stockage des graines, montrent généralement une résistance à la protéolyse. En revanche, les albumines peuvent parfois présenter une forte résistance à l'hydrolyse dû à la présence de facteur anti-trypsine. De plus, les protéines de faible poids moléculaire contenant un nombre élevé de liaisons disulfures, particulièrement celles riches en cystéine, sont stables et résistantes à la protéolyse. C'est le cas, par exemple, des albumines de tournesol et de colza (Beaubier *et al.* 2025).

Cette structure tertiaire des protéines peut être altérée par le pH acide de l'estomac et par divers procédés, tels que la chaleur ou le cisaillement, entraînant une dénaturation des protéines. Cette dénaturation peut augmenter leur digestibilité en rendant les sites de clivage enzymatique plus accessibles (Peram *et al.* 2013 ; Zahir *et al.* 2018), mais peut aussi exposer les régions hydrophobes des protéines, conduisant à la formation d'agrégats résistants à la digestion (Ajomiwe *et al.* 2024). L'impact des procédés de transformation sur la qualité des protéines sera abordé dans la partie 2.2.b.

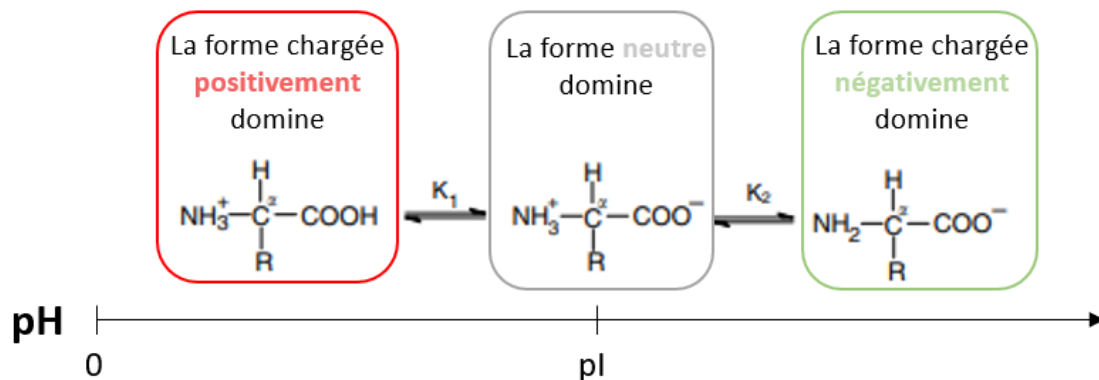


Figure 7. Charges dominantes des acides aminés selon le pH environnant (Adapté de Damodaran 2007).

pI : point isoélectrique ; K = pK : constante de dissociation.

De plus, les groupes fonctionnels amine (NH₂), carboxyle (COOH) et sulfhydrile (SH) présents sur les AA peuvent affecter leur structure car, s'ils sont chargés, ils peuvent favoriser les interactions électrostatiques avec d'autres molécules chargées, tels que d'autres protéines ou d'autres nutriments (Mahler *et al.* 2009). Ces interactions peuvent influencer la structure

tridimensionnelle des protéines et leur digestibilité. Par exemple, une forte interaction électrostatique peut stabiliser la structure secondaire et tertiaire des protéines, affectant leur dégradation par les enzymes digestives. La charge de ces groupes fonctionnels dépend du point isoélectrique (pI) de la protéine et du pH du milieu (Gilani *et al.* 2012 ; Mat *et al.* 2018) (Figure 7). Ainsi, l'environnement acide de l'estomac ou neutre de l'intestin peut provoquer des changements structuraux des protéines et impacter leur digestibilité (van Aken *et al.* 2011).

d. Structure cellulaire

Les protéines végétales dont les graines, les noix et les céréales, sont souvent encapsulées dans des matrices composées de parois cellulaires, constituées de lipides et de polysaccharides indigestibles (Bryan et Classen 2020 ; Capuano et Janssen 2021). Le degré d'intégrité de ces parois affecte fortement la digestibilité des protéines. En effet, la digestibilité des protéines de soja encapsulée dans les cellules intactes isolées de cotylédons ont une digestibilité inférieure aux protéines extraites de ces cellules (Zahir *et al.* 2018). Ainsi, plus la paroi cellulaire est rompue, plus les protéines sont disponibles pour les enzymes et plus leur digestibilité augmente (Mandalari *et al.* 2008). La digestibilité est donc supérieure dans les farines, concentrats et isolats par rapport aux graines entières, car les parois cellulaires sont dégradées (Capuano *et al.* 2018a) De plus, la taille des particules influence la digestibilité des protéines, car les enzymes protéolytiques accèdent plus facilement aux protéines dans des petites particules (Paz-Yépez *et al.* 2019).

e. Composition de la matrice

La digestibilité des protéines est également affectée par les autres composants présents dans la matrice alimentaire.

- **Les lipides**

Les lipides jouent un rôle complexe et crucial dans la digestibilité des protéines, bien que cela soit encore peu compris. Selon la littérature, leur impact varie selon plusieurs facteurs : la source protéique, le type de lipides, les méthodes de traitement des aliments et la forme sous laquelle les aliments sont consommées. L'interaction entre les lipides et les protéines est

multifactorielle et, selon les circonstances, elle peut soit favoriser la digestibilité des protéines, soit la réduire (Tableau 1).

Les protéines alimentaires sont des molécules amphiphiles, ce qui signifie qu'elles possèdent à la fois des régions hydrophobes et hydrophiles. Cette caractéristique joue un rôle central dans la manière dont les protéines interagissent avec les lipides. Selon leur composition en AA et leur structure tridimensionnelle, les protéines peuvent former des liaisons avec les lipides qui affectent leur agrégation et, par conséquent, leur digestibilité. Les AA non polaires, notamment les AA aromatiques et les AA aliphatiques à longue chaîne, favorisent les liaisons hydrophobes et l'agrégation des protéines lorsqu'ils sont exposés à la surface des protéines (Promeyrat *et al.* 2013). L'ajout de lipides à une matrice protéique pourraient donc entraîner l'interaction entre les lipides et ces AA via des interactions hydrophobes (Zhou *et al.* 2019), diminuant les agrégations entre les protéines et de ce fait, améliorer leur digestibilité (Ding *et al.* 2022). Dans l'étude de Ding *et al.*, il a été observé que l'ajout de graisses dans un régime complet, cuit puis broyé, influence la digestibilité des protéines selon la source. Les protéines de poulet et de porc ont montré une augmentation de leur digestibilité (environ 10% et 20% respectivement) dans un régime riche en graisses, tandis que la caséine et les protéines de soja n'ont pas montré de changement significatif. Ces différences s'expliquent par le niveau du déploiement structurel des protéines et le degré d'exposition des groupes hydrophobes (Ding *et al.* 2022). Les protéines de soja et de caséine, lorsqu'elles sont dénaturées par un traitement thermique, voient leurs groupes hydrophobes exposés. L'ajout de lipides dans ces conditions peut renforcer les structures en feuillet β , qui sont connues pour être résistantes à la digestion enzymatique (Ding *et al.* 2022). A l'inverse, si les protéines ne sont pas dénaturées, l'ajout de lipides augmente l'exposition des groupes hydrophobes et les interactions entre les lipides et les protéines et améliore le déploiement des protéines à la surface des gouttelettes lipidiques (Zhou *et al.* 2019).

De plus, les lipides peuvent influencer la digestibilité des protéines en interférant avec l'accessibilité des protéases aux protéines. Dans l'étude de Guevara-Zambrano *et al.*, la présence de lipides sous forme d'émulsion n'a pas affecté la cinétique de digestion des protéines d'isolat de pois pendant les phases gastrique et intestinale, comparée à une solution protéique. Les protéases n'ont pas eu à diffuser à travers des gouttelettes lipidiques pour atteindre les protéines, ce qui a permis une digestion normale (Guevara-Zambrano *et al.* 2022). À l'inverse, la présence de lipides peut parfois compliquer l'accès des enzymes digestives aux protéines. Dans l'étude de Zahir *et al.*, l'inhibition de la lipase pancréatique a

montré que la digestibilité des protéines de soja, présentes dans les cellules isolées de cotylédon, passait de 37% à 29%. Cette diminution suggère que l'hydrolyse des lipides par la lipase est essentielle pour libérer les sites de liaison des protéases sur les protéines, permettant ainsi leur digestion efficace. Sans cette lipolyse, les lipides peuvent recouvrir les protéines et bloquer les sites de clivage (Zahir *et al.* 2018). De plus, Zhou *et al.*, ont comparé la digestion de protéines d'un analogue de viande de bœuf, composé principalement de concentrat de soja texturées et d'huile de canola, avec celle du bœuf véritable. La digestion gastrique était plus efficace pour l'analogue (15,8% pour les protéines de l'analogue vs 8,9% pour les protéines de bœuf), probablement parce que dans le bœuf, les protéines sont associées aux lipides, compliquant l'accès des enzymes digestives comme la pepsine. Cependant, dans l'intestin grêle, où les lipides sont digérés par les lipases, la surface des protéines exposées aux protéases est augmentée, ce qui améliore finalement la digestion protéique du bœuf par rapport à l'analogue (Zhou *et al.* 2021).

Les protéines végétales subissent généralement des procédés de transformation pour améliorer leur fonctionnalité ou leur qualité nutritionnelle. Cependant, lors des procédés de transformation des aliments, les lipides peuvent s'oxyder, ce qui entraîne la formation de radicaux libres et d'hydroperoxydes. Ces composés oxydés peuvent interagir avec les protéines, altérant leur structure et modifiant ainsi leur digestibilité (Cofrades et Jiménez-Colmenero 1998 ; Estévez et Luna 2017). L'oxydation des lipides est particulièrement problématique dans les aliments riches en AG insaturés, qui sont plus susceptibles de subir une oxydation. Dans l'étude de Chen *et al.*, il a été observé que la digestibilité *in vitro* des protéines d'extrudât d'isolat de pois diminuait en présence d'AG oxydés. Plus précisément, la digestibilité a diminué de 85% à 78%, 73%, ou 71% avec l'ajout d'acide stéarique, oléique, et linoléique, respectivement. Cette réduction est attribuée à l'interaction des produits de l'oxydation lipidique avec les protéines, qui conduit à une agrégation accrue ou à une modification des sites de liaison enzymatiques (Chen *et al.* 2022). L'effet de l'oxydation lipidique sur la digestibilité des protéines dépend cependant de l'ampleur de l'oxydation. Zhao *et al.*, ont montré qu'une oxydation modérée n'avait pas d'impact significatif sur la protéolyse gastrique de l'isolat de soja, alors qu'une oxydation sévère réduisait la digestibilité en raison de l'accumulation de dommages oxydatifs sur les protéines (Zhao *et al.* 2020).

Les lipides sont donc généralement extraits avant les procédés de transformation des protéines afin de limiter l'oxydation et de ne pas altérer le goût des aliments. Cependant, le procédé d'extraction des lipides des graines avec des solvant peut également influencer la

digestibilité des protéines en modifiant leur structure. Par exemple, l'extraction de l'huile par hexane a diminué la digestibilité des protéines de bœuf de -20,5%, probablement en dénaturant les protéines et en favorisant l'agrégation par des liaisons disulfures (Lee *et al.* 2021). Pour les protéines de larves d'insectes, le dégraissage à l'hexane n'a pas eu d'effet délétère sur la digestibilité, mais a au contraire activé des protéases contenues chez les insectes, facilitant ainsi la digestion (Lee *et al.* 2021). En revanche, l'extraction des lipides à l'éther n'a pas modifié la digestibilité de plusieurs protéines animales et de soja (Sant'Ana *et al.* 2011), illustrant que l'effet de l'extraction lipidique est spécifique à chaque type de protéine et de solvant.

Ainsi, l'effet des lipides sur la digestibilité des protéines est complexe et dépend de nombreux facteurs. La compréhension approfondie de ces mécanismes est essentielle pour le développement de produits alimentaires optimisés pour la nutrition humaine et mérite d'être mieux étudié.

- **Les polysaccharides**

Les polysaccharides sont des glucides complexes présents dans les végétaux, principalement sous forme d'amidon (réserve de glucose dans les plantes) et de fibres. Les fibres, qui ne peuvent être hydrolysées par les enzymes humaines, sont fermentées par le microbiote intestinal. Parmi les fibres végétales, on trouve la cellulose, l'hémicellulose, la pectine et la lignine, qui composent la paroi cellulaire des plantes, ainsi que les gommés et les mucilages (Korczak et Slavin 2020).

L'association entre les protéines et les polysaccharides s'effectue principalement par des interactions électrostatiques, qui dépendent en partie du pH. Cette association permet de moduler les propriétés techno-fonctionnelles des protéines. Par exemple, l'association entre la protéine et le mucilage de graines de lin empêche les agrégations et améliore la solubilité près du pI (Nikbakht Nasrabadi *et al.* 2019). De plus, l'ajout de fibres, telle que la pectine, permettrait de masquer l'amertume des protéines végétales (Yavuz-Düzgün *et al.* 2020). Ainsi, pour ces raisons et pour leurs propriétés structurantes et épaississantes, les polysaccharides sont couramment ajoutés aux préparations alimentaires.

Cependant, leur présence dans une matrice alimentaire peut réduire la digestibilité des protéines, selon le type de polysaccharides et leur concentration (Capuano et Janssen 2021).

Tableau 1. Les effets des lipides sur la digestibilité des protéines.

Source protéique	Source lipidique	Forme de l'ingrédient	Résultats à retenir	Références
β -caséine flexible	Huile olive	Emulsion/Solution	Le taux de digestion gastrique de la β -caséine adsorbée était deux fois plus rapide qu'en solution.	(Macierzanka <i>et al.</i> 2009)
β -lactoglobuline	Huile de soja	Émulsion	L'hydrolyse par la pepsine de la protéine adsorbée était plus importante en comparaison avec la digestion très limitée de la β - lactoglobuline native.	(Sarkar <i>et al.</i> 2009)
Isolat de protéines de pois	L'huile de tournesol à haute teneur en acide oléique	Émulsion	La présence de lipides dans un shaker sous forme d'émulsion n'a pas affecté la cinétique de digestion des protéines d'isolat de pois pendant les phases gastrique et intestinale, par rapport à une solution protéique.	(Guevara-Zambrano <i>et al.</i> 2022)
Isolat de protéine de pois	Acide stéarique, l'acide oléique et l'acide linoléique	Extrudât	L'ajout d'AG avant une extrusion de protéines de pois a diminué la digestion <i>in vitro</i> des protéines, et l'ampleur était d'autant plus importante avec un degré d'insaturation des AG élevé	(Chen <i>et al.</i> 2022)
Protéine de poulet, porc, isolat de soja, caséine	Graisse de porc	Régime complet broyé	Dans un régime riche en graisses, l'impact des lipides sur la digestibilité des protéines dépendait du type de protéines, de leurs propriétés émulsifiantes, ainsi que de la structure secondaire des protéines. Ainsi, l'augmentation de la teneur en matières grasses a amélioré la digestibilité des protéines de porc et de poulet, mais n'a eu aucun effet sur la caséine et les protéines de soja	(Ding <i>et al.</i> 2022)
Isolat de soja	Acide linoléique	Solution	Diminution de la libération d'AA lors de la protéolyse de l'isolat de soja en présence d'acide linoléique. Une oxydation modérée des lipides n'avait pas d'impact sur la libération des AA libres lors de la protéolyse, à l'inverse d'une oxydation sévère	(Zhao <i>et al.</i> 2020)
Plusieurs sources de protéines animales et végétales	Lipides présents dans l'aliment brut	Echantillon dégraissé	Pas de différence de digestibilité protéique entre les ingrédients dégraissés à l'éther et les ingrédients non dégraissés	(Sant'Ana <i>et al.</i> 2011)
Concentrat de soja texturés	Huile de canola	Analogue végétal de bœuf haché	Meilleure digestibilité protéique de l'analogue que la viande bœuf dans la phase gastrique en raison d'un réseau protéine-lipide dans le bœuf, peu accessible aux protéases	(Zhou <i>et al.</i> 2021)

Tableau 1. Suite.

Source protéique	Source lipidique	Forme de l'ingrédient	Résultats à retenir	Références
Farine de soja extrait à l'hexane	Huile de soja oxydée	Farine	Les échantillons contenant de l'huile oxydée ont montré une digestibilité des protéines significativement plus faibles que ceux contenant de l'huile non oxydée. La dénaturation des protéines en présence d'huile oxydée favorisent la formation de complexes lipides-protéines et réduit la digestibilité des protéines	(Taha et Mohamed 2004)
Graines de lin	Lipides présents dans l'aliment brut	Farine	L'extraction de l'huile par l'hexane a amélioré la digestibilité des protéines de lin.	(Marambe <i>et al.</i> 2013)
Protéines de bœuf et de larve d'insectes	Lipides présents dans l'aliment brut	Echantillon lyophilisé	L'extraction de l'huile par hexane a diminué significativement la digestibilité des protéines de bœuf, sans effet notable sur les protéines de larves d'insectes	(Lee <i>et al.</i> 2021)
Protéines de soja	Lipides présents dans le soja	Cellules cotylédones	Le DH des protéines de soja présente dans les cellules isolées de cotylédon, passe de 37% à 29% en présence d'un inhibiteur de la lipase pancréatique.	(Zahir <i>et al.</i> 2018)
β -caséine	Huile de colza	Emulsion/Solution	Digestion gastrique plus lente de β -caséine dans une émulsion d'huile de colza que dans une solution. Le séquençage N-terminal des peptides a révélé que les lipides interagissent avec la β -caséine, altérant ainsi son clivage par la pepsine.	(Sams <i>et al.</i> 2018)
Lactosérum et caséinate de sodium	Lait maternel simulé composé d'huile de palme, de coco, de soja et de saindoux +/- lécithine de soja	Emulsion	L'incorporation de 5% (p/p d'huile) de lécithine de soja dans la préparation infantile a augmenté la digestibilité des protéines tant au niveau gastrique qu'intestinal, comparativement à une émulsion sans lécithine. La présence de lécithine a permis de stabiliser l'émulsion, prévenant ainsi la floculation qui aurait réduit la surface spécifique des protéines disponible pour le contact avec les enzymes digestives.	(Zhu <i>et al.</i> 2021)
β -lactoglobuline bovine	Phosphatidylcholine	Solution	L'ajout de phosphatidylcholine n'a pas affecté la pepsinolyse gastrique de la β -lactoglobuline bovine mais a diminué la protéolyse intestinale, si la protéine est sous sa forme native. Il a été suggéré que la phosphatidylcholine se lie au site de liaison des AG dans la β -lactoglobuline bovine, bloquant l'action des protéases pour des raisons stériques	(Mandalari <i>et al.</i> 2009)

Il a été rapporté que les gommes (Chen *et al.* 2020), la pectine, la cellulose, la lignine (Ye et Yu 2024) et l'amidon (Opazo-Navarrete *et al.* 2019) peuvent diminuer la digestion des protéines. Plusieurs mécanismes expliquent ce phénomène (Hu *et al.* 2013) :

1. Augmentation de la viscosité du digesta : cela crée une barrière physique entre l'enzyme et le substrat, ralentissant également la vidange gastrique et diminuant la vitesse de digestion des protéines.
2. Formation de complexe protéines-fibres *via* l'interaction des groupes carboxyle et amine des protéines avec les groupes chargés négativement des polysaccharides.
3. Inhibition directe de l'activité des enzymes protéolytiques.

- Les facteurs antinutritionnels (FAN)

Les FAN sont des composés chimiques synthétisés par diverses espèces végétales comme mécanisme de défense contre diverses formes d'attaques (bactériennes, microbiennes, etc.) (Kadam *et al.* 2021). Ces facteurs peuvent réduire la digestibilité des protéines en interagissant soit physiquement avec les protéines et les enzymes, ce qui inhibe l'action des protéases, soit chimiquement, ce qui conduit à la production de produits non digestibles (Duodu *et al.* 2003). Les principaux FAN présents dans les plantes qui limitent la digestibilité des protéines sont les inhibiteurs de protéase, les composés phénoliques et l'acide phytique (Sá *et al.* 2020b) (Figure 8).

L'acide phytique se concentre dans les graines de plantes et est considéré comme un puissant anti-nutriments. En effet, la molécule de phytate est fortement chargée négativement avec six groupes phosphates et constitue donc un excellent chélateur, formant des complexes insolubles avec des ions chargés positivement et des protéines. De plus, ils entravent l'activité des protéases (Duodu *et al.* 2003 ; Samtiya *et al.* 2020).

L'effet inhibiteur des polyphénols, et notamment les tannins, sur la digestibilité des protéines provient de leur capacité à interagir via leurs groupes hydroxyles ou par des interactions hydrophobes avec les protéines alimentaires, entraînant des changements de conformation et formant des complexes moins accessibles aux enzymes et donc moins digestibles (Duodu *et al.* 2003). De plus, ces complexes provoquent l'inactivation d'enzymes digestives comme les protéases (Joye 2019).

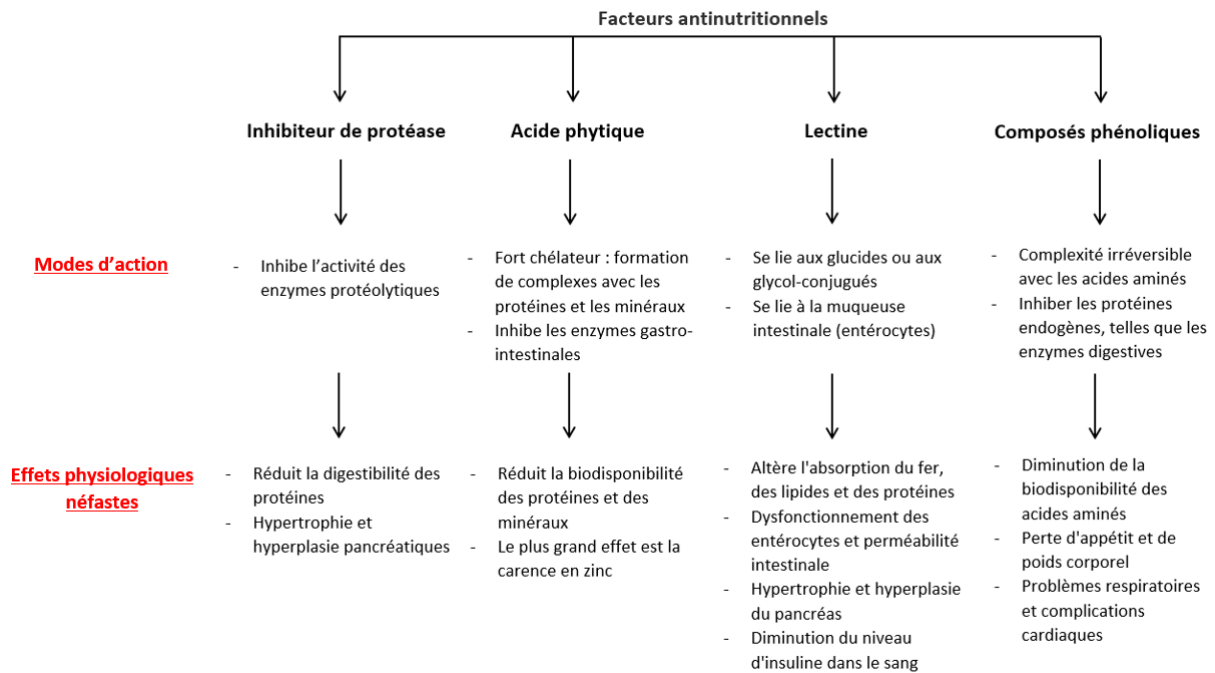


Figure 8. Principaux facteurs antinutritionnels – modes d’actions et effets néfastes sur la santé humaine (Adapté de Hahm *et al.* 2013 ; Mattila *et al.* 2018 ; Samtiya *et al.* 2020 ; Kadam *et al.* 2021)

Les inhibiteurs de protéase (par exemple, les inhibiteurs de trypsine) altèrent la digestibilité des protéines en interagissant avec les protéases et en limitant leur efficacité en bloquant le site actif de l’enzyme (Samtiya *et al.* 2020).

En plus de réduire la digestibilité et la biodisponibilité des nutriments, les FAN peuvent également devenir toxiques lorsqu'ils sont consommés en quantités excessives. La figure 8 montre les modes d'action et les effets indésirables des principaux FAN présents dans les graines oléagineuses sur la santé humaine. Cependant, ces FAN, également connus sous le nom de "métabolites secondaires" chez les plantes, peuvent également avoir des effets bénéfiques pour la santé, tels que la prévention ou la lutte contre l'obésité, le diabète, les taux élevés de cholestérol sanguin et le cancer (Soni *et al.* 2022).

Néanmoins, il est nécessaire de réduire la teneur en FAN dans les aliments protéiques végétaux afin de limiter leurs effets délétères et d'augmenter la qualité nutritionnelle des protéines. Cela peut être réalisé par différentes méthodes de traitement telles que le décorticage, le chauffage, le trempage, la germination et la fermentation, qui seront décrites dans la partie 2.2.b. et appliquées aux graines oléagineuses (Moure *et al.* 2006 ; Duodu *et al.* 2018).

Ainsi, la digestibilité des protéines est influencée par de nombreux facteurs interdépendants. Elle dépend non seulement de la structure initiale de l'aliment avant ingestion, mais aussi de celle qui se forme au cours du processus digestif, comme la coagulation ou l'agrégation dans l'estomac. De plus, la source des protéines, leur composition spécifique, les traitements qu'elles ont subi avant consommation, ainsi que la présence d'autres composants alimentaires jouent un rôle crucial dans la façon dont elles sont dégradées et assimilées par l'organisme. Ces éléments combinés déterminent l'efficacité globale de la digestion des protéines.

3. Les différentes approches expérimentales pour étudier la digestion

La digestion est un processus complexe comportant de nombreux paramètres, ce qui complique son étude pour les chercheurs. Pour l'explorer, trois principales approches expérimentales sont utilisées : les méthodes *in vivo* sur des organismes vivants (Gaudichon 2013), les approches *in vitro* qui simulent les conditions biologiques (Li *et al.* 2020), et les approches *in silico* qui utilisent des simulations informatiques pour prédire les résultats (Le Feunteun *et al.* 2021). Nous nous concentrerons uniquement sur les deux premières approches.

3.1. Méthodes *in vivo* : humaine et animale

Comprendre l'effet de la digestion en lien avec d'autres paramètres corporels, notamment dans le cadre de pathologies telles que le diabète, l'obésité et la sarcopénie, nécessite une étude approfondie chez l'humain. Cependant, l'accès au contenu digestif pose des défis. Diverses méthodes sont utilisées pour étudier la digestion comprenant des approches directes, telles que l'accès au tube digestif par prélèvement, et des méthodes indirectes, comme l'analyse des cinétiques d'apparition des nutriments (Gaudichon 2013).

La collecte directe et non invasive des effluents intestinaux est rendue possible chez les patients iléostomisés, bien que ces individus présentent généralement des pathologies digestives et ne sont donc pas considérés comme étant en bonne santé. Chez des volontaires sains, l'utilisation de dispositifs invasifs comme des sondes naso-gastrique ou intestinales permet d'accéder au chyme gastrique ou intestinal pour mesurer la présence et la quantité de nutriments à différents intervalles de temps (Gaudichon 2013).

Des techniques d'imagerie avancées, telles que l'IRM ou l'échographie, sont capables de mesurer des phénomènes spécifiques tels que la vitesse de la vidange gastrique (Gaudichon 2013). Enfin, l'utilisation d'isotopes stables (^2H , ^{13}C , ^{15}N), incorporés dans des nutriments spécifiques, puis ingérés, peuvent être utilisés pour étudier le métabolisme et le devenir des nutriments dans l'organisme. Cela permet d'estimer la biodisponibilité des nutriments à partir de la cinétique d'apparition du traceur dans le sang (Delarue et Beylot 2007 ; Bandyopadhyay *et al.* 2022).

L'étude de la digestion directement chez l'Homme est importante mais de nombreuses contraintes techniques et économiques existent. Ainsi, le recours à des modèles animaux, plus ou moins proches de l'Homme, est indispensable pour l'étude de la digestion des aliments. Les modèles animaux les plus courants sont le rat et le porc. Le rat est utilisé comme modèle dans le domaine de la nutrition car il s'agit d'un monogastrique omnivore qui possède un système digestif anatomiquement et fonctionnellement proche de celui des humains. Les contenus du tube digestif, ainsi que les fèces et urines peuvent être analysés pour mesurer l'azote, les lipides totaux, les polysaccharides et les fibres afin de déterminer l'efficacité de la digestion et de l'absorption des macronutriments (Coles *et al.* 2010). Comme pour les études chez l'humain, des isotopes peuvent marquer des macronutriments afin de mesurer la digestibilité vraie (Moughan 2023). Ces techniques ont permis de démontrer comment différents régimes alimentaires influencent la digestion et l'absorption des macronutriments chez le rat, offrant des informations précieuses qui peuvent être extrapolées à la nutrition humaine.

3.2. Méthodes *in vitro*

Il est évident que les essais *in vivo* sur des humains ou des animaux seraient la méthode la plus réaliste pour comprendre la digestion des aliments. Mais cela n'est cependant pas toujours réalisable sur le plan technique, éthique et financier. Plusieurs domaines de recherche tels que la recherche alimentaire, nutritionnelle et médicale s'intéressent au devenir d'une matrice ingérée au cours de la digestion. C'est pourquoi, depuis les années 1990, des méthodes de digestion *in vitro* ont été développées avec des paramètres et applications différentes (Marze 2022). Ces modèles *in vitro* sont devenus les préférés pour ces recherches en raison de leur rapidité, simplicité, coût et absence de problèmes éthiques (Sensoy 2021).

Afin de mimer le plus fidèlement la digestion humaine, certains paramètres ont été pris en considération dans le développement de ces modèles *in vitro* (Hur *et al.* 2011):

- Le nombre de phase de digestion et leur durée : bouche, estomac, intestin, colon
- La préparation et quantité de l'ingesta
- Le pH adapté à chaque étape de la digestion
- Les caractéristiques des enzymes : source, mélangée ou purifiée, concentration, activité
- Le choix et la concentration en électrolytes dans les fluides et de la bile
- Les mécaniques appliquées au bol alimentaire tout au long de la digestion
- Flux du bol alimentaire entre les différentes phase et évacuation des produits de la digestion

Les modèles statiques et dynamiques sont les principales catégories de modèles qui reproduisent les processus gastro-intestinaux selon leur complexité. Cependant, la pertinence de ces modèles pour estimer la digestion des protéines *in vivo* reste un sujet de discussion. En effet, certaines méthodes d'évaluation de la digestion des protéines à partir de digestions *in vitro* peuvent donner des résultats différents selon les conditions expérimentales appliquées, la nature des enzymes utilisées et les paramètres de digestion pris en compte.

a. Les modèles dynamiques

La digestion se caractérise par une série de phases dynamiques et chimiques qui varient dans le temps, et les modèles dynamiques permettent de modéliser fidèlement cette réalité. Il existe à l'heure actuelle, 8 principaux systèmes dynamiques, comprenant des systèmes mono-compartiments ou multi-compartiments, qui ont été validés par rapport à des modèles *in vivo* (Dupont *et al.* 2019 ; Li *et al.* 2020).

Par exemple, le *Dynamic Gastric Model* comporte un seul compartiment mimant le fundus et l'antrum de l'estomac, où des portions du bol alimentaire sont aspirées pour ensuite être mélangées par des forces de cisaillement exercées par un cylindre (Wickham *et al.* 2012). Le *Human Gastric Simulator* simule également seulement l'estomac. Pour cela, des rouleaux simulent les contractions péristaltiques gastriques dont la fréquence est réglée par un moteur (Guo *et al.* 2014). Après l'éjection, les chymes obtenus peuvent subir une digestion intestinale par des systèmes statiques ou dynamiques. Ensuite, des modèles plus avancés existent pour stimuler la digestion gastro-intestinale comprenant le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal

(DIDGI), le SHIME, ou encore le TNO *Gastro-Intestinal Model* (TIM). Par exemple, le DIDGI simule l'estomac et l'intestin grêle avec deux récipients en verres. Des pompes péristaltiques permettent de contrôler les différentes sécrétions et la vidange de chaque compartiment (Ménard *et al.* 2015). Le SHIME est très complet, étant constitué de 5 compartiments, simulant respectivement l'estomac, l'intestin grêle, le caecum/côlon ascendant, le côlon transverse et le côlon descendant. Pour reproduire les régions du côlon, du microbiote fécal est inoculé dans les différents compartiments (De Boever *et al.* 2000). Enfin, le TIM est l'un des systèmes dynamiques les plus performants et se compose de 4 compartiments mimant l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon (Minekus 2015). Il peut être complété avec le système *tiny-TIM* comprenant un compartiment pour l'intestin grêle, le TIMagc qui simule la motilité péristaltique spécifique de l'estomac, et le TIM-2 qui simule les conditions dynamiques et le microbiote fécal du colon, grâce à des dons humains (Minekus 2015 ; Dupont *et al.* 2019). Dans le TIM, les contractions péristaltiques sont mimées par l'utilisation de pompe d'eau à travers les membranes internes flexibles.

Ces dispositifs sont tous contrôlés par ordinateur, afin de réguler le pH, les débits sécrétions, les temps de séjour des aliments, et le transit vers les compartiments suivants.

Cependant, selon Brodkorb *et al.* 2019, les modèles dynamiques sont inaccessibles à la plupart des chercheurs car ils nécessitent des coûts de configuration et de maintenance plus élevés. De plus, ils consomment de grandes quantités d'enzymes et d'échantillons et nécessitent des appareils spécifiques peu disponibles et difficiles à mettre en place en laboratoire.

b. Les modèles statiques

Les modèles statiques sont simples et utilisent des outils statiques tels que des récipients en verre, l'agitation au bain-marie, la rotation magnétique et un pH-stat. Ces modèles statiques simulent la bouche, l'estomac et l'intestin grêle en utilisant un récipient unique dans lequel se succéderont les différentes phases de digestion dans les conditions biochimiques (c'est-à-dire la température, les enzymes, le pH et les sels biliaires) similaire au tractus gastro-intestinal (Li *et al.* 2020). Cette digestion statique peut être associée à de la culture cellulaire Caco-2 pour mimer l'absorption des nutriments par les cellules épithéliales (Hur *et al.* 2011).

Cependant, de nombreuses méthodes statiques sont disponibles dans la littérature, représentant une grande variation dans les conditions expérimentales entre les études, en termes de durée et de pH de chaque phase, de concentration d'enzyme et d'acide biliaire, d'agitation, de composition des fluides (Hur *et al.* 2011). Ainsi, des efforts se sont récemment portés sur l'harmonisation de ces méthodes pour mimer plus fidèlement la digestion humaine et pour permettre une meilleure comparaison avec les résultats obtenus dans la littérature.




Phases de digestion	Protocole INFOGEST
Phase orale 	Mélange 1:1 aliment:fluide salivaire (masse) Enzyme : α -amylase si présence de glucide Temps d'incubation : 2min sous agitation Température : 37°C pH 7
Phase gastrique 	Mélange 1:1 bol:fluide gastrique (volume) Enzymes : lipase gastrique (à 60 U/mL) et pepsine (à 2000 U/mL) Temps d'incubation : 2h sous agitation Température : 37°C pH 3
Phase intestinale 	Mélange 1:1 chyme:fluide intestinal (volume) Enzymes : pancréatine (à 100 U/mL de trypsine) ou trypsine, chymotrypsine, α -amylase pancréatique, lipase pancréatique individuelles Autre : bile Temps d'incubation : 2h sous agitation Température : 37°C pH 7

Figure 9. Protocole statique INFOGEST (Adapté de Brodkorb *et al.* 2019).

Récemment, un consensus international a été atteint au sein du réseau COST INFOGEST pour réaliser un protocole standardisé de digestion statique *in vitro* basé sur l'état actuel des connaissances sur les conditions de digestion *in vivo* (Brodkorb *et al.* 2019). Les caractéristiques de ce modèle sont représentées dans la figure 9. Une partie du travail expérimental de cette thèse s'est basée sur ce protocole. Mais il est intéressant de noter qu'un protocole de digestion semi-dynamique a également été développé au sein de ce même réseau, dont le protocole a l'avantage de simuler la nature transitoire de sécrétion des enzymes gastriques, de l'acidification progressive et de la vidange gastrique (Mulet-Cabero *et al.* 2020). Cependant, malgré cette standardisation, des divergences subsistent, notamment dans les méthodes d'évaluation de la digestibilité des protéines, compliquant ainsi la

comparaison des résultats entre études et leur pertinence pour une estimation précise de la digestibilité *in vivo*.

Pour approfondir notre compréhension, après avoir examiné l'interaction entre les lipides et les protéines et leur impact mutuel sur la digestion, il est essentiel de se pencher sur le cas particulier des oléagineux, qui sont une source naturelle de ces deux composants.

Résumé de la digestion chez l'Homme

.....♦.....

La digestion est un processus complexe qui transforme les aliments en nutriments absorbables et utilisables par l'organisme. Elle est influencée par plusieurs facteurs interconnectés, tels que la structure des aliments et des macronutriments, les traitements appliqués ou encore, la composition de la matrice. Pour les lipides, leur état physique initial est déterminant. Stockés sous forme d'oléosomes dans les graines et les noix, leur digestibilité est améliorée lorsque les parois cellulaires sont dégradées. De plus, les lipides doivent être dispersés en fines gouttelettes d'émulsion pour favoriser l'action des lipases. La composition des lipides influence également la digestion, avec une meilleure lipolyse pour les TAG à chaîne courte et les AGS. Enfin, les interactions avec d'autres composés non lipidiques, comme les protéines et les fibres, peuvent entraîner la lipolyse en modifiant la stabilité des émulsions et l'accessibilité des enzymes digestives. Concernant les protéines, leur digestibilité est influencée par leur profil en AA, leur structure et la composition de la matrice. Les protéines végétales sont souvent encapsulées dans des parois cellulaires rigides, limitant l'accès des enzymes, tandis que les protéines animales, plus solubles et flexibles, sont plus faciles à digérer. Les interactions hydrophobes entre protéines et lipides, ainsi que la formation de complexes avec des polysaccharides, peuvent également affecter la digestibilité des protéines. Les FAN comme les phytates et les inhibiteurs de protéases, diminuent encore cette digestibilité en interagissant avec les protéines et les enzymes digestives. Tous ces éléments sont donc à prendre en compte dans l'étude de la digestion.

Pour étudier la digestion, il y a trois approches expérimentales : *in vivo*, *in vitro* et *in silico*, bien que seules les deux premières aient été abordées ici. Les méthodes *in vivo* impliquent des études humaines et animales, essentielles pour comprendre l'impact de la digestion sur diverses pathologies, malgré les contraintes techniques et éthiques. Les approches *in vitro*, utilisent des modèles statiques ou dynamiques pour simuler les conditions biologiques de la digestion, offrant une alternative rapide et éthique aux essais *in vivo*. Récemment, un consensus international a été atteint au sein du réseau COST INFOGEST pour réaliser un protocole standardisé de digestion statique *in vitro* basé sur l'état actuel des connaissances sur les conditions de digestion *in vivo*. Une partie du travail expérimental de cette thèse s'est basée sur ce protocole.

Partie 2 : Qualité nutritionnelle des protéines d'oléagineux

1. Evaluation de la qualité des protéines

La qualité nutritionnelle d'une protéine est dictée par sa capacité à répondre aux besoins métaboliques et à fournir des AA, en particulier des AAI, et de l'azote. L'évaluation de la qualité des protéines pour un aliment spécifique repose sur des approches biochimiques qui examinent divers critères, tels que la teneur en protéines, la composition en AAI, la digestibilité des protéines, la biodisponibilité des AA. De plus, leur utilisation pour la synthèse protéique et leur impact sur les réserves protéiques de l'organisme peuvent être évalués en tant que marqueurs de qualité protéique.

1.1. Besoins en AAI et score chimique (SC)

Les vingt AA existant sont nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, les AAI ne peuvent pas être synthétisés *de novo* ou en quantité suffisante pour répondre aux besoins physiologiques normaux (Reeds 2000). Ces AAI sont la lysine, la thréonine, l'histidine, la leucine, l'isoleucine, la valine, la méthionine, la phénylalanine et le tryptophane, et doivent, par conséquent, être apportés par l'alimentation (Boye *et al.* 2012). Cependant, les AA ne peuvent pas être stockés et s'ils sont apportés en quantité supérieure à ce qui est nécessaire pour la synthèse protéique, alors ils sont oxydés et perdus. Ainsi, les besoins journaliers en AAI ont été mesurés et définis en fonction de l'âge dans le rapport de la FAO de 2007 (FAO/WHO/UNU, 2007). Ces teneurs en AAI sont exprimées en rapportant les besoins quotidiens de chaque AAI au besoin en protéine par jour (mg/g) (FAO, 2013) (Tableau 2).

Le SC compare la quantité d'AAI présente dans une protéique étudiée avec celle de la protéine de référence, dite « idéale ». Le rapport entre la teneur en AAI (mg) dans 1g de la protéine étudiée et celle de protéine de référence est calculé pour tous les AAI, et le SC est déterminé par la valeur la plus basse obtenue. Un SC égal ou supérieur à 1 indique que la protéine apporte tous les AAI et que le plus limitant correspond au moins à 100% des besoins. L'analyse des AA dans les protéines alimentaires est généralement réalisée par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) (Boye *et al.* 2012).

Tableau 2. Teneurs en acides aminés indispensables recommandés (mg/g de protéine) par la FAO (FAO, 2013).

Groupes selon les âges	His	Ile	Leu	Lys	AAS	AAA	Thr	Trp	Val
Nouveau-né (0 à 6 mois)	21	55	96	69	33	94	44	17	53
Enfant (6 mois à 3 ans)	20	32	66	57	27	52	31	8.5	43
Grand enfant, adolescent et adulte (> 3ans)	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40

AAA, Acides aminés aromatiques ; AAS, Acides aminés soufrés ; His, Histidine ; Ile, Isoleucine ; Leu, Leucine ; Lys, Lysine ; Thr, Thréonine ; Trp, Tryptophane ; Val, Valine.

1.2. La digestibilité

La digestibilité d'une protéine alimentaire représente son aptitude à être hydrolysée en AA et absorbée au niveau intestinal. La digestibilité peut être évaluée *in vitro* par des modèles statiques ou dynamique qui mime les phases de digestion ou *in vivo* chez l'humain ou chez des animaux (cf partie 1.3.). Un des principes de digestibilité *in vivo*, repose sur la différence entre l'apport et les pertes d'azote pour estimer l'étendue de la digestion et de l'absorption des AA. Pour cela, la teneur en azote non absorbée dans l'iléon (digestibilité iléale) ou dans les fèces (digestibilité fécale) est quantifiée (FAO 2013). Cependant, des échanges d'azote en terme d'AA, de protéines et d'urée, ont lieu entre les *pools* systémiques et la lumière intestinale, et donc l'azote total mesuré dans les fèces ou l'iléon comprend également les pertes endogènes, non alimentaire. La différence entre la digestibilité apparente et vraie est que cette dernière prend en compte ces pertes endogènes (FAO 2007) :

$$\text{Digestibilité azotée apparente (\%)} = \frac{I - F}{I} \times 100$$

$$\text{Digestibilité azotée vraie (\%)} = \frac{I - (F - P_f)}{I} \times 100$$

Avec I = azote ingéré, F = azote fécal, P_f = pertes azotée fécales endogènes

Ces pertes endogènes sont mesurées en utilisant des régimes sans protéines, où la seule source d'azote est d'origine endogène. L'azote total est alors mesuré dans les fèces et correspondent aux pertes endogènes (FAO 2007).

1.3. Le PDCAAS et le DIAAS

Avant 2013, l'indice recommandé pour évaluer la qualité des protéines alimentaires était le Score Chimique Corrigé de la Digestibilité des Protéines (*Digestibility Corrected Amino Acid Score* ou PDCAAS en anglais) (FAO, 1991). Il s'obtient par le calcul suivant :

$$\text{PDCAAS} = \text{SC} \times \text{digestibilité fécale vraie de la protéine}$$

Puis, en 2013, la FAO a introduit un nouvel indice, appelé le Score de Digestibilité des Acides Aminés Indispensables (*Digestible Indispensable Amino Acid Score* ou DIAAS en anglais) (FAO 2013), qui est actuellement la méthode recommandée par la FAO et l'Académie nationale des sciences des États-Unis. Le DIAAS propose une valeur plus fine de la digestibilité, en se basant sur celle des AA individuels, plutôt que sur celle de la protéine. Contrairement à la digestibilité protéique, la digestibilité des acides aminés doit être mesurée au niveau iléal, ce qui pose des défis méthodologiques supplémentaires. Sa formule est la suivante :

$$\text{DIAAS} = \text{SC} \times \text{digestibilité iléale vraie de l'acide aminé}$$

Cependant, le PDCAAS est toujours utilisé et accepté, car les données sur la digestibilité iléale des AA sont insuffisantes pour de nombreuses sources protéiques (Nosworthy *et al.* 2017). Si ces scores sont égaux à 100, alors la protéine contient tous les AAI et est bien digérée.

Cependant, comme ces études *in vivo* pour évaluer la digestibilité des protéines sont coûteuses, longues, et difficiles à réaliser sur le plan éthique et technique, la digestibilité des protéines peut également être mesurée *in vitro*, comme nous l'avons vu précédemment. Ainsi, ces scores nommés *l'in vitro*-PDCAAS (IV-PDCAAS) et *l'in vitro*-DIAAS (IV-DIAAS) peuvent être mesurés *in vitro* et calculés comme le SC multiplié par la digestibilité protéique *in vitro* (Sá *et al.* 2024).

1.4. Valeur biologique (VB)

La VB mesure la rétention des AA absorbés dans les tissus. Elle rapporte les pertes urinaires et fécales à l'azote absorbé, en prenant en compte ou non les pertes endogènes, (FAO/WHO/UNU 2007) :

$$\text{Valeur biologique apparente (\%)} = \frac{I - F - U}{I - F} \times 100$$

$$\text{Valeur biologique vraie (\%)} = \frac{I - (F - P_f) - (U - P_u)}{I - (F - P_f)} \times 100$$

Avec I = azote ingéré, F = azote fécal, P_f = pertes azotées fécales endogènes, P_u = pertes azotées endogènes urinaires.

1.5. L'utilisation protéique nette (UPN)

L'UPN fournit une mesure de l'utilisation globale des protéines, en calculant la proportion d'apport en azote retenu par rapport à l'azote ingéré, et peut être mesurée par le produit de la VB et de la digestibilité azotée (Boye *et al.* 2012).

Les protéines végétales présentent souvent des déficiences en AAI et sont structurées de manière à résister à la digestion, ce qui se reflète sur leur digestibilité et leur biodisponibilité, généralement inférieures aux protéines d'origine animale (Day *et al.* 2022). Dans la prochaine section, nous analyserons en détail la qualité nutritionnelle des protéines issues d'oléagineux.

2. Un focus sur les oléo-protéagineux

Les oléagineux constituent un groupe de plantes cultivées pour leurs huiles. Aujourd'hui, le soja est la principale culture d'oléagineux dans le monde, suivi par le colza et le tournesol. La production mondiale d'oléagineux est estimée à 687 millions de tonnes pour 2024/2025 (USDA 2024). Les oléagineux sont riches en lipides, mais contiennent également des protéines, des fibres, des vitamines et des minéraux. Après l'extraction de l'huile, les tourteaux d'oléagineux, riches en protéines, sont des sous-produits précieux de l'industrie de l'huile (Arrutia *et al.* 2020) (Figure 10). Ils représentent une source importante de protéines, notamment pour l'alimentation animale, mais sont sous-estimés pour la consommation humaine en raison du manque de sensibilisation et de recherche (Singh *et al.* 2022). Cependant, certaines protéines d'oléagineux sont malgré tout utilisées dans l'alimentation humaine sous forme d'ingrédients transformés (farine, concentrat, isolat) ou comme substrats (utilisés dans la production d'AA, d'arômes, de protéines bioactives, etc.) (Singh *et al.* 2022).

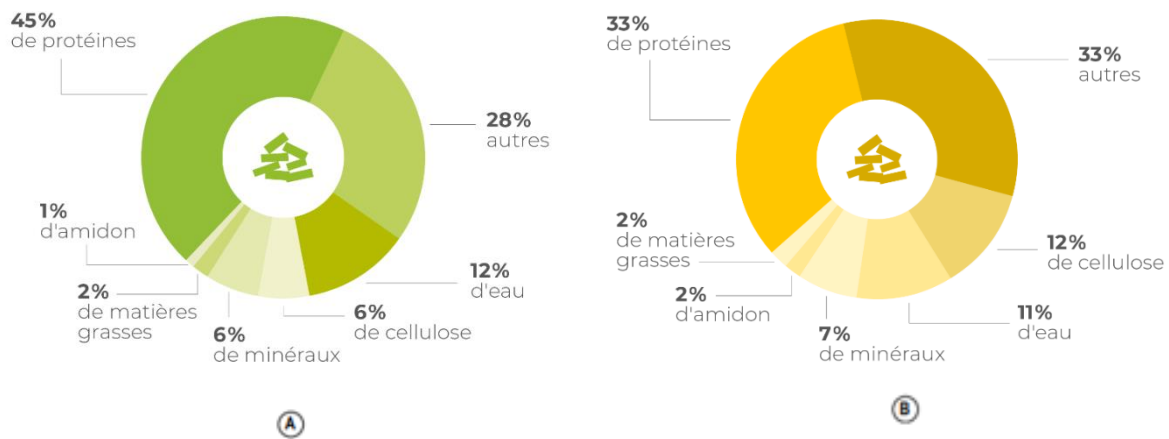


Figure 10. Composition moyenne des tourteaux de soja (A) et de colza (B) (Terres Univia).

2.1. Qualité nutritionnelle des protéines des oléo-protéagineux

La teneur en protéines des oléagineux varie considérablement selon les espèces comme le montre le Tableau 3. Les graines de colza, de chanvre, de tournesol et de sésame contiennent au moins 20 % de protéines (Day *et al.* 2022). Le soja est la source la plus riche, avec une teneur en protéines allant de 35 % à 40 % dans les graines, soit une teneur en protéines supérieure à celle du bœuf (en % de matière sèche), et atteignant plus de 65 % dans un concentré et plus de 90 % dans un isolat (Day *et al.* 2022). Cependant, il est difficile d'obtenir un pourcentage précis de protéines d'origine végétale, car cela dépend des conditions de culture (géographie et climat) et peut également varier selon la méthode d'analyse et le facteur de conversion de l'azote utilisé (Mariotti *et al.* 2008 ; Arrutia *et al.* 2020).

En termes de composition en AAI, les protéines des oléagineux ont un profil relativement bien équilibré. Cependant, ce profil peut être modifié lors de l'extraction de l'huile et des traitements ultérieurs (Kotecka-Majchrzak *et al.* 2020). En particulier, la lysine est sensible à la chaleur et peut subir des réactions de Maillard (San Juan et Villamide 2001 ; Chmielewska *et al.* 2021). Par conséquent, les produits résultants sont généralement déficients en lysine mais riches en AA soufrés, à l'exception du soja qui est déficient en AA soufrés (Tableau 3). Cela se traduit par un SC inférieur à 100 (Sá *et al.* 2021). Pour améliorer la valeur nutritionnelle de ces aliments et couvrir les besoins humains en AAI, il est nécessaire de les combiner avec d'autres sources, telles que les légumineuses riches en lysine (Herreman *et al.* 2020).

Cependant, il existe une variabilité intrinsèque due à des facteurs génétiques, environnementaux et agronomiques, ce qui rend difficile l'obtention de valeurs moyennes précises pour la composition chimique des produits. Par exemple, certains ingrédients dérivés

du colza n'ont montré aucun AA limitant (Chmielewska *et al.* 2021). Ainsi, le dosage en AA des matrices est important.

Tableau 3. Qualité nutritionnelle des différentes sources protéiques d'oléagineux

Sources protéique	Teneur en protéine (%)	PDCAAS	DIAAS	AAI limitant	Références
Farine de soja	46-54	93	89	Méthionine et Cystéine	Day <i>et al.</i> 2022 ; Mathai <i>et al.</i> 2017
Isolat de soja	89-92	84-86	84-92	Méthionine et Cystéine	Hertzler <i>et al.</i> 2020 ; Day <i>et al.</i> 2022 ; Fleddermann <i>et al.</i> 2013 ; Mathai <i>et al.</i> 2017
Tourteau de chanvre	44	57	54	Lysine	Jiménez-Munoz <i>et al.</i> 2021 ; Day <i>et al.</i> 2022
Tourteau de colza	34-40	92	70	Lysine	Day <i>et al.</i> 2022 ; Ertl <i>et al.</i> 2016 ; Arrutia <i>et al.</i> 2020
Isolat de canola	86	86	ND	Lysine	Fleddermann <i>et al.</i> 2013 ; Day <i>et al.</i> 2022
Tourteau de Tournesol	15-45	54-58	46-49	Lysine	Day <i>et al.</i> 2022 ; Ertl <i>et al.</i> 2016 ; Arrutia <i>et al.</i> 2020

AAI, Acide aminé indispensable ; DIAAS, Score de Digestibilité des Acides Aminés Essentiels ; PDCAAS, Score chimique corrigé de la digestibilité des protéines. Les PDCCAS et DIAAS ont été calculés selon les besoins en acides aminés d'un enfant de 0,5 à 3ans (FAO 2013).

Les protéines issues des oléagineux présentent une digestibilité variable qui influence leur qualité nutritionnelle. Chez le rat, la digestibilité azotée fécale vraie de l'isolat de colza a été calculée à 93,3%, tandis que celle de l'isolat de soja était légèrement supérieure à 94,9% (Fleddermann *et al.* 2013). Les variétés de tourteaux de tournesol affichaient quant à elles une digestibilité fécale variant entre 93% et 96% (Canibe *et al.* 1999). De plus, la digestibilité oro-fécale d'un isolat de protéines de tournesol marquées au ¹⁵N a été mesurée par la récupération de l'azote dans le contenu digestif et a été évaluée à 95,1% chez le rat (Tessier *et al.* 2020b). Par ailleurs, la digestibilité iléale vraie des tourteaux de tournesol, de colza et de soja a également été étudiée chez le porc. Les valeurs pour le tourteau de tournesol se situaient entre 77% et 82,7%, celles pour le tourteau de colza entre 73,7% et 77,9%, et pour le tourteau de soja entre 84,7% et 88,2% (Gonzalez-Vega et Stein 2012 ; Nørgaard *et al.* 2012 ; Almeida *et al.* 2014). En comparaison, la digestibilité iléale vraie du pois chez le porc s'élève à 88,5% (Nørgaard *et al.* 2012). La digestibilité iléale de ces protéines a également été évaluée chez l'humain. La digestibilité iléale d'un isolat de protéine de colza est de 84%, ce qui est relativement faible en comparaison avec d'autres protéines végétales telles que celles du pois ou du blé, évaluées dans des conditions similaires (Bos *et al.* 2007). De plus, la digestibilité

azotée iléale du tournesol chez l'humain a été rapportée à 85,6% en moyenne, mesurée à l'aide d'une sonde naso-iléale (Tessier *et al.* 2020a).

En ce qui concerne la digestibilité *in vitro* des protéines issues d'oléagineux, les valeurs rapportées dans la littérature montrent une variabilité en fonction des sources végétales et des procédés de transformation utilisés. Par exemple, la digestibilité de plusieurs tourteaux d'oléagineux, telles que celles de chia, de sésame, de lin, de citrouille et de pépins de raisin, a été testée à l'aide de la méthode de chute de pH, entraînant des valeurs comprises entre 70 % et 85 % (Sá *et al.* 2021). Cette même méthode a été utilisée pour mesurer la digestibilité du tourteau de colza brut et extrudé, avec des résultats de 79,5 % pour le colza brut et de 78,9 % à 81,3 % pour les échantillons extrudés, selon les conditions d'humidité et de la longueur des blocs de pétrissage (Zhang *et al.* 2017). En ce qui concerne les protéines de tournesol, la digestibilité *in vitro* de la farine a été rapportée à 83,1 %, celle du concentré à 90,7 %, et celle des isolats protéiques extraits à l'aide de différents solvants variait de 91,6 % à 95,3 % (Alexandrino *et al.* 2017). De plus, les concentrats de protéines de tournesol obtenus par précipitation isoélectrique atteignaient une digestibilité de 94,24 %, tandis que ceux obtenus par ultrafiltration affichaient une digestibilité encore plus élevée, atteignant 97,62 % (Huang *et al.* 2024). Cependant, il est essentiel de souligner que ces évaluations de digestibilité *in vitro* n'ont pas été réalisées selon le protocole standardisé INFOGEST, qui est aujourd'hui considéré comme une méthode de référence plus rigoureuse et harmonisée pour l'évaluation de la digestibilité des protéines. De plus, les études existantes se concentrent principalement sur la comparaison de la digestibilité d'ingrédients issus de différents procédés de transformation, plutôt que sur une comparaison directe entre différentes sources protéiques elles-mêmes. Cela souligne un manque de données dans la littérature pour des comparaisons plus approfondies entre différentes sources protéiques issues d'oléagineux.

Le profil en AAI et ces valeurs de digestibilité vont de ce fait directement influencer les scores de PDCAAS et de DIAAS. Le PDCAAS pour ces protéines varie considérablement selon les sources, allant de 54 pour le tourteau de tournesol à 93 pour la farine de soja (Tableau 3). Le tourteau de tournesol présente également le DIAAS le plus bas, tandis que l'isolat de soja présente le DIAAS le plus élevé. Le tourteau de colza, malgré un PDCAAS élevé de 92, montre un DIAAS plus faible de 70.

De plus, le rapport de la FAO recommande de classer les protéines en trois catégories de qualité basées sur le DIAAS : moins de 75 (aucune allégation de qualité), de 75 à 99 (protéines de haute qualité), et 100 ou plus (protéines d'excellente qualité) (FAO 2013). Herreman *et al.* 2020 ont calculé les valeurs de DIAAS pour plusieurs protéines animales et végétales à partir de données de digestibilité iléales chez le porc. Parmi toutes les protéines végétales étudiées, seules les protéines de soja ont été classées comme de haute qualité avec un DIAAS supérieur à 75. Ces valeurs soulignent l'importance des combinaisons protéiques pour améliorer le profil en AA et de ce fait la qualité nutritionnelle d'un régime à base de protéines végétales.

Enfin, qualité nutritionnelle des protéines est également mesurée par leur VB et NPU. Les valeurs VB et NPU d'un isolat de protéines de colza étaient respectivement de 84,0% et 70,5%, tandis que celles d'un isolat de protéines de soja étaient de 80,0% et 73,5%. Les valeurs de VB du colza était la plus élevée parmi toutes les autres sources de protéines alimentaires étudiées chez l'humain. Cependant, aucune données chez humain sont actuellement disponibles pour le tournesol (Bos *et al.* 2007).

La faible digestibilité des protéines oléagineuses peut être attribuée à plusieurs facteurs clés.

Premièrement, les protéines des oléagineux contiennent des structures en feuillets β , qui sont négativement corrélées à la digestibilité des protéines. Ces feuillets β hydrophobes forment des liaisons entre les protéines et créent des agrégats stabilisant la structure native des protéines, réduisant ainsi l'accessibilité des sites de clivage aux protéases, ce qui diminue leur digestibilité (Carbonaro *et al.* 2012).

Deuxièmement, les oléagineux contiennent des FAN qui peuvent limiter l'absorption, l'assimilation ou l'utilisation des protéines. Ils sont également riches en fibres alimentaires (Tableau 4). Les tourteaux d'oléagineux étudiés par Sá *et al.* 2021 contiennent des quantités élevées de fibres alimentaires, allant de 8 à 59g/100g. Selon l'OMS, une source alimentaire est considérée comme riche en fibres si elle contient plus de 6g/100g de fibres. Par conséquent, tous les sous-produits évalués sont considérés comme riches en fibres, ce qui peut impacter la digestibilité des protéines. En outre, les oléagineux sont riches en lipides, et même après l'extraction de l'huile, les tourteaux peuvent contenir des lipides résiduels, ce qui peut également affecter la digestibilité des protéines (Sá *et al.* 2021) (Cf. Partie 1, 2.2.e).

Ainsi, les protéines des oléagineux ont une digestibilité inférieure à celle des protéines animales en raison de la présence de FAN, de fibres et d'autres nutriments non protéiques dans la matrice des ingrédients protéiques d'oléagineux, ainsi que des structures hydrophobes en feuillets β qui les rendent résistantes à la digestion (Ismail *et al.* 2020). Par conséquent, l'élimination des FAN, des fibres et la modification de la structure des protéines par des méthodes de traitement amélioreraient la digestibilité et la biodisponibilité des protéines des oléagineux.

Tableau 4. Facteurs antinutritionnels et leur concentration dans différentes sources protéiques d'oléagineux

Sources	Facteurs antinutritionnels	Quantités	Références
Soja	Inhibiteur de protéase	1,2 mg/g	Samtiya <i>et al.</i> 2020
	Acide phytique	1,16 mg/g	Samtiya <i>et al.</i> 2020
	Lectine	0,11 mg/g	Samtiya <i>et al.</i> 2020
Tourteau de colza	Glucosinolate	2,08 μ mol/g	Mattila <i>et al.</i> 2018
	Acide phytique	3,9%	Mattila <i>et al.</i> 2018
	Composés phénoliques	728 GAE mg/100g	Mattila <i>et al.</i> 2018
	Tannin condensé	119 mg/100g	Mattila <i>et al.</i> 2018
Graines de coton	Gossypol	0,17%	Hahm <i>et al.</i> 2013
	Acide phytique	1,26%	Hahm <i>et al.</i> 2013
Tourteau de tournesol	Acide chlorogénique	27,7 mg/g	Farag 1999
Graines de lin	Composés phénoliques	214 GAE mg/100g	Mattila <i>et al.</i> 2018
	Acide phytique	1,9%	Mattila <i>et al.</i> 2018
Graines de chanvre	Composés phénoliques	96 GAE mg/100g	Mattila <i>et al.</i> 2018
	Condensed tannins	105 mg/100g	Mattila <i>et al.</i> 2018
	Acide phytique	3,5%	Mattila <i>et al.</i> 2018

Troisièmement, la classe de protéines est également un facteur déterminant de la digestibilité. Les protéines végétales, dont celles des oléagineux, peuvent être divisées en quatre classes selon leur solubilité (Osborne *et al.* 1914) : albumines, globulines, glutélines et prolamines. Il a été largement rapporté que les légumineuses contiennent en grande partie des albumines et des globulines, tandis que les protéines des céréales sont principalement composées de prolamines et de glutélines. Les protéines des oléagineux sont, quant à elles, principalement composées de globulines et d'albumines. Par exemple, le colza contient 60% de globuline, appelée « cruciférine », et 20% d'albumine, appelée « napine ». Le tournesol contient 40 à 90% de globuline, appelée « héliantine », et 10 à 30 % d'albumine. Le soja, quant

à lui, contient 90% de globulines, le reste étant des albumines (Arrutia *et al.* 2020 ; Kotecka-Majchrzak *et al.* 2020). Chaque fraction protéique a une digestibilité différente. La présence d'inhibiteurs de trypsine dans les fractions albumines entraîne une résistance à la protéolyse des albumines natives (Kaur *et al.* 2022).

La compréhension des facteurs qui réduisent la digestibilité des protéines des oléagineux est essentielle pour choisir des conditions de transformation optimales ; ainsi, des méthodes de traitement visant à éliminer les FAN, à réduire la teneur en fibres et à modifier les structures protéiques devraient être envisagées pour améliorer leur qualité nutritionnelle.

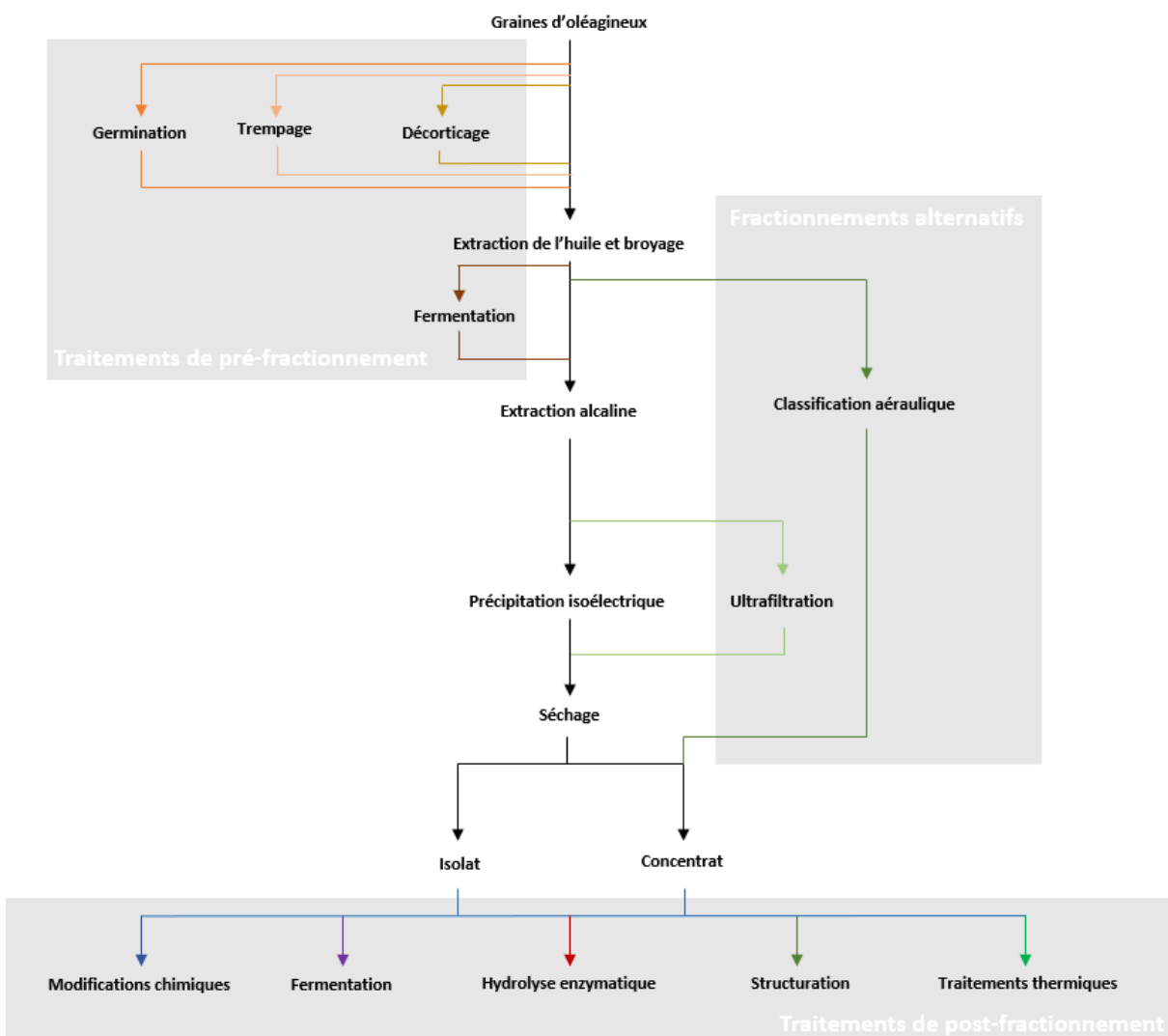


Figure 11. Aperçu des étapes de traitement avant, pendant et après le fractionnement des protéines oléagineuses. Les couleurs indiquent les différentes voies de traitement, la voie conventionnelle de fractionnement aqueux est présentée en noir et représente l'extraction alcaline suivit d'une précipitation isoélectrique (Adaptée de Rivera del Rio *et al.* 2022).

2.2. Impact des procédés de transformation des oléagineux sur la qualité des protéines

De nombreux procédés de transformation peuvent être utilisés pour obtenir un produit protéique à partir de graines oléagineuses, pouvant offrir de bonnes propriétés fonctionnelles ou nutritionnelles (Figure 11). Le fractionnement des fractions protéiques des graines oléagineuses est essentiel pour valoriser leurs produits dérivés. Une fraction protéique plus pure améliore significativement la digestibilité des protéines.

a. Traitement de pré-fractionnement

Les traitements de pré-fractionnement des graines, tels que le trempage, la fermentation, la germination et le décortilage, sont des pratiques reconnues pour optimiser la digestibilité des protéines oléagineuses (Rivera del Rio *et al.* 2022). Par exemple, la fermentation induit des changements structuraux dans les protéines insolubles, rendant celles-ci plus accessibles aux enzymes protéolytiques (Sá *et al.* 2020a). Bartkiene *et al.* 2012 ont observé une augmentation de 13,5 % de la digestibilité des protéines de farines de soja et de lin après fermentation avec *Pediococcus acidilactici* pour la production de pain.

La germination, qui favorise la réduction de FAN comme les polyphénols, l'acide phytique et les inhibiteurs de trypsine, améliore également la digestibilité des protéines (Moure *et al.* 2006 ; Boye *et al.* 2012). Par exemple, l'activité des inhibiteurs de trypsine diminue significativement pendant la germination du soja, atteignant une réduction de 39 % après 4 jours (Ma *et al.* 2020). Cependant, les bénéfices de la germination dépendent des conditions environnementales telles que la température et l'humidité.

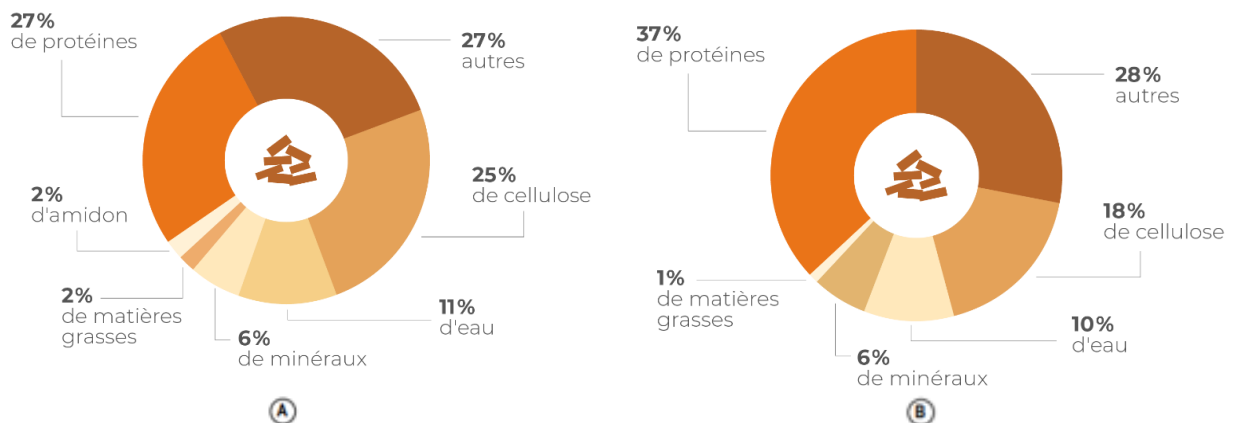


Figure 12. Composition moyenne du tourteau de tournesol non décortiqué (A) et décortiqué (B) (Terres Univia).

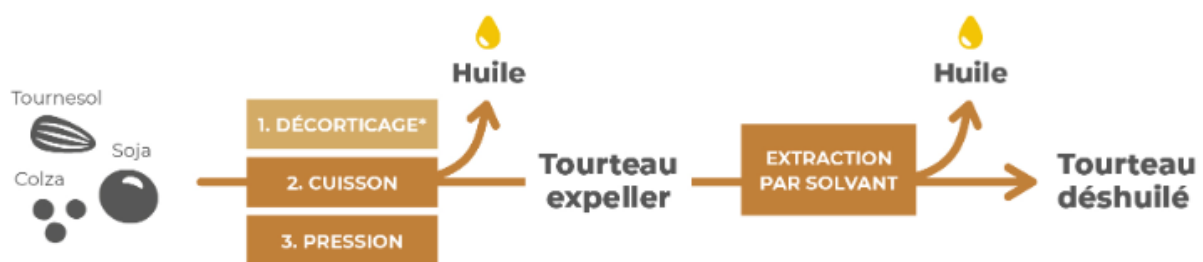
Le décortiquage, qui élimine les enveloppes fibreuses, est couramment utilisé dans l'industrie du tournesol et contribue à réduire les FAN des graines (Moure *et al.* 2006 ; Duodu *et al.* 2018). La figure 12 représente la composition du tourteau de tournesol ayant été décortiqués ou non avant l'extraction de l'huile.

b. Extraction de l'huile

L'extraction de l'huile des graines oléagineuses, qu'elle soit réalisée par pressage à chaud ou à froid, influence également la digestibilité des protéines. Le pressage à chaud, bien que conventionnel pour son rendement élevé en huile, peut altérer les nutriments sensibles à la chaleur comme les vitamines (Sarkar *et al.* 2021). En revanche, le pressage à froid préserve mieux ces nutriments tout en laissant une teneur en huile résiduelle plus élevée dans les tourteaux (Carré 2021).

L'extraction par solvant, souvent à l'hexane, suit généralement le pressage mécanique pour augmenter le rendement en huile et réduire la teneur en lipides résiduels (<1%) (Figure 13).

Ces processus non seulement éliminent l'huile mais aussi décomposent les parois cellulaires, libérant ainsi les protéines et améliorant leur accessibilité aux enzymes, ce qui favorise la digestibilité des protéines (Capuano *et al.* 2018a ; Shaghaghian *et al.* 2022). Cependant, des températures et pressions excessives peuvent réduire la biodisponibilité des AAI (Shaghaghian *et al.* 2022).



* Une étape de décortiquage peut être réalisée avant trituration pour les graines de tournesol et de soja.

Figure 13. Schéma de production des tourteaux d'oléagineux (Terres Univia).

c. Fractionnement

Après l'extraction de l'huile, les tourteaux peuvent être transformés en concentrats ou isolats protéiques. Les concentrats sont obtenus soit par classification aéroulique, qui permet de séparer les protéines par gravité, soit par processus humide par lavage hydroalcoolique ou

avec de l'eau acide à pH 4,5 (Carré 2021). Ces procédés de transformation permettent d'obtenir des concentrats dont la teneur en protéines varie de 35 à 80% selon la source (Meganaharshini *et al.* 2023). Par exemple, à partir de la farine de soja décortiquée, ces processus permettent de produire un concentrat protéique contenant entre 65 à 75% de protéines (Guéguen *et al.* 2016).

Les isolats, avec une teneur en protéines encore plus élevée (supérieure à 80%), sont obtenus par des méthodes humides comme celle brevetée par Anson et Pader en 1955. Les protéines sont solubilisées dans un milieu alcalin, tandis que les matières insolubles (amidon, fibres) sont éliminées par centrifugation. Les protéines sont ensuite purifiées par précipitation au pl puis séparée par filtration (Chéreau *et al.* 2016)

Ces procédés augmentent considérablement la digestibilité des protéines en inactivant les FAN et en améliorant l'accès des enzymes aux sites de protéolyse. Par exemple, le coefficient d'absorption apparent des protéines du soja peut passer de 54% dans la graine à 101% dans l'isolat protéique final (Guéguen *et al.* 2016).

d. Traitements thermiques

Les traitements thermiques sont couramment utilisés pour améliorer la digestibilité des protéines oléagineuses. Cependant, leur impact pouvant être positif, neutre ou négatif, varie en fonction de la source de l'ingrédient, du type de fraction protéique et des conditions de chauffage appliquées.

Un degré modéré de dénaturation des protéines induit par la chaleur peut améliorer la digestibilité en exposant davantage les sites de clivage enzymatique. Par exemple, l'isolat de soja soumis à des températures modérées voit sa structure tertiaire et quaternaire se dénaturer, augmentant ainsi l'accès aux enzymes digestives. Le DH *in vitro* des protéines de soja augmente jusqu'à une température de 85°C et une durée de 30min, mais diminue au-delà en raison de l'agrégation des protéines, rendant les sites de clivage enzymatique moins accessibles (Tian *et al.* 2019)

Les processus de transformation impliquant la chaleur, comme la torrification peuvent également modifier la digestibilité. Par exemple, les protéines de cacahuètes forment des polymères compacts après torrification, ce qui réduit leur accessibilité digestive (Paz-Yépez *et al.* 2019). De plus, l'extrusion, un processus thermomécanique combinant chaleur,

cisaillement et haute pression, est particulièrement efficace pour améliorer la texture et la digestibilité des protéines végétales. Zhang *et al.* 2017 ont montré que l'extrusion avec 30% d'humidité augmente le DH *in vitro* des protéines de canola. Cependant, leur étude souligne également l'interaction complexe entre les variables de traitement qui affecte la digestibilité des protéines (Zhang *et al.* 2017).

Les traitements thermiques peuvent également inactiver les FAN comme les inhibiteurs d'enzymes et l'acide phytique, améliorant ainsi la digestibilité des protéines (Boye *et al.* 2012 ; Capuano et Janssen 2021). Cependant, la formation de composés indésirables comme ceux issus de la réaction de Maillard peut réduire la valeur nutritionnelle des protéines (Sá *et al.* 2020b).

Ainsi, les protéines des graines d'oléagineux possèdent de bonnes qualités nutritionnelles, surtout lorsqu'elles sont combinées avec d'autres sources protéiques au profil en AA complémentaire et qu'elles ont subi des procédés de transformation, tels que le fractionnement. Ces ingrédients oléagineux présentent un réel intérêt pour les personnes âgées. En effet, le vieillissement entraîne une diminution de la masse musculaire et une augmentation des besoins nutritionnels. Les protéines et les lipides contenus dans les oléagineux pourraient contribuer à prévenir la sarcopénie en soutenant la synthèse protéique musculaire et en fournissant une source d'énergie durable.

Résumé de la qualité nutritionnelle des protéines d'oléagineux

.....

La qualité nutritionnelle d'une protéine dépend de sa capacité à fournir des AAI et de l'azote pour répondre aux besoins métaboliques, et se définit selon le profil en AAI, la digestibilité, la biodisponibilité et l'efficacité d'utilisation par l'organisme.

Les protéines issues des oléo-protéagineux, comme le colza, le tournesol et le soja, présentent une qualité nutritionnelle variable, selon la source végétale et le procédé de transformation. En termes de teneur en protéines, les graines d'oléagineux contiennent au moins 20 % de protéines, tandis que le soja en contient de 35 % à 40 %, surpassant même la teneur en protéines du bœuf. Le profil en AA est relativement équilibré, bien que certains procédés de transformation, tels que l'extraction d'huile, puissent affecter la composition, en particulier la lysine, sensible à la chaleur. La digestibilité de ces protéines a été évaluée *in vivo* chez le rat, le porc et l'humain. Chez le rat, la digestibilité fécale vraie du colza atteint 93,3 % et celle du soja 94,9 %, tandis que chez l'humain, la digestibilité iléale du colza est de 84 %, comparée à 85,6 % pour le tournesol. Les tourteaux de soja et de pois présentent des digestibilités iléales chez le porc plus élevées (jusqu'à 88,5 %) que celles du colza et du tournesol (73,7 % à 82,7 %). La digestibilité a également été évaluée *in vitro* et varie aussi selon les sources et les procédés de transformation. Ces évaluations n'ont cependant pas été effectuées selon le protocole standardisé INFOGEST, ce qui limite les comparaisons directes avec d'autres études. Le PDCAAS et le DIAAS révèlent que le soja possède les meilleurs scores, avec un DIAAS supérieur à 75, le classant comme une protéine de haute qualité, tandis que les tourteaux de colza et de tournesol affichent des scores plus faibles.

Les procédés de transformation des graines oléagineuses, comme le trempage, la fermentation, la germination et le décorticage, sont essentiels pour améliorer la digestibilité des protéines en réduisant les FAN et en rendant les protéines plus accessibles. Le fractionnement, qui produit des concentrats et isolats protéiques, diminue la teneur en composés non-protéiques, améliorant ainsi la digestibilité des protéines. Les traitements thermiques optimisent encore la digestibilité, bien que des ajustements précis soient nécessaires pour éviter la dégradation des nutriments.

Partie 3. Rôle des protéines et des lipides dans la prévention de la sarcopénie

1. Métabolisme protéique musculaire

Le tissu musculaire squelettique représente environ 40% de la masse corporelle totale d'un individu adulte (Frontera et Ochala 2015). Il joue un rôle crucial dans diverses fonctions telles que la locomotion, la génération de la force, le maintien de la posture, la régulation de la température corporelle, l'équilibre métabolique et les fonctions physiologiques (Deane *et al.* 2021). Le muscle strié squelettique est constitué de fibres musculaires contractiles regroupées par du tissu conjonctif. On distingue deux grands types de fibres (Frontera et Ochala 2015 ; Dao *et al.* 2020) :

- Les fibres de type I à contraction lente. Elles sont de couleur rouge par leur richesse en myoglobine, vascularisées, résistantes à la fatigue et dépendent principalement de la phosphorylation oxydative mitochondriale pour la production d'énergie
- Les fibres de type II sont subdivisées en types IIA ou IIB en fonction de l'expression des différentes isoformes de la chaîne lourde de myosine. Les fibres IIB sont à contraction rapide, dépourvues de myoglobine et dépendent de la glycolyse anaérobie. Les fibres IIA sont intermédiaires entre les classes I et IIB car elles sont riches en myoglobine et en glycogène

Les fibres musculaires sont principalement composées de protéines (80%), représentant 45% des protéines corporelles d'un individu adulte. Les protéines musculaires se renouvellent en permanence grâce à un cycle dynamique de synthèse (SPM) et de dégradation (DPM). Le bilan protéique net (BPN) est déterminé par la différence entre la SPM et la DPM (Frontera et Ochala 2015 ; Stokes *et al.* 2018). Ce cycle dépend de nombreuses conditions physiologiques, notamment des périodes post-absorption et post-prandiale et est régulé, en particulier par certaines hormones et certains nutriments.

Pendant la période post-prandiale (*i.e.* après l'ingestion d'un repas), certains AA issus de l'alimentation stimulent la SPM, favorisant un BPN positif et le renouvellement des protéines perdues au cours de la phase post-absorptive. En effet, durant cette dernière période, les protéines sont dégradées pour fournir des AA aux tissus, entraînant un BPN négatif. Chez les individus adultes jeunes en bonne santé, ces périodes s'équilibrent sur 24 heures, maintenant ainsi la masse musculaire (Joanisse *et al.* 2021).

1.1. Période post-prandiale et synthèse protéique

Après leur digestion, les AA sont absorbés par les entérocytes puis transportés vers le foie *via* la veine porte. Environ 50% des AA alimentaires sont ensuite distribués aux différents organes, tandis que le reste demeure dans la région splanchnique pour répondre aux besoins de ces tissus (estomac, intestins, foie, pancréas) (Stoll *et al.* 1998). Chez un individu jeune et sain, environ 20% des AA provenant d'un bolus de 20g de protéines de caséine sont absorbés par le tissu musculaire squelettique dans les 5 heures suivant un repas, et 11% sont utilisés spécifiquement pour la SPM (Groen *et al.* 2015) (Figure 14). Les AA restants peuvent être utilisés dans la synthèse de protéines dans d'autres tissus, désaminés pour la production d'énergie ou convertis en urée pour excréation (Stokes *et al.* 2018).

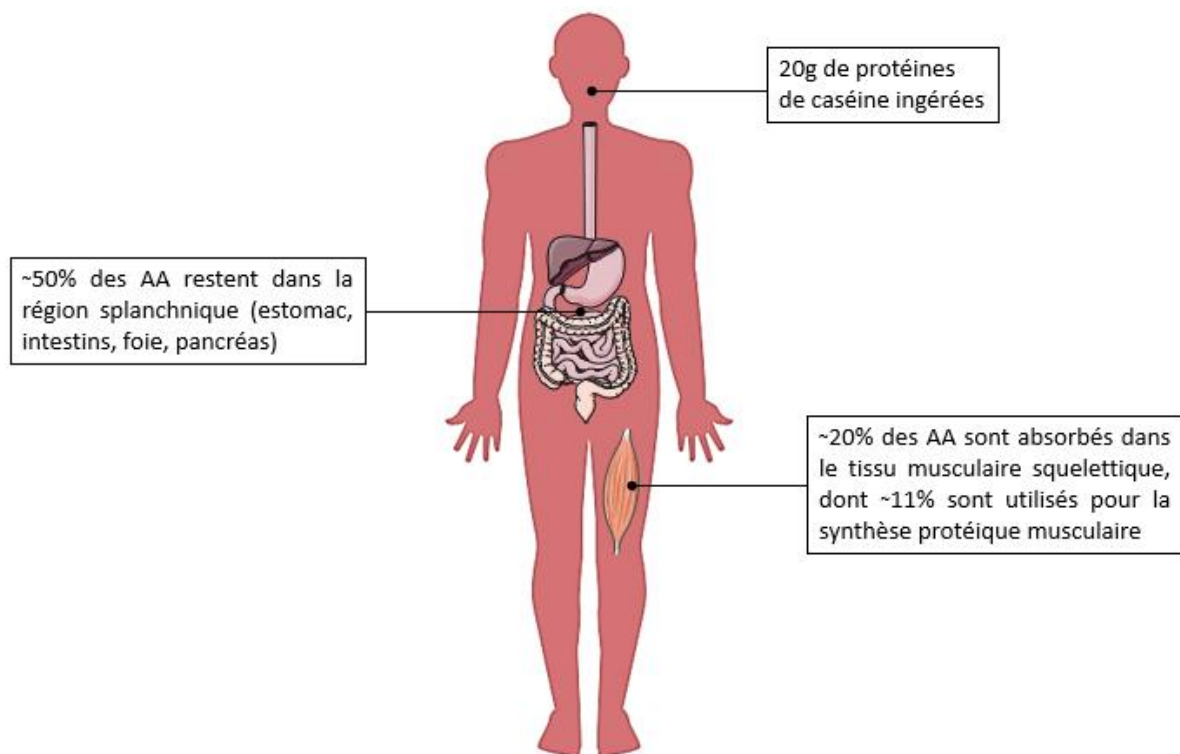


Figure 14. Distribution dans le corps humain de protéines de caséine ingérées (Adapté de Groen *et al.* 2015).

AA : acides aminés.

Les AAI, en particulier la leucine, jouent un rôle clé en tant que substrats et activateurs de la SPM (Stokes *et al.* 2018). La leucine active l'initiation la traduction via la voie de signalisation protéine kinase B (AKT)/cible de la rapamycine chez les mammifères (mTOR) en activant mTORC1 (Deane *et al.* 2021). La présence d'insuline et de facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1) peut également activer cette voie en stimulant la phosphatidylinositol 3

kinase (PI3K), qui active AKT, entraînant la phosphorylation de mTOR et, par conséquent, l'activation du complexe mTORC1. Cela conduit à la phosphorylation de la protéine ribosomique S6 kinase 1 (p70S6k) qui, à son tour, phosphoryle la protéine S6, un élément constitutif du ribosome. L'activation de mTORC1 entraîne également la phosphorylation de la protéine 1 de liaison au facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (4E-BP1), permettant la formation du facteur d'initiation eucaryote 4F (eIF4F) (Kimball 2014), essentiel pour l'association de ARN messenger (ARNm) avec le ribosome (Roux *et al.* 2007). Cela conduit à la traduction des ARNm en protéines.

En parallèle, l'ARN de transfert (ARNt) chargé de méthionine s'associe à l'ARNm avec l'aide de GTP et d'eIF2, un processus régulé en partie par la phosphorylation d'eIF2 α , influencée par certains AA (Cao *et al.* 2019). Ensuite, le ribosome glisse le long de l'ARNm, lisant chaque codon et ajoutant les AA correspondants à la chaîne de la protéine. Les ARNt apportent les AA au ribosome, formant ainsi une chaîne peptidique. Ce processus d'élongation est régulé par l'activité du facteur d'élongation eucaryotique 2 (eEF2) (Cao *et al.* 2019).

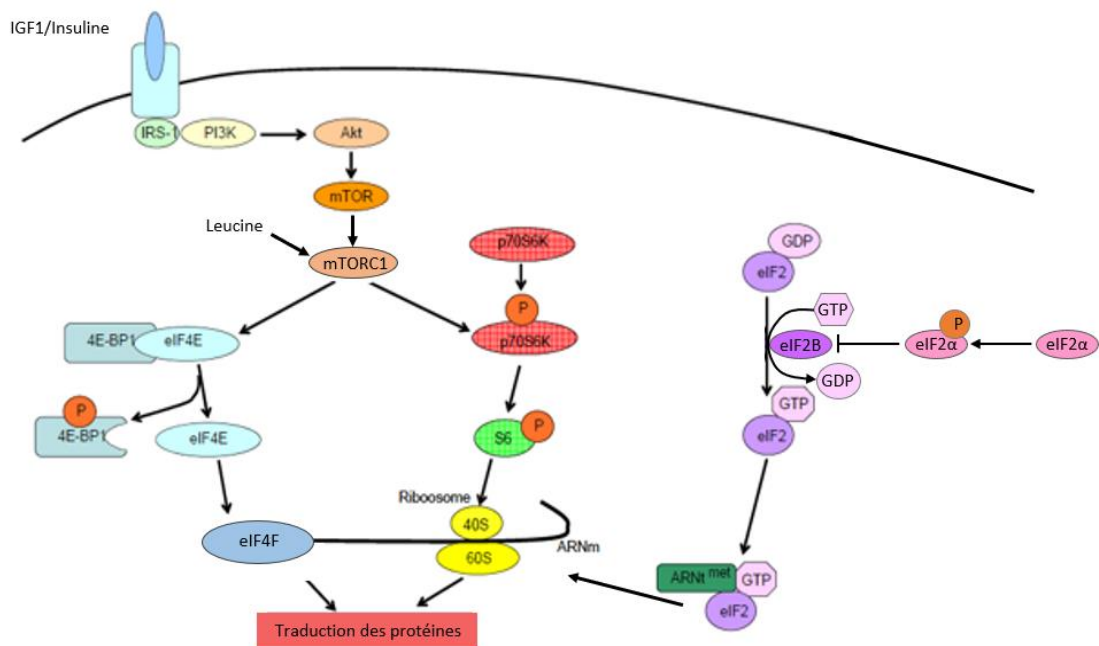


Figure 15. Etape d'initiation de la traduction des protéines (Adapté de Magne 2011 ; Kimball 2014 ; Cao *et al.* 2019).

IGF1 : facteur de croissance analogue à l'insuline 1 ; PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase ; Akt : Protéine kinase B ; mTOR : cible mammalienne de la rapamycine ; P : phosphorylé ; ARNm : Acide ribonucléique messenger ; ARNt : Acide ribonucléique de transfert ; Met : méthionine ; GDP : Guanosine diphosphate ; GTP : guanosine triphosphate ; eIF : facteur d'initiation eucaryotique

La réponse anabolique aux AA dépend de la quantité de protéines ingérées et est transitoire. Après environ 30 minutes, la SPM augmente fortement, atteignant un pic autour de 1,5 heure, puis revient à la normale après 2 heures, même si les AA sanguins restent élevés et que les signaux anaboliques persistent (Figure 16) (Atherton et Smith 2012). Cette limitation est due aux ressources énergétiques limitées (Adénosine triphosphate, ATP) et aux régulateurs au sein des cellules musculaires, qui finissent par ralentir la SPM même en présence continue d'AA.

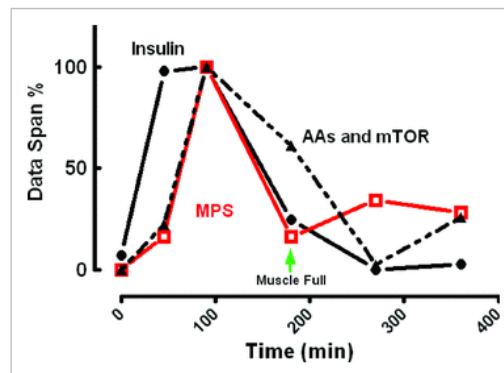


Figure 16. Relation entre la synthèse protéique musculaire, les acides aminés sanguins, et la signalisation intramusculaire (Atherton et Smith 2012).

AA : acides aminés ; mTOR : cible mammalienne de la rapamycine ; MPS : synthèse protéique musculaire

L'apport d'environ 20 g de protéines de bonne qualité alimentaire (ou environ 0,3 g/kg/repas) suffit à maximiser la SPM chez les individus jeunes. Des doses supérieures à 20g/repas n'améliorent pas le taux de SPM mais entraînent une oxydation de la leucine et une augmentation de la concentration d'urée plasmatique (Stokes *et al.* 2018). Toutefois, cela est à nuancer en fonction de facteurs tels que l'âge, l'exercice et les spécificités individuelles, et des doses supérieures à 20g/repas peuvent parfois induire une réponse anabolique accrue, notamment après un exercice de résistance (Witard *et al.* 2014).

1.2. Période post-absorptive et dégradation protéique

La dégradation des protéines spécifiques face aux divers changements physiologiques est essentielle notamment pour un renouvellement efficace des protéines endommagées et pour le maintien de l'homéostasie en réponse aux perturbations contractiles et nutritionnelles. En période *post-absorptive* et de jeûne, la concentration d'insuline chute à 5 μ UI/mL (Atherton

et Smith 2012) et les glucocorticoïdes augmentent, stimulant la protéolyse dans les cellules musculaires squelettiques pour fournir des AA au *pool* libre. La plupart des AA sont recyclés et utilisés pour la néoglucogenèse hépatique, la synthèse de nouvelles protéines, et certains (la leucine, l'isoleucine et la valine) sont consommés dans les muscles pour produire de l'énergie (Mitch et Goldberg 1996).

La principale voie responsable de la dégradation des protéines musculaires solubles et myofibrillaires est le système ubiquitine-protéasome (Lecker *et al.* 2006). Il se déroule selon deux étapes successives : l'ubiquitination de la protéine à détruire et la dégradation de la protéine marquée par le protéasome 26S. L'ubiquitine est exprimée de manière constitutive, mais peut être régulée à la hausse en période de stress cellulaire. L'ubiquitination consiste à marquer le substrat avec une chaîne de molécules d'ubiquitine via un mécanisme en cascade dépendant de l'ATP (Finn et Dice 2006). L'ubiquitine est activée par une enzyme d'activation E1, puis transférée à une enzyme de conjugaison E2. Avec l'aide de l'enzyme ligase E3, qui reconnaît spécifiquement les protéines cibles, l'ubiquitine est ensuite attachée à un résidu lysine de la protéine. En parallèle, les enzymes de désubiquitination jouent un rôle crucial en retirant les chaînes d'ubiquitine, régulant le processus de dégradation. Après qu'un minimum de 4 molécules d'ubiquitine soient liées à la protéine cible, celle-ci est reconnue et peut être dégradée par le protéasome 26S (Murton *et al.* 2008) (Figure 17). Il existe de multiples isoformes de ces enzymes permettant de reconnaître une large variété de classes de substrats protéiques. Par exemple, les enzymes ligases E3 *Muscle atrophy F-box* (MAFbx) et *Muscle Ring-Finger 1* (MuRF1), spécifiques aux muscles, ont été identifiées comme marqueurs d'une atrophie rapide. Leur expression est médiée par la phosphorylation des facteurs de transcription Fox-O, via une réduction de l'activation d'AKT (Zhao *et al.* 2007). Cependant, le protéasome ne peut pas dégrader les myofibrilles intactes, qui doivent subir une première étape de dégradation par l'activité protéolytique des calpaïnes, activées par le calcium (Jackman et Kandarian 2004).

La voie autophagique/lysosomale des protéines représente 10 à 20% de l'activité protéolytique au sein du muscle squelettique. Ce processus nécessite de l'ATP, fonctionne en réponse à des *stimuli* externes ou internes tels que le jeûne, une dégradation structurelle de certains organites, un stress oxydant, et sont principalement impliquées dans la dégradation de protéines membranaires ou extracellulaires (Finn et Dice 2006).

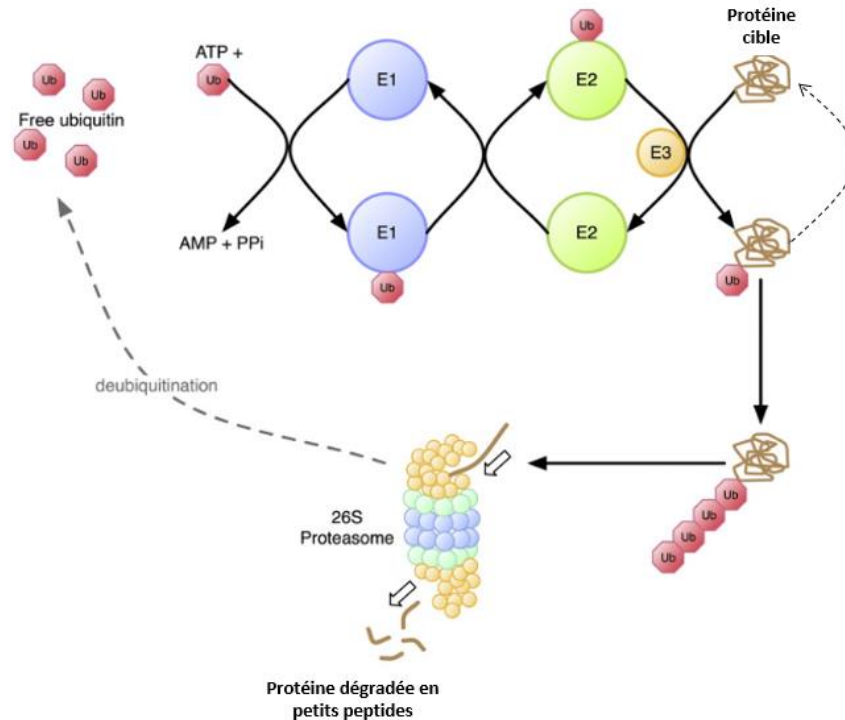


Figure 17. Dégradation dépendante de l'ATP des protéines ciblées par le système ubiquitine-protéasome (Traduit de Murton *et al.* 2008)

ATP : Adénosine triphosphate ; AMP, adénosine monophosphate ; E1 : enzyme d'activation ; E2 : enzyme de conjugaison ; E3 : ubiquitine ligase

Maintenir une masse musculaire avec un BPN neutre est essentiel pour la santé et le bien-être général. Cependant, si le BPN devient négatif en réponse à divers *stimuli*, cela entraîne une atrophie musculaire. Ce phénomène est particulièrement observé chez les personnes âgées en raison d'un métabolisme protéique musculaire devenant négatif au fil des années, entraînant une atrophie musculaire qui pourrait avoir de nombreux effets négatifs sur la santé.

2. La sarcopénie

Le vieillissement s'accompagne de changements de la composition corporelle, avec une augmentation progressive de la masse grasse et une diminution de la masse maigre (MM) (Prentice et Jebb 2001). Selon une étude sur les effets du vieillissement sur la composition corporelle, un individu de 25 ans pourrait voir sa masse grasse augmenter de 15 à 29% au cours des 50 prochaines années. De plus, la masse et la force musculaires atteignent un niveau maximal vers 30 ans pour les femmes et les hommes. Au-delà de 50 ans, une perte annuelle

de 1 à 2% de la masse musculaire des membres inférieurs couplée à une diminution de 1,5 à 5% de la force sont signalées (Cruz-Jentoft *et al.* 2019)(figure 18).

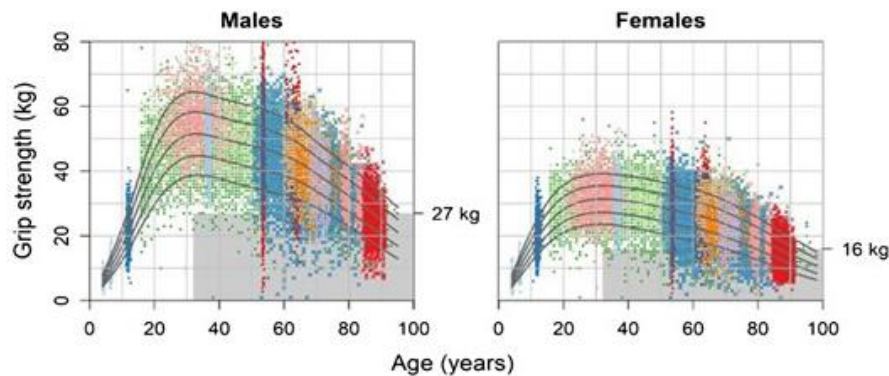


Figure 18. Données normatives sur la force de préhension tout au long de la vie chez les hommes et les femmes au Royaume-Uni (Cruz-Jentoft *et al.* 2019).

2.1. Définition

La sarcopénie a été décrite pour la première fois par Rosenberg dans les années 1980 (Rosenberg 1989). Depuis, sa définition a évolué, la plus récente ayant été présentée par le consensus de 2018 du groupe de travail européen sur la sarcopénie chez les personnes âgées (EWGSOP). La sarcopénie est divisée en trois stades (Cruz-Jentoft *et al.* 2019) :

- Probable : identifiée par une faible force musculaire.
- Confirmée : une faible force musculaire accompagnée d'une faible quantité ou qualité musculaire.
- Sévère : caractérisée par une faiblesse musculaire, une faible quantité ou qualité musculaire et une faible performance physique.

La sarcopénie peut être aiguë, par exemple lors d'une hospitalisation soudaine, ou chronique, évoluant sur une longue période. Elle peut être primaire, liée au vieillissement, ou secondaire, causée par d'autres facteurs comme des maladies systémiques (cancer, maladies inflammatoires...), l'inactivité ou la malnutrition (dénutrition protéino-énergétique, anorexie, obésité...) (Cruz-Jentoft *et al.* 2019). Dans cette partie, nous explorerons uniquement la sarcopénie primaire.

2.2. Prévalence

La prévalence de la sarcopénie est controversée, variant de 3% à 52% selon la définition et méthodologies utilisées (Fielding *et al.* 2011). En moyenne, 5 à 13 % des personnes de plus de 60 ans ont une faible masse musculaire, ce chiffre pouvant atteindre 50 % chez les

personnes de plus de 80 ans (Morley *et al.* 2014). Le risque de sarcopénie augmente avec l'âge, sans qu'il y ait de différence avérée dans la prévalence entre les hommes et les femmes (Cruz-Jentoft et Montero-Errasquín 2018). La sarcopénie accroît le risque de chutes (Luo *et al.* 2024), et les complications post-opératoires (Chang *et al.* 2023), réduit la qualité de vie (Beaudart *et al.* 2015) et augmente la mortalité (Batsis *et al.* 2014). Le dépistage et le diagnostic de la sarcopénie sont donc essentiels pour réduire le risque de perte d'autonomie.

2.3. Dépistage et diagnostic

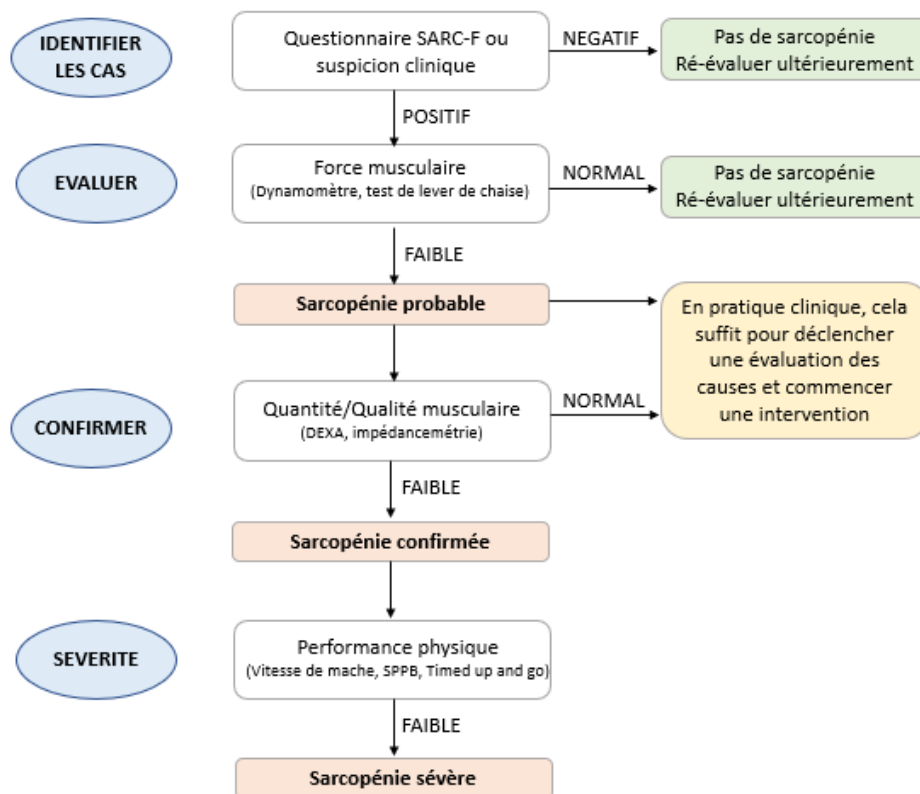


Figure 19. Diagramme pour la recherche de cas, l'établissement d'un diagnostic et la quantification de la sévérité de la sarcopénie en pratique clinique (Adapté de Cruz-Jentoft *et al.* 2019).

Plusieurs tests ont été validés pour caractériser la sarcopénie. La première étape consiste à dépister les cas de sarcopénie. La deuxième étape est de réaliser le diagnostic en mesurant les paramètres de la sarcopénie, à savoir la force, la masse musculaire et les performances physiques (Figure 19).

a. Dépistage des cas de sarcopénie

Le questionnaire SARC-F se compose de cinq questions évaluant les patients sur leur force, leur marche, leur capacité à se lever, à monter les escaliers et le nombre de chutes. Il s'agit d'une méthode simple et peu coûteuse pour détecter des personnes potentiellement atteintes de sarcopénie (Cruz-Jentoft *et al.* 2019). Elle est particulièrement utile dans les milieux où une prévalence plus élevée de cas de sarcopénie est attendue, tel que l'hôpital, les maisons de retraites et de rééducation (Landi *et al.* 2012 ; Churilov *et al.* 2018).

b. Mesure de la force musculaire

Le diagnostic débute par la mesure de la force musculaire, souvent évaluée par la force de préhension à l'aide d'un dynamomètre (Figure 20) (Abizanda *et al.* 2012). Une force de préhension inférieure à 27kg pour les hommes et 16kg pour les femmes est considérée comme un signe de sarcopénie (Cruz-Jentoft *et al.* 2019). Cependant, une faible force musculaire peut être attribuée à d'autres causes comme l'arthrose de la main ou la dépression, et doivent donc être considérées lors du diagnostic (Abizanda *et al.* 2012). Le test de lever de chaise, durant lequel le patient se lève cinq fois sans utiliser les bras, peut également être utilisé. Un temps supérieur à 15 secondes indique la présence d'une sarcopénie (Cruz-Jentoft *et al.* 2019).

Pour les modèles murins, les membres antérieurs de l'animal sont placés sur la barre de tension et l'animal est tiré vers l'arrière jusqu'à ce qu'il lâche la barre. La force est mesurée à l'aide d'une jauge de force reliée à la barre (Figure 20) (Xie *et al.* 2021).



Figure 20. Dynamomètre Jamar, validé pour mesurer la force de préhension chez l'Homme (A). *Griptest* pour mesurer la force de préhension chez les rongeurs (B).

c. Mesure de la masse musculaire

La masse musculaire chez des patients peut être mesurée par diverses techniques, dont l'absorptiométrie biphotonique (DEXA), la plus précise et juste à ce jour, et l'analyse d'impédance bioélectrique (BIA), qui estime la masse musculaire basée sur la conductivité électrique du corps (Cruz-Jentoft et Sayer 2019). La sarcopénie est confirmée si la masse musculaire squelettique appendiculaire est inférieure à 7kg/m^2 chez les hommes ou $5,5\text{kg/m}^2$ chez les femmes (Cruz-Jentoft *et al.* 2019). La tomодensitométrie (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) peuvent également être utilisées pour mesurer la masse musculaire mais sont réservées à la recherche clinique en raison de leur coût.

Ces méthodes s'appliquent aux modèles murins. La DEXA peut être utilisée pour mesurer la masse grasse et MM, mais elle nécessite d'anesthésier les animaux (Halldorsdottir *et al.* 2009). L'écho-IRM, en comparaison, peut mesurer rapidement et sans radiation la MM, la masse grasse et la teneur en eau (Xie *et al.* 2021).

d. Mesure de la performance physique

La performance physique, ou la capacité à effectuer des tâches simples quotidiennes (Cruz-Jentoft et Sayer 2019), est souvent mesurée par la vitesse de marche sur 4m. Une vitesse $\leq 0.8\text{m/s}$ est un indicateur de sarcopénie sévère (Cruz-Jentoft *et al.* 2019). D'autres tests plus complexes sont également utilisés comme le test *Short Physical Performance Battery* (SPPB) comprenant une évaluation de la vitesse de marche, d'équilibre et du lever de chaise, ou le test *Timed Up and Go*, incluant un lever de chaise, un parcours de marche sur une distance de 3m et un retour assis.



Figure 21. Rotarod utilisé pour évaluer la vitesse de marche des souris ou des rats.

Chez les rongeurs, le test du rotarod est généralement utilisé pour évaluer la vitesse de marche. Les animaux sont placés sur un cylindre tournant à une vitesse qui accélère en fonction du temps et la vitesse est enregistrée lorsque l'animal tombe (Figure 21) (Pritchett et Mulder 2003).

e. Tests alternatifs

D'autres méthodes peuvent être employées pour déterminer la quantité et la qualité musculaire et améliorer notre compréhension des mécanismes de la sarcopénie. Par exemple, la qualité musculaire faisant référence aux caractéristiques observables du muscle comme l'infiltration de lipides, peut être observée soit à l'aide de l'analyse d'une biopsie de muscle, soit par TDM ou IRM (Grimm *et al.* 2018; Cruz-Jentoft *et al.* 2019). Évaluer la qualité du tissu musculaire offre une approche plus précise pour évaluer la santé métabolique et identifier les pathologies musculaires, sans se limiter à la mobilité ou à la force musculaire. Contrairement à la simple mesure de la masse musculaire, cette approche permet de mieux comprendre l'état de santé global du muscle. Toutefois, des études de validation supplémentaires sont nécessaires avant que ces méthodes alternatives puissent être adoptées en pratique clinique (Cruz-Jentoft et Sayer 2019).

Le renouvellement des protéines musculaires est également un paramètre important de la sarcopénie et peut être mesuré par le taux de synthèse fractionnaire (FSR) des protéines musculaires en utilisant des traceurs isotopiques stables. Pour cela, un traceur isotopique AA (par exemple la ^{13}C leucine) est administré par voie intraveineuse, ce qui entraîne un enrichissement plasmatique accru de l'isotope. Les AA marqués sont absorbés par le muscle dans le pool d'AA intracellulaire puis sont incorporés dans les protéines musculaires. Après une biopsie musculaire, l'enrichissement en AA marqué dans les protéines musculaires est déterminé par spectrométrie de masse après dérivation de l'AA. Puis le FSR peut être calculé (Figure 22) (Yarasheski 2003 ; Joannisse *et al.* 2021). Une méthode similaire peut également être réalisée chez l'animal pour une meilleure compréhension des altérations pathologiques du muscle avec l'âge. Pour cela, une dose de traceur isotopique AA (par exemple la ^{13}C valine) est injectée par voie sous-cutanée afin de saturer le pool de précurseur de la synthèse protéique. Après un instant t , les muscles sont prélevés et les AA sont dérivés afin de mesurer l'enrichissement isotopique par CG et spectrométrie de masse (Tardif *et al.* 2014).

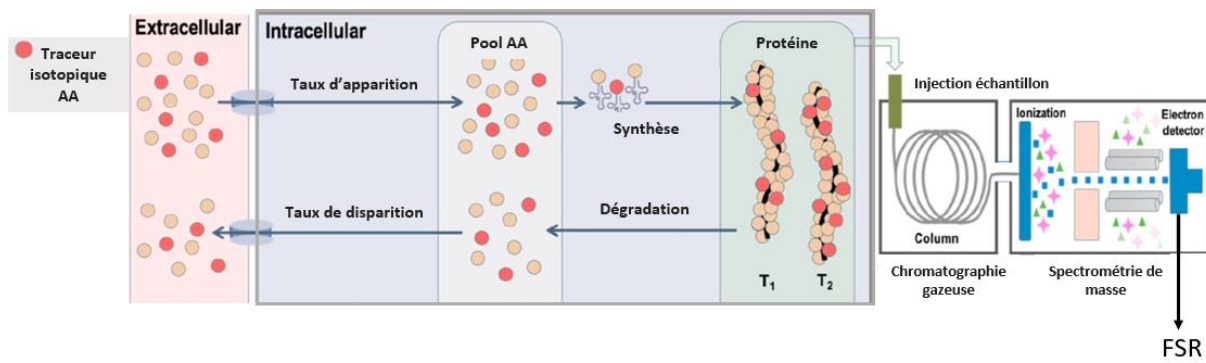


Figure 22. Schéma illustrant la mesure du taux de synthèse fractionnaire (FSR) par l'utilisation de traceurs isotopiques stables acides aminés (Traduit de Joanisse *et al.* 2021)

2.4. Causes et mécanismes

La sarcopénie associée au vieillissement, est multifactorielle, ce qui rend difficile l'identification d'une cause directe pour une intervention thérapeutique. Cependant, ces facteurs issus de divers mécanismes semblent converger vers la perturbation de l'homéostasie des protéines musculaires, ce qui contribue à une atrophie des fibres musculaires (Figure 23).

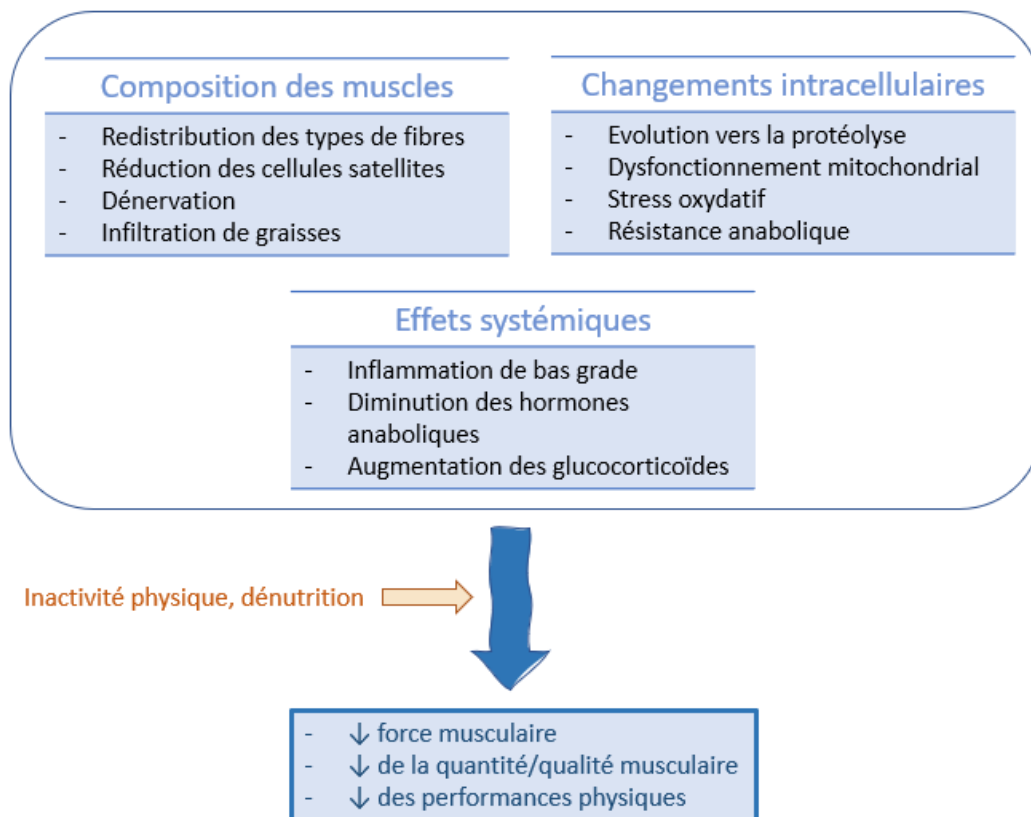


Figure 23. Les principales causes et caractéristiques de la sarcopénie associée au vieillissement comprenant plusieurs composantes, allant du niveau cellulaire aux effets systémiques. Ce mélange complexe de facteurs, combiné à d'autres situations associées telles que l'inactivité physique ou la dénutrition, peut conduire aux principales caractéristiques de la sarcopénie.

a. Inflammation chronique

Les personnes âgées sont susceptibles de développer une inflammation chronique, appelée inflammation de bas grade, caractérisée par une augmentation de la production des marqueurs de l'inflammation comme l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF α) (Bian *et al.* 2017). En effet, il a été rapporté que les taux sanguins de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 augmentent de 2 à 4 fois chez les personnes âgées par rapport aux jeunes adultes en bonne santé (Nishikawa *et al.* 2021). Une étude observationnelle portant sur 2000 personnes âgées a révélé que des taux de concentrations sanguines élevés de TNF α étaient associés à une diminution de la masse musculaire squelettique et de la force de préhension (Schaap *et al.* 2009). La sarcopénie est souvent accompagnée de cet état inflammatoire car les marqueurs inflammatoires élevés influencent négativement le métabolisme du muscle squelettique par divers mécanismes cataboliques directs ou indirects, tels que la stimulation de la dégradation protéique et l'altération des protéines musculaires (Schaap *et al.* 2009 ; Dalle *et al.* 2017). En effet, les cytokines inflammatoires activent la protéolyse par les voies NF-kB et p38 MAPK, connues pour induire MuRF-1 et MAFbx, ainsi qu'en augmentant les niveaux de myostatine qui activent le facteur de transcription FOX-O (Hoppeler 2016 ; Wiedmer *et al.* 2021). De plus, TNF- α et IL-1 β diminuent l'activation de la voie de signalisation mTORC1 en inhibant l'expression et l'activité d'IGF1, entraînant une réduction de la synthèse protéique (Fernández-Celemín *et al.* 2002).

Dans le cadre de la sarcopénie, les altérations du métabolisme protéique peuvent être reliées à un gain de masse grasse et une infiltration lipidique dans le tissu musculaire (Taaffe *et al.* 2008). Leur accumulation dans le muscle âgé peut résulter d'un défaut du tissu adipeux à tamponner l'excès d'AG circulant, d'un dysfonctionnement mitochondrial ou de la présence d'une inflammation chronique. Cette infiltration lipidique favorise et entretient la sarcopénie. En effet, certaines espèces lipidiques telles que les céramides ou les DG ont été décrites comme étant des inhibiteurs de la voie de signalisation de l'insuline, au niveau de la protéine AKT (Capel *et al.* 2019). De plus, la libération des AG libres par les adipocytes est accompagnée par une sécrétion de marqueurs pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-6 et IL-1, conduisant à un cercle vicieux qui maintient l'inflammation du tissu adipeux et du muscle squelettique (Wiedmer *et al.* 2021).

De plus, l'inflammation chronique perturbe le fonctionnement mitochondrial, entraînant une diminution de la production d'ATP et une production excessive de ERO, qui induit une protéolyse (cf partie 3 2.4.e) (Nishikawa *et al.* 2021).

Ainsi, une stratégie anti-inflammatoire précoce pourrait être une approche efficace pour réduire la perte de masse musculaire dans la sarcopénie (Rieu *et al.* 2009).

b. Modification des fibres musculaires

Avec le vieillissement, il se produit une diminution de la taille du muscle, caractérisée par une réduction du nombre total de fibres, pouvant atteindre jusqu'à 25% entre 30 et 72 ans (Lexell *et al.* 1983). Cette diminution est plus importante pour les fibres de type II en raison d'une diminution de l'expression des gènes de la myosine de type II chez les hommes et les femmes âgés (Coggan *et al.* 1992 ; Andersen 2003 ; Jones *et al.* 2009 ; Verdijk *et al.* 2014). De plus, avec le vieillissement, il y a l'apparition d'au moins un tiers de fibres coexprimant plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (Evans et Lexell 1995).

Les motoneurones sont responsables de transmettre les signaux nerveux aux fibres musculaires, permettant leur contraction. Un motoneurone et les fibres musculaires qu'il innerve forment ensemble une unité motrice. Avec l'âge, le nombre de motoneurones diminue, entraînant une diminution du nombre d'unités motrices. Cette dénervation, c'est-à-dire la perte d'innervation par les motoneurones, réduit le nombre de fibres musculaires activées, ce qui se traduit par une diminution de la force musculaire et une moindre précision dans la coordination motrice (Deschenes 2004 ; Keller 2019). En outre, il semblerait qu'avec le vieillissement, une dénervation des unités motrices favorise les pertes des unités motrices rapides innervant les fibres de type 2 (contenant les fibres de type IIA et IIX) (Narici et Maffulli 2010). Ces changements dans les types de fibres musculaires, de rapides à lentes, suggèrent une transition potentielle d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif dans le muscle squelettique avec le vieillissement, ce qui pourrait nécessiter une plus grande quantité de mitochondries (Dao *et al.* 2020). Cependant, l'expression des chaînes lourdes de myosine est également affectée par l'activité physique qui favorise les fibres de type II (Martel *et al.* 2006 ; Nilwik *et al.* 2013). Ainsi, le profil de distribution du type de fibre dépend de l'âge et du statut d'activité physique, et varie selon les individus.

La diminution de la surface occupée par les fibres de type II s'accompagne d'une réduction du nombre de cellules satellites associées à ces fibres musculaires (Verdijk *et al.* 2014) ainsi que d'une diminution de leurs capacités régénératives (Wiedmer *et al.* 2021). Les cellules satellites jouent un rôle crucial dans la croissance et la régénération du tissu musculaire en ayant la capacité de proliférer, de se différencier et de fusionner avec les fibres musculaires existantes ou d'en former des nouvelles. Cette diminution pourrait être expliquée par des temps de doublement cellulaire prolongés, une réponse réduite aux stimuli prolifératifs, un raccourcissement des télomères et une réduction de la capacité à se différencier en myotubes (Wiedmer *et al.* 2021). En tout état de cause, elle représente un facteur clé dans l'atrophie musculaire liée au vieillissement (Shefer *et al.* 2006).

c. Résistance anabolique

La régulation de la masse musculaire squelettique dépend des processus de SPM et DPM. La voie mTOR/AKT joue un rôle crucial dans l'anabolisme des protéines musculaires, régulée par des facteurs tels que les AA (notamment la leucine), l'exercice, l'insuline et diverses hormones. Ces *stimuli* induisent la phosphorylation de mTOR dans les myocytes. Cependant, avec le vieillissement, il y a souvent une résistance à ces signaux anaboliques, phénomène connu sous le nom de "résistance anabolique" (Cuthbertson *et al.* 2005) (figure 24).

Les mécanismes exacts de la résistance anabolique associée au vieillissement ne sont pas complètement compris. Des études montrent qu'avec l'âge, il y a une augmentation de la phosphorylation de mTOR et de p70S6k au repos pendant la période *post*-absorptive, comparativement à des individus jeunes, suggérant une augmentation basale de la signalisation mTOR/AKT avec l'âge (Markofski *et al.* 2015). Il a été observé chez des souris qu'une activation continue de mTORC1 pouvait inhiber l'autophagie, normalement induite pendant l'état *post*-absorptif, ce qui contribue au développement d'une myopathie. Cette myopathie est liée à une altération du processus catabolique entraînant l'accumulation de protéines endommagées et la perturbation de l'homéostasie cellulaire (Castets *et al.* 2013). Par ailleurs, en réponse aux AA, les personnes âgées présentent une activation réduite de la phosphorylation de p70S6k (Guillet *et al.* 2004) et de mTOR (Cuthbertson *et al.* 2005) par rapport aux sujets jeunes. De plus, la diminution du flux sanguin microvasculaire dans les muscles liés à l'âge pourrait compromettre l'apport en AA et contribuer à la diminution de la SPM chez les personnes âgées (Mitchell *et al.* 2013).

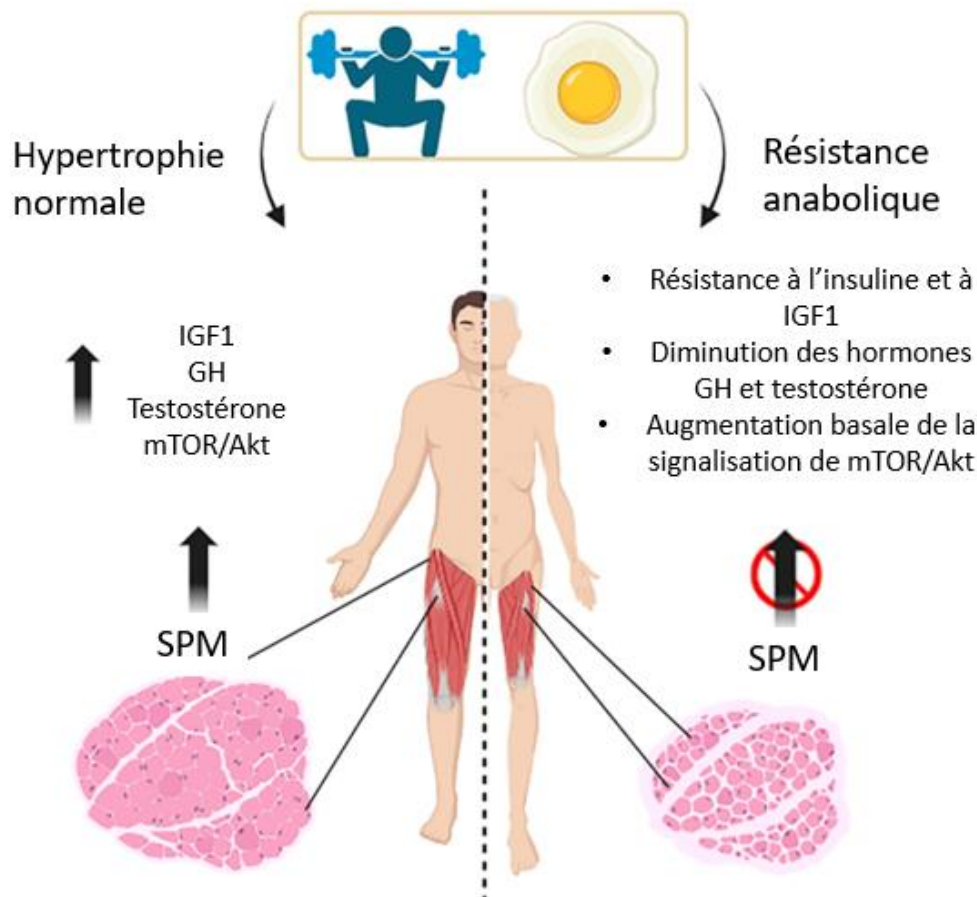


Figure 24. Impact de l'exercice et de l'ingestion de protéines sur la synthèse protéique : comparaison entre les jeunes (gauche) et les personnes âgées (droite) en contexte de résistance anabolique du muscle squelettique (Adapté de Tezze *et al.* 2023).

IGF1 : facteur de croissance analogue à l'insuline 1, GH : hormone de croissance, SPM : synthèse protéique musculaire

La résistance anabolique est également observée après l'exercice, avec une diminution de la signalisation de mTORC1, p70S6k et 4EBP1 associée au vieillissement en réponse à l'activité physique (Kumar *et al.* 2009 ; Fry *et al.* 2011). De plus, la contraction des muscles squelettiques lors d'un exercice de résistance provoque la libération d'IGF1 (Barclay *et al.* 2019). Ce facteur active la voie Akt/mTOR par l'intermédiaire de PI3K. Ainsi, une diminution de la fréquence et de l'efficacité des exercices en résistance, généralement observée chez les personnes âgées, réduit l'activation de cette voie et la synthèse protéique.

Les taux sanguins des hormones telles que l'insuline, GH, IGF1 et la testostérone sont positivement corrélée à la masse musculaire squelettique (Bian *et al.* 2020). Ces hormones sont considérées comme des facteurs anaboliques qui activent la voie AKT/mTOR par PI3K et inhibent la dégradation protéique (Bhasin *et al.* 2003 ; Boirie *et al.* 2005 ; Barclay *et al.* 2019 ;

Bian *et al.* 2020). Cependant, le vieillissement entraîne une diminution des concentrations sanguines de testostérone et de GH, ainsi qu'une résistance à l'insuline et à l'IGF-1 (Fink *et al.* 1983; Sherlock et Toogood 2007). Par exemple, les concentration plasmatique d'IGF1 diminuent de 50 % à l'âge de 60 ans, en partie à cause de la baisse de la sécrétion de GH. Ces diminutions de GH/IGF1 réduisent l'anabolisme protéique dans les cellules musculaires squelettiques (Bian *et al.* 2020).

Ainsi, ces résultats suggèrent qu'avec l'âge, une résistance aux *stimuli* anaboliques se développe, réduisant la synthèse protéique et empêchant de compenser les pertes en protéines musculaires, ce qui peut en partie expliquer l'apparition progressive de la sarcopénie.

d. Le dysfonctionnement mitochondrial

Le dysfonctionnement mitochondrial se traduit par un déclin de l'activité mitochondriale, entraînant un apport énergétique compromis et un stress oxydant intracellulaire élevé. Ce phénomène est fréquemment associé au vieillissement et sa progression dans les muscles squelettiques et les motoneurones peut contribuer au développement de la sarcopénie (Dao *et al.* 2020).

Un dysfonctionnement mitochondrial entraîne une accumulation accrue d'ERO, provoquant ainsi une oxydation progressive des constituants cellulaires notamment de l'ADN mitochondrial (ADNmt), générant des protéines défectueuses et un dysfonctionnement général (Son et Lee 2021). Parallèlement, la mitophagie, qui élimine sélectivement les mitochondries endommagées via l'autophagie, est réduite avec l'âge (Sun, Youle, et Finkel 2016). Cela accentue le phénomène d'oxydation dans les cellules, conduisant à l'accumulation de mutation de l'ADNmt et peut conduire à une production défectueuse d'ATP (Ferri *et al.* 2020). Or, la SPM et la contraction musculaire nécessite une grande quantité d'énergie sous forme d'ATP, produite en partie par les voies de phosphorylation oxydative dans les mitochondries. Ainsi, le dysfonctionnement mitochondrial diminue l'efficacité des muscles à produire de l'énergie nécessaire à la contraction musculaire et au métabolisme protéique.

De plus, ces mutations de l'ADNmt sont associées à une perte de la fonction mitochondriale dans les motoneurones, ce qui peut mener à la dénervation des fibres musculaires (Rygiel *et al.* 2014). L'accumulation de mutations de l'ADNmt pourrait également

augmenter l'apoptose dans le muscle vieillissant, contribuant à la perte de fibres (Dirks *et al.* 2006 ; Gousspillou *et al.* 2014).

Un facteur de régulation, le coactivateur 1 du récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (*pgc1- α*), joue un rôle clé dans la biogénèse mitochondriale et sa surexpression chez des souris transgénique a permis de prévenir l'atrophie musculaire en réduisant l'autophagie (Sandri *et al.* 2006). Cependant, il a été observé que les niveaux basaux d'ARNm de *pgc1- α* sont réduits de 42% chez les sujets âgés de plus de 65ans en comparaison au sujets jeunes de 18 à 30ans (Ghosh *et al.* 2011).

Ainsi, la sarcopénie liée à l'âge semble être associée à une augmentation de la production de ERO, à une production défectueuse d'ATP, à une sensibilité accrue à l'apoptose, ainsi qu'à une diminution de la biogénèse mitochondriale induite par diminution de *pgc1- α* .

e. Dégradation des protéines

L'homéostasie musculaire est également étroitement régulée par la dégradation des protéines via le système ubiquitine/protéasome, notamment par l'activation des ligases MAFbx et MuRF1, connues comme marqueurs de l'atrophie musculaire (Bodine *et al.* 2001). Ce processus de dégradation est activé par deux voies principales : la voie de la protéines kinase activée par le mitogène p38 (p38 MAPK) et la voie du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (Wiedmer *et al.* 2021).

Des études ont montré que les niveaux d'expression de MAFbx ne montrent pas de différence significative entre les jeunes adultes et les personnes âgées, tandis que les résultats pour MuRF1 sont divergents (Whitman *et al.* 2005 ; Raue *et al.* 2007 ; Léger *et al.* 2008). Cependant, l'inactivité physique, souvent associée au vieillissement, augmente les niveaux d'expression de *mafbx* et *murf1*, contribuant potentiellement à une plus forte dégradation musculaire chez les personnes âgées (Jones *et al.* 2004).

De plus, la 3-méthylhistidine est considéré comme un biomarqueur de la DPM car elle est libérée dans le sang lors de la protéolyse des protéines myofibrillaires puis est excrétée dans l'urine sans pouvoir être réutilisée (Papadopoulou *et al.* 2022). Il a été observé que les concentrations urinaire de la 3-méthylhistidine chez les individus âgés était plus importante que chez les individus jeunes, suggérant une protéolyse musculaire accrue chez les personnes âgées contribuant à la sarcopénie (Yarasheski 2003).

Globalement, l'absence de résultats clairs disponibles dans la littérature concernant le niveau d'expression de *mafbx* et *murf1* entre les personnes âgées et les jeunes rend difficile la détermination précise de leur rôle dans la perte de masse musculaire au cours du vieillissement. Ces marqueurs, bien qu'associés à l'activité protéolytique, fournissent des indications indirectes et éloignées du processus réel de dégradation protéique dans le muscle. Cela complique leur utilisation pour évaluer précisément l'impact de la protéolyse sur la sarcopénie. Ainsi, d'après l'ensemble des données disponibles dans la littérature, la perte de masse musculaire squelettique liée à l'âge semble être principalement due à une résistance accrue à la synthèse protéique plutôt qu'à une augmentation de la dégradation, il est important de rester prudent dans l'interprétation de ces résultats (Murton *et al.* 2008).

Différentes stratégies pouvant limiter le développement de la sarcopénie ont été évaluées ces dernières années en prenant en considération ces mécanismes. Des programmes d'activité physique (Shen *et al.* 2023), ainsi que des interventions nutritionnelles, telles que des apports complémentaires et ciblés de vitamine D, de protéines, d'AAI et d'AGPI oméga 3 à longue chaîne ont été testées. La combinaison de l'activité physique et d'une alimentation adéquate peut favoriser l'hypertrophie musculaire (Atherton et Smith 2012). Dans les sections suivantes, nous nous concentrerons sur la prévention de la sarcopénie par l'apport en protéines et en AGPI.

3. Prévention par l'apport protéique

A côté du mode de vie sédentaire, une alimentation insuffisante ou une dénutrition protéino-énergétique est un facteur causal de la sarcopénie. Les interventions nutritionnelles, y compris une augmentation de l'apport en protéines de bonnes qualités nutritionnelles, peuvent moduler la santé musculaire chez les personnes âgées et contribuer à protéger contre la sarcopénie (Fekete *et al.* 2023 ; Nasimi *et al.* 2023).

3.1. Importance de la quantité de protéines consommées

L'Agence nationale de sécurité sanitaire *et* alimentaire (ANSES) recommande une quantité quotidienne de 1g de protéines/kg de poids corporel/jour pour les personnes âgées en bonne santé, ce qui est supérieur à l'apport journalier recommandé de 0,83g de protéines/kg de poids corporel/jour pour la population générale plus jeune (ANSES 2007). Au cours du

vieillesse, ces apports recommandés plus élevés en protéines sont nécessaires pour contrer la résistance anabolique et stimuler efficacement la SPM sur 24h (Moore *et al.* 2015). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus international sur l'augmentation de l'apport protéique recommandée pour cette population, du fait de la divergence des résultats selon les études et de la variabilité des besoins individuels. En effet, la quantité de protéines recommandée devrait être ajustée individuellement en fonction de l'état nutritionnel, du niveau d'activité physique, de l'état pathologique et de la tolérance (Volkert *et al.* 2022). De plus, la répartition des protéines sur trois repas journaliers semble être optimale pour stimuler la SPM avec l'âge. Cela représente 0,24g/kg/repas pour les personnes plus jeunes et 0,40g/kg/repas chez les personnes plus âgées (Moore *et al.* 2015).

3.2. Protéines lentes et rapides

La vitesse de digestion est également un paramètre important qui contrôle l'anabolisme des protéines. Chez les jeunes individus, les protéines à digestion lente, telle que la caséine, entraîne une concentration plasmatique *post*-prandiale en AA modérée mais prolongée dans le temps, favorisant un gain protéique *post*-prandial plus élevé. Les protéines à digestion rapide, comme le lactosérum, entraîne à l'inverse une hyper-aminoacidémie plus intense mais courte (Boirie *et al.* 1997 ; Dangin *et al.* 2001).

Il est intéressant de noter que chez les personnes âgées, la consommation de protéines de lactosérum améliore la SPM et la rétention protéique *post*-prandiale en augmentant plus efficacement la leucinémie *post*-prandiale comparativement aux protéines de caséine (Dangin *et al.* 2002, 2003 ; Walrand *et al.* 2016). Les protéines à digestion rapide pourraient contrecarrer la résistance anabolique observée au cours du vieillissement (Boirie et Guillet 2018).

Les différences entre les protéines rapides et lentes sont dues à leurs caractéristiques physiques et à leur comportement dans le système gastro-intestinal, ce qui affecte la vitesse de vidange gastrique, ainsi que la cinétique de digestion et d'absorption (Boirie et Guillet 2018). En comparaison avec les protéines de lait de vache, composées à 80% de caséines et 20% de lactosérum, les protéines de soja montrent une vidange gastrique plus lente (Moughan *et al.* 1991), mais une vitesse de digestion intestinale plus rapide, entraînant une libération plus précoce des AA dans le sang (Bos *et al.* 2003). Ainsi, les protéines de soja

peuvent être considérées comme des protéines intermédiaires, situées entre la caséine et le lactosérum et pourraient être bénéfiques pour les personnes âgées.

3.3. La source protéique

La qualité des protéines varie selon la source alimentaire vectrice. Les protéines animales sont reconnues pour leur haute qualité nutritionnelle, en raison de leur teneur élevée en AAI, de leur bonne digestibilité et de la biodisponibilité postprandiale des AAI (Connolly *et al.* 2023). Des études ont montré que les protéines animales sont un puissant stimulateur de la SPM *post*-prandiale aiguë, en comparaison à leurs homologues végétaux. Par exemple, l'ingestion d'un repas omnivore contenant du bœuf entraîne une meilleure disponibilité *post*-prandiale des AAI circulants et un taux de SPM 47% plus élevé par rapport à l'ingestion d'un repas végan iso-protéique et iso-calorique, chez les hommes et les femmes âgés (Pinckaers *et al.* 2023). Cependant, il serait possible de compenser la capacité anabolique plus faible des protéines végétales en adaptant leur teneur en leucine ou en augmentant leur quantité, comme le montre l'ingestion de 60g d'hydrolysate de protéines de blé, qui a permis d'obtenir des taux de SPM comparables à ceux de la caséine ou du lactosérum (Gorissen *et al.* 2016) (figure 25).

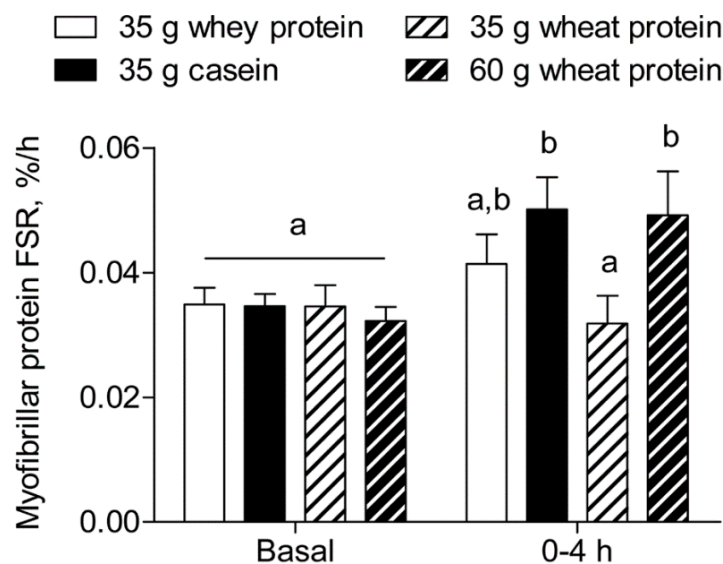


Figure 25. Taux de synthèse fractionnaire des protéines myofibrillaires (FSR, %/h) pendant l'état de jeûne (basal) et pendant la période postprandiale de 4 h après l'ingestion de 35g de protéines de lactosérum, 35g de caséine, 35g de protéines de blé ou 60g de protéines de blé chez des hommes âgés en bonne santé (Gorissen *et al.* 2016).

Malgré l'avantage d'une consommation de protéines animales sur la SPM aiguë, des études menées sur des populations chinoises âgées ont révélé qu'un apport quotidien important en protéines végétales pendant plusieurs années était associée à une masse musculaire plus élevée chez les hommes et les femmes (Huang *et al.* 2016 ; Ouyang *et al.* 2022) et à de meilleures performances physiques au test de marche de 6m chez les femmes (Yeung et Woo 2022). Ces résultats soulignent l'importance des protéines végétales dans le maintien de la masse musculaire dans un régime omnivores. Néanmoins, l'efficacité des protéines végétales pourrait être partiellement attribuée à la présence de phytonutriments et de fibres associés aux protéines. Les phytonutriments peuvent en effet aider à maintenir la MM en agissant sur l'autophagie (Sun *et al.* 2023), tandis que les fibres alimentaires diminuent l'inflammation et favorisent la synthèse des AGCC, aidant à préserver la qualité musculaire en activant les enzymes AMPK, PPAR- δ et PGC1 α (Kao *et al.* 2023).

Cependant, d'autres recherches montrent une image plus nuancée. Par exemple, une étude de trois ans sur des femmes âgées a trouvé une association positive entre l'apport en protéines animales et la MM, mais pas avec les protéines végétales (Isanejad *et al.* 2015). De plus, le végétarisme à long terme chez des femmes âgées semble compromettre le maintien de la MM comparé à un régime omnivore (Aubertin-Leheudre et Adlercreutz 2009), tandis que d'autres travaux n'ont pas observé de différences significatives entre les sources protéiques sur l'hypertrophie musculaire ou la surface musculaire au fil du temps (Haub *et al.* 2002; Verreijen *et al.* 2019).

Pour certaines protéines végétales, des ajustements de doses sont nécessaires pour fournir suffisamment de leucine et d'autres AAI, notamment chez les personnes âgées ayant une résistance anabolique. Mais un apport plus important en protéines végétales dans un régime omnivore semble être une stratégie pour améliorer la MM et améliorer les performances physiques chez les personnes âgées. Mais la divergence de ces résultats souligne la nécessité de réaliser d'autres études afin d'élaborer des stratégies optimales pour prévenir la sarcopénie.

Alors que la recherche sur les protéines végétales comme le soja et le blé a reçu une plus grande attention, il existe un manque notable d'études portant sur d'autres sources de protéines végétales, notamment les oléagineux. Les rares études disponibles mettent en lumière des caractéristiques intéressantes des protéines oléagineuses sur le métabolisme

protéique musculaire. Par exemple, une étude portant sur la digestibilité des protéines de colza chez l'Homme a révélé une digestibilité relativement faible par rapport à d'autres protéines végétales, mais une valeur biologique postprandiale élevée de 83,8 %, comparable à celle des protéines de lait (Bos *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent que, malgré une digestibilité réduite, les protéines de colza sont bien assimilées par l'organisme, ce qui indique qu'elles pourraient potentiellement contribuer au maintien de la masse musculaire. Cette hypothèse est corroborée par une étude chez le rat, démontrant que la consommation d'un isolat de protéines de colza induit un FSR dans le muscle similaire à celui observé avec les protéines de lait (Boutry *et al.* 2011).

De plus, des études ont montré que la concentration postprandiale en leucine, essentiel pour la stimulation de la SPM, est comparable après la consommation d'isolat de protéines de soja ou de colza dans un repas complet chez l'Homme (Volk *et al.* 2020). Les protéines de colza présentent ainsi une efficacité similaire à celle des protéines de soja pour la stimulation de la SPM, et peuvent donc être considérées comme des protéines intermédiaires en termes de qualité (Bos *et al.* 2003). Cependant, une étude animale chez le porc a révélé que l'inclusion de 20% de tourteau de colza dans l'alimentation, en remplacement du tourteau de soja, favorise l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse, tout en réduisant ceux liés à la SPM (Skugor *et al.* 2019). Ces modifications dans le muscle squelettique sont probablement dues à une teneur accrue en fibres et à la présence de composés phytochimiques bioactifs, tels que les glucosinolates, dans le tourteau, ce qui pourrait nuire à l'efficacité de la digestion des protéines et à l'absorption des AA. On peut toutefois supposer que ces effets négatifs seraient atténués avec un isolat de colza, dans lequel les niveaux de fibres et de glucosinolates sont réduits.

Enfin, une autre étude a mis en évidence les effets positifs d'un régime à base de graines de lin extrudées sur la qualité du muscle *longissimus dorsi* chez les agneaux, avec une augmentation de la teneur en protéines et une diminution des lipides dans le muscle, par rapport à un régime classique à base de tourteau de soja (Atti *et al.* 2013). Ces résultats suggèrent que les graines de lin pourraient potentiellement améliorer la qualité musculaire, mais des études supplémentaires sur des populations humaines sont nécessaires pour confirmer ces effets.

Ainsi, les protéines oléagineuses montrent un potentiel prometteur pour soutenir la SPM, mais les données actuelles sont insuffisantes pour formuler des recommandations précises, notamment chez les personnes âgées.

3.4. Apport en leucine

La leucine est responsable des effets anaboliques de l'alimentation en stimulant la SPM par activation de la voie de mTOR dans les cellules musculaires (Smith *et al.* 1998). De ce fait, l'enrichissement en leucine a été évaluée pour améliorer la capacité anabolique chez les personnes âgées. Une étude a montré que l'ingestion de 6,7g d'AAI dont 26% de leucine permettait de stimuler la SPM chez les personnes jeunes mais pas les personnes âgées. En revanche, l'ingestion de 6,7g d'AAI dont 41% de leucine a permis d'augmenter la SPM chez les sujets âgés (Katsanos *et al.* 2006). De plus, la consommation de 5g de leucine/repas en supplément de repas quotidiens améliore la SPM chez des personnes âgées, de façon aussi efficace si les apports protéiques quotidiens sont de 0,8 g/kg/j ou de 1,2 g/kg/j (Murphy *et al.* 2016). Ainsi, il semble que la teneur totale en leucine plutôt que la quantité totale de protéines puisse être un facteur déterminant dans la stimulation du SPM chez les personnes âgées. Pour créer une hyperleucinémie et stimuler la réponse anabolique avec la même amplitude que chez des individus jeunes, les personnes âgées devraient donc ingérer au moins 2,5g de leucine par repas (Katsanos *et al.* 2006 ; Wall *et al.* 2013 ; Murphy *et al.* 2016). Ainsi, un apport en AAI contenant 1,39g de leucine pris deux fois par jour pendant 12 semaines a entraîné une augmentation de 3,9% de la masse musculaire chez les femmes âgées (Dillon *et al.* 2009). De plus, une autre étude portant sur la supplémentation de l'alimentation avec des AAI contenant 3,95g de leucine pris en deux doses quotidiennes pendant 16 semaines n'a pas entraîné d'augmentation significative de la masse musculaire, mais a permis une amélioration de la force des membres inférieurs chez douze sujets âgés (Børsheim *et al.* 2008). Toutefois, toutes les sources de protéines ne sont pas équivalentes en termes de teneur en leucine. En général, les protéines d'origine végétale ont une teneur en leucine inférieure à celles d'origine animale, à l'exception notable du maïs (Tableau 5). Certaines plantes, comme les oléagineux, constituent une source relativement intéressante de leucine, à condition d'être consommées en plus grande quantité.

Ainsi, l'augmentation de la consommation de leucine permet de surmonter la résistance anabolique et de ce fait, d'améliorer la SPM *post*-prandiale et la MM chez les personnes âgées. Bien que les sources animales (comme la caséine et le lactosérum) soient souvent privilégiées en raison de leur teneur plus élevée en leucine, les sources végétales ne doivent pas être négligées (Tableau 5). Elles peuvent également fournir la quantité nécessaire de leucine, à condition d'être consommées en quantités suffisantes.

Tableau 5. Teneur en leucine dans plusieurs sources de protéines (Adapté de Arrutia *et al.* 2020 ; Day *et al.* 2022).

Sources	Protéines	Leucine (mg/g)
Animale	Lait de vache	99
	Caséine	102
	Lactosérum	121
	Bœuf	65
	Poulet	85
	Œuf entier	91
Céréale	Farine de blé	75
	Maïs	128
	Riz	88
Légumineuse	Concentrat de pois	76
	Fève	85
	Pois chiche	65
	Lentille	71
Oléagineux	Soja	90
	Tourteau de soja	78
	Concentrat de soja	76
	Isolat de soja	56
	Tourteau de colza	71
	Farine de colza	78
	Tourteau de tournesol	65
	Farine de tournesol	69
	Isolat de chanvre	65
	Tourteau de chanvre	69

4. Prévention par l'apport en AGPI

Les AGPI omega-3 sont des AG caractérisés par la présence de plusieurs doubles liaisons, dont la première se situe à trois carbones du groupe méthyle terminal. Parmi eux, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) sont les plus biologiquement actifs. Toutefois, la conversion de leur précurseur, l'acide alpha-linolénique (ALA), en EPA et DHA est limitée chez l'humain, atteignant seulement 1% pour le DHA et entre 8 et 12% pour l'EPA (Doussat *et al.* 2024). Ainsi, l'EPA et le DHA sont considérés comme essentiels, tandis que l'ALA, ne pouvant pas être synthétisé par l'organisme humain est considéré comme indispensable. Ces AGPI oméga 3 sont apportés par différents vecteurs alimentaires : l'huile

de colza, soja ou lin sont des sources d'ALA et les produits marins des sources de DHA et EPA (ANSES 2022). Chez les personnes âgées, ces AG ont montré un potentiel pour influencer positivement la synthèse musculaire, la masse musculaire, la force et les capacités fonctionnelles, ce qui les rend particulièrement intéressants pour lutter contre la sarcopénie liée au vieillissement.

L'inflammation chronique de bas grade est un facteur central dans l'accélération des processus cataboliques et la diminution de la réponse anabolique chez les personnes âgées. Les AGPI oméga-3, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires, peuvent jouer un rôle protecteur significatif contre cette perte musculaire. En effet, plusieurs études ont montré que la consommation régulière d'oméga-3 réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, la consommation d'AGPI oméga 3, quelle que soit leur source, a entraîné une réduction de l'inflammation de bas grade de manière proportionnelle à la durée de la consommation, en diminuant les concentrations plasmatiques d'IL-6 et de la protéine C-réactive chez les personnes âgées (Custodero *et al.* 2018). De plus, la supplémentation en huile de lin (14g d'ALA) a été associée à une diminution de la concentration d'IL-6 après 12 semaines chez les hommes âgés pratiquant un entraînement de résistance (Cornish et Chilibeck 2009). Cette diminution de l'inflammation permettrait de réduire l'activation des voies cataboliques, notamment l'autophagie, en inhibant le facteur de transcription NF- κ B, qui joue un rôle crucial dans la dégradation des protéines lors des états inflammatoires (Lee *et al.* 2020), et en réduisant l'expression du protéasome (Doussat *et al.* 2024).

Un autre mécanisme des AGPI oméga 3 est leur effet anabolique chez les personnes âgées, surtout pendant la période *post-prandiale* où la consommation de protéines peut être sous-optimale. En effet, une supplémentation à 1,86g d'EPA et 1,5g de DHA a entraîné une augmentation des taux de SPM en activant davantage la voie de signalisation Akt/mTOR en réponse aux AA et à l'insuline (Smith *et al.* 2011). Cependant, ces effets anaboliques ne se traduisent pas systématiquement par une augmentation de la masse musculaire (Cornish *et al.* 2022), sauf si les doses sont élevées à plus de 2g/jour (Huang *et al.* 2020). Par ailleurs, l'ALA semble avoir un effet limité sur la MM comme le montre l'absence d'association significative entre la consommation de 1,4g/jour d'ALA et la MM chez les femmes âgées (Isanejad *et al.* 2022).

L'un des aspects les plus prometteurs de la consommation d'AGPI oméga-3 chez les personnes âgées réside dans leurs effets potentiels sur la force musculaire et les capacités

fonctionnelles. Par exemple, la consommation de 1,4g/jour d'ALA a été associée à une amélioration de la force de préhension et de la fonction musculaire (vitesse de marche, capacité à s'accroupir) chez les femmes âgées (Isanejad *et al.* 2022). Une revue systématique et méta-analyse a confirmé que les AGPI oméga-3, y compris l'EPA, le DHA et l'ALA, peuvent améliorer la force et la fonctionnalité du bas du corps chez les personnes âgées (Cornish *et al.* 2022). Cependant, il a été observé que l'effet semble dépendre de la durée de la consommation : des études de 24 semaines ou plus ont montré des améliorations significatives de la vitesse de marche chez les sujets recevant des oméga-3, alors que des études de plus courte durée n'ont pas observé de différences significatives (Huang *et al.* 2020). C'est pourquoi, une supplémentation de 12 semaines en ALA (12g) (Cornish et Chilibeck 2009) ou en EPA et DHA (3g) (Cornish *et al.* 2018) associée à un exercice de résistance, n'a pas produit d'effets bénéfiques sur la force musculaire et les capacités fonctionnelles par rapport au placebo chez les hommes âgés.

Il est également intéressant de noter que les effets de la supplémentation en AGPI oméga-3 peuvent varier entre les sexes. Une étude a montré qu'une consommation totale d'environ 2,7 g/jour en oméga-3 était positivement associée à la force maximale chez les hommes âgés, mais pas chez les femmes âgées. Ces différences pourraient s'expliquer par des variations métaboliques entre les sexes, notamment une conversion plus efficace de l'ALA en EPA et DHA chez les femmes, ce qui pourrait influencer la disponibilité des oméga-3 pour la fonction musculaire (Rossato *et al.* 2020). Cependant, il semble que seuls les PL plasmatiques contenant de l'ALA soient associés à une moindre perte de la force d'extension du genou, soulignant l'importance spécifique de l'ALA dans la préservation de la force musculaire (Reinders *et al.* 2015).

Enfin, les AGPI oméga 3 sont également bénéfiques pour récupération musculaire. Par exemple, pendant une période d'immobilisation, une supplémentation de 5g/j en EPA et DHA a permis d'atténuer l'atrophie musculaire et de faciliter le retour du volume musculaire après 2 semaines de récupération (Mcglory *et al.* 2019). La diminution de l'inflammation grâce aux AGPI oméga 3 permettrait une guérison plus rapide des lésions musculaires (Jannas-Vela *et al.* 2023).

Ainsi, les AGPI oméga 3, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et anaboliques, présentent des effets prometteurs pour lutter contre la sarcopénie associée au vieillissement. Cependant, ces effets dépendent de plusieurs facteurs, notamment la dose, le type d'oméga-

3, la durée de la consommation (Huang *et al.* 2020), le sexe des individus (Rossato *et al.* 2020) et de la présence ou non d'inflammation de bas grade (Cornish *et al.* 2022). Compte tenu de ces résultats, l'ALA, disponible dans les oléagineux, pourrait offrir des avantages pour la force et les fonctions musculaires, contribuant ainsi à la prévention de la sarcopénie chez les personnes âgées. Cependant, bien que ces associations soient prometteuses, il est nécessaire de mener davantage de recherches, notamment sur d'autres sources végétales comme le colza, pour explorer pleinement les effets de l'ALA chez les personnes âgées.

L'intervention nutritionnelle représente donc un pilier essentiel dans la prévention et le traitement de la sarcopénie liée au vieillissement, en particulier par l'apport en protéines, en leucine et en AGPI oméga-3. Le rôle de l'ALA et son impact sur la masse et la fonction musculaire est prometteur, mais nécessitent des recherches supplémentaires, notamment sur leur efficacité à long terme chez les personnes âgées. Les oléagineux offrent un double intérêt en fournissant à la fois des protéines et des AGPI, tels que l'ALA. Cependant, les études sur leur efficacité dans la prévention de la sarcopénie sont encore limitées. Cela pose les bases pour les objectifs de cette thèse, qui visent à approfondir la compréhension des protéines d'oléagineux et de leur digestibilité, ainsi que leurs interactions avec les lipides dans des matrices alimentaires complexes, tout en explorant leur impact potentiel sur la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement.

Résumé du rôle des protéines et lipides dans la prévention de la sarcopénie

.....

Le tissu musculaire squelettique représente environ 40% de la masse corporelle et joue un rôle clé dans la locomotion, la force, la posture et l'équilibre métabolique. Il maintient un cycle dynamique de synthèse et de dégradation des protéines, équilibré par les périodes post-prandiale et post-absorptive. La SPM est stimulée après un repas par les AAI, en particulier la leucine, et dépend de la voie mTOR/AKT. La DPM, prédominant en période de jeûne, dépend des voies ubiquitine-protéasome et de l'autophagie et permet le renouvellement des protéines endommagées. Un déséquilibre prolongé dans ce cycle synthèse-dégradation, en faveur de la dégradation, est souvent observé chez les personnes âgées et peut conduire à une atrophie musculaire.

La sarcopénie qui se définit par une perte progressive de la masse et de la force musculaire, se divise en trois stades : probable, confirmée et sévère. Elle touche entre 5 et 50% des personnes âgées de plus de 60 ans, augmentant le risque de chutes, de complications post-opératoires et de mortalité. Avec le vieillissement, la qualité et la quantité des fibres musculaires se détériorent par une perte d'hormones anabolisantes, une résistance anabolique aux stimuli, un dysfonctionnement mitochondrial, un niveau d'inflammation basal élevé, ainsi qu'une réduction de cellules satellites réduisant la capacité de régénération et la compensation des pertes de fibres musculaires.

Pour prévenir la sarcopénie, une nutrition adéquate riche en protéines (1g de protéines/kg/jour pour les personnes âgées) et en AGPI oméga-3 est essentielle. Les protéines animales sont généralement mieux digérées, ont une meilleure teneur en leucine et entraîne une plus forte stimulation de la SPM que les protéines végétales. Les protéines végétales, lorsqu'elles sont bien ajustées et consommées en plus grande quantité, peuvent aussi offrir des bénéfices pour la masse musculaire et la performance physique. De plus, les AGPI oméga-3, dont l'ALA, EPA et DHA, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et anaboliques, jouent un rôle prometteur dans le maintien de la masse et de la fonction musculaire.

OBJECTIFS ET STRATEGIES EXPERIMENTALES



OBJECTIFS ET STRATEGIES EXPERIMENTALES

Objectifs

Dans un contexte de transition vers une alimentation plus durable, il devient essentiel d'identifier de nouvelles sources végétales comme alternatives aux protéines animales. Parmi les options prometteuses, les oléagineux présentent de nombreux avantages, avec leurs teneurs élevées en protéines et en lipides riches en AGPI. Les tourteaux d'oléagineux, sous-produits de l'industrie de l'huile, représentent une matrice alimentaire intéressante pour l'alimentation humaine, mais leur utilisation reste encore sous-exploitée. Pour valider leur utilisation, il est essentiel d'évaluer leur qualité nutritionnelle et plus particulièrement, leur digestibilité, en comparaison avec des ingrédients connus pour leur bonne digestibilité. Cependant, ces ingrédients se caractérisent par une matrice complexe, riche en composants non protéiques, où les interactions entre les protéines et les autres composants, comme les lipides, peuvent influencer la digestion. La littérature montre un intérêt croissant pour l'utilisation de systèmes de digestion *in vitro* afin d'évaluer la digestibilité des nutriments. Ces systèmes permettent notamment d'étudier l'effet d'un paramètre sur les cinétiques d'hydrolyse. Toutefois peu de recherches ont examiné les interactions complexes entre protéines et lipides au cours de la digestion, pourtant cruciales dans le cas des oléagineux. En outre, bien que les protéines végétales soient de plus en plus étudiées, la consommation de protéines de tournesol dans le cadre du vieillissement, et en particulier leur rôle potentiel dans la prévention de la sarcopénie, n'a pas encore été étudié.

Face à ces lacunes identifiées dans la littérature, cette thèse vise à répondre aux objectifs suivants :

1. Évaluer la digestibilité *in vitro* par le protocole INFOGEST des protéines d'oléagineux issus de plusieurs ingrédients protéique de tournesol et colza, en les comparant à celles d'une légumineuse de référence, le pois, reconnu pour sa bonne digestibilité dans les études sur les protéines végétales. Cette analyse permettra également de mieux comprendre l'influence de la matrice alimentaire sur la digestibilité des protéines issues des oléagineux.
2. Étudier les interactions entre les lipides et les protéines dans des matrices alimentaires plus ou moins complexe, en examinant comment la lipolyse et la présence de lipides

influencent la digestion des protéines, et réciproquement, comment les protéines influencent la digestion des lipides.

3. Explorer l'impact des protéines de tournesol sur la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement. Pour cela, leur qualité nutritionnelle sera comparée à celle d'autres sources protéiques, telles que la caséine et le pois, chez des rats âgés. L'effet d'un régime combinant protéines de tournesol et pois, ainsi que l'ajout d'AGPI oméga-3, sera également étudié. De plus, l'influence de ces différents régimes sur le métabolisme protéique musculaire sera analysée.

Etude de la digestibilité *in vitro*

La première étape de notre stratégie expérimentale consistait à définir la structure des aliments permettant d'analyser la relation entre les lipides et les protéines. Bien que cette relation ait été largement étudiée dans le cadre des émulsions, nous avons opté pour une approche simplifiée, en nous concentrant sur la digestibilité des protéines et des lipides dans une solution aqueuse.

La deuxième étape a consisté à adapter le protocole INFOGEST pour l'hydrolyse simultanée des protéines et des lipides. Cette méthode était initialement utilisée au laboratoire pour la lipolyse, il a donc été nécessaire de développer une méthodologie permettant d'évaluer la protéolyse ainsi que l'hydrolyse simultanée des protéines et des lipides, et de mesurer le DH.

Le modèle statique INFOGEST nécessite l'utilisation d'un pH-stat pour maintenir le pH du milieu réactionnel à une valeur précise à l'aide de solutions titrantes.

Hydrolyse des protéines : les AA possèdent une structure commune composée d'un groupe carboxyle acide et d'un groupe amine basique ce qui leur permet d'agir soit comme acides, soit comme bases, en libérant ou en acceptant des protons (H^+) en réponse aux variations de pH du milieu. Dans les protéines, les AA sont liés par des liaisons peptidiques entre le COOH d'un AA et le NH₂ d'un autre. Au cours de la protéolyse, l'hydrolyse de la liaison peptidique fait donc apparaître un groupement amine et carboxyle, qui titreront le milieu selon le pI des AA (moyenne $pI_{AA}=6$) et le pH environnemental (Damodaran 2007) (Figure 26).

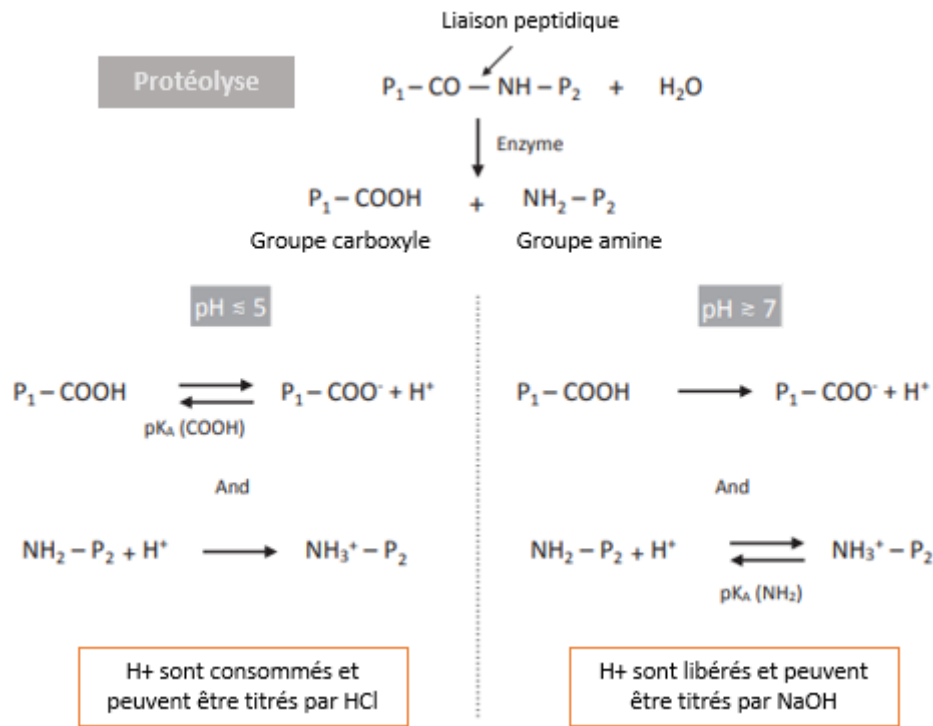


Figure 26. Représentation schématique de l'hydrolyse des protéines et de la titration au pH-stat à pH 5 et 7 (Traduit de Mat *et al.* 2018)

- En milieu acide (pH gastrique) : les groupes amines sont généralement protonés (NH₃⁺) conférant une charge globale positive aux AA. Pendant cette réaction, des protons (H⁺) sont consommés, et pour maintenir un pH de 3, une titration avec HCl 0,1N a été effectuée, conformément aux recommandations de Minekus *et al.* 2014.
- En milieu basique (pH intestinal) : les groupes carboxyles sont déprotonés (COO⁻), rendant les AA globalement négatifs. Lors de cette réaction, des H⁺ sont libérés et pour maintenir un pH de 7, une titration avec NaOH 0,1N a été réalisée (Minekus *et al.* 2014).

Pour les lipides seuls : lors de la lipolyse, les TAG libèrent des AG contenant des groupes carboxyles. Cependant, comme pour les protéines, la ionisation des AG libérés dépend du pH du milieu et du pKa des AG (Mat *et al.* 2016). Théoriquement :

- En milieu acide (pH gastrique) : les groupes carboxyles des AG sont majoritairement non ionisés, ce qui ne nécessitent pas de titrage pour maintenir un pH de 3.

- En milieu basique (pH intestinal) : les groupes carboxyles sont déprotonés (COO⁻), rendant les AG globalement négatives. Lors de cette phase, des H⁺ sont libérés, nécessitant un titrage avec NaOH 0,1N pour maintenir un pH de 7.

Pour les lipides et protéines simultanément : pendant la phase gastrique, les groupes carboxyles des AG libérés restent non ionisés, tandis que les groupes aminés des AA sont protonés. Cela entraîne une consommation de H⁺, nécessitant un titrage avec HCl 0,1N. Durant la phase intestinale, les deux macronutriments libèrent des groupes carboxyles déprotonés, libérant des H⁺. Le milieu est alors titré avec du NaOH 0,1N.

Une fois la digestion terminée, il est essentiel d'inactiver les enzymes pour éviter une hydrolyse prolongée. Après avoir testé deux méthodes (chauffage et précipitation à l'acide trichloroacétique (ATC)), nous avons retenu la dénaturation par chauffage à 100°C pendant 4 minutes, car le ATC entraînait une perte de protéines dans le culot, rendant les résultats incohérents. Pour la lipolyse, les lipides sont extraits juste après digestion avec du chloroforme et méthanol, ne nécessitant pas l'étape de chauffage.

Après l'hydrolyse, les digestats ont été analysés afin de quantifier le degré d'hydrolyse. Le DH des lipides a été mesuré en calculant la libération des AGL et des MAG à l'aide de CG après extraction et silylation des lipides. L'équation pour le DH des lipides est la suivante :

$$DH (\%) = \frac{[MAG]_{Tx} + [AGL]_{Tx} - ([MAG]_{T0} + [AGL]_{T0})}{[MAG]_{Tx} + [DAG]_{Tx} + [AGL]_{Tx} + [TAG]_{Tx}} \times 100$$

Avec [MAG], [DAG], [AGL], [TAG]_{Tx}, la concentration de chaque fraction protéique à un temps t au cours de la digestion, tandis que [MAG]_{T0} et [AGL]_{T0}, la concentration de MAG et AGL avant le début de la digestion.

Pour les protéines, la méthode Ortho-Phthalaldéhyde (OPA) a été choisie pour quantifier les AA libérés lors de la digestion, une méthode rapide et fiable, largement utilisée (Sousa *et al.* 2020). Cette méthode permet de mesurer la libération des AA via une réaction entre le réactif OPA et les groupes aminés, formant un complexe fluorescent mesurable (Mat *et al.* 2016). Les résultats sont calculés à partir d'une courbe standard de leucine. Une

hydrolyse totale des protéines a été réalisée avec HCl 6N pendant 24h à 110°C pour déterminer les AA totaux, mesurés également par OPA. De plus, étant donné que les enzymes sont elles-mêmes des protéines, il est crucial de définir un blanc approprié pour les exclure du calcul du DH des protéines. Le choix du blanc pour le calcul du DH reste débattu. Plusieurs approches proposées dans la littérature ont été envisagées :

- Réaliser une digestion en présence de toutes les enzymes mais sans substrat (sans ingestat). Le problème est que, sans substrat, les enzymes se dégradent entre elles, ce qui surestime les valeurs de NH₂ dans le blanc.
- Réaliser une cinétique avec des ingestats et des enzymes dénaturées par la chaleur. Toutefois, nos essais ont montré des variations importantes entre les DH obtenues lors de réplifications.
- Dans certains cas, un aliment complet sans protéines est proposé comme « blanc ». Cependant, dans notre cas, où nous mesurons la digestibilité des protéines d'un ingrédient protéique, il n'est pas possible de retirer les protéines.

Nous avons finalement choisi de mesurer les NH₂ dans les solutions enzymatiques elles-mêmes :

- Phase gastrique : Quantité de NH₂ dans la pepsine + enzyme gastrique de lapin, mesurée par OPA.
- Phase intestinale : Quantité de NH₂ dans la pepsine + enzyme gastrique de lapin + pancréatine, mesurée par OPA.

Ainsi, Le DH retenu pour nos essais expérimentaux se calcule selon la formule suivante :

$$DH (\%) = \frac{\frac{Ds Tx (mmol) - Ds T0 (mmol) - Blanc (mmol)}{Ingrédient protéique Ds (g)}}{\frac{Ptot (mmol)}{Ingrédient protéique Ptot (g)}} \times 100$$

Avec Ds Tx: quantité de NH₂ dans le surnageant du digestat à un temps X de la digestion; Ds T0: quantité de NH₂ dans le surnageant du digestat avant le début de la digestion; Ptot: quantité de NH₂ dans le surnageant provenant de l'hydrolyse totale de l'ingrédient protéique; Ingrédient protéique Ds (g): quantité d'ingrédient protéique ajouté pour la digestion; ingrédient protéique Ptot (g): quantité d'ingrédient protéique utilisé pour l'hydrolyse totale.

Etude de la digestibilité des protéines et de la synthèse protéique musculaire chez le rat

La figure 27 présente le travail réalisé lors de cette étude animale. Les protéines étudiées chez le rat âgé incluaient le concentré de protéines de pois, de tournesol, un mélange de ces deux concentrés, un mélange riche en ALA, ainsi que la caséine. L'évaluation de la digestibilité azotée fécale a été mesurée en rapportant les pertes fécales d'azote à la quantité d'azote ingérée. Pour cela, l'expérience réalisée chez le rat âgé consistait à placer les animaux dans des cages métaboliques sur une période de 4 jours, pour permettre une collecte des fèces, des urines et de la nourriture non consommée. La quantité exacte d'azote ingérée a été déterminée grâce à une pesée quotidienne des gamelles et des restes alimentaires. L'azote a ensuite été dosé dans les fèces et les urines des rats. De plus, pour estimer les pertes endogènes et évaluer les digestibilités vraies de l'azote, des valeurs issues d'une étude antérieure, réalisée sur des rats âgés nourris sans protéine pendant leur séjour en cages métaboliques, ont été utilisées.

De plus, dans cette étude *in vivo*, l'évolution de la composition corporelle des rats a été évaluée par echo-MRI. Cette mesure a été réalisée au début et à la fin de l'étude pour avoir l'évolution. Pour cela les rats devaient être à jeun.

Enfin, la synthèse protéique musculaire a été mesurée dans le muscle *plantaris* à l'aide d'un traceur isotopique L-[1-¹³C] valine. Après un jeûne nocturne, ce traceur a été administrée aux rats avant leur sacrifice par une injection intraveineuse. Les protéines totales ont ensuite été extraites à partir du muscle, hydrolysées et les AA dérivés ont été analysés pour mesurer l'enrichissement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les résultats sont exprimés en %/h, en utilisant une formule prenant en compte l'enrichissement dans la protéine et dans le pool précurseur, ainsi que le temps d'incorporation.

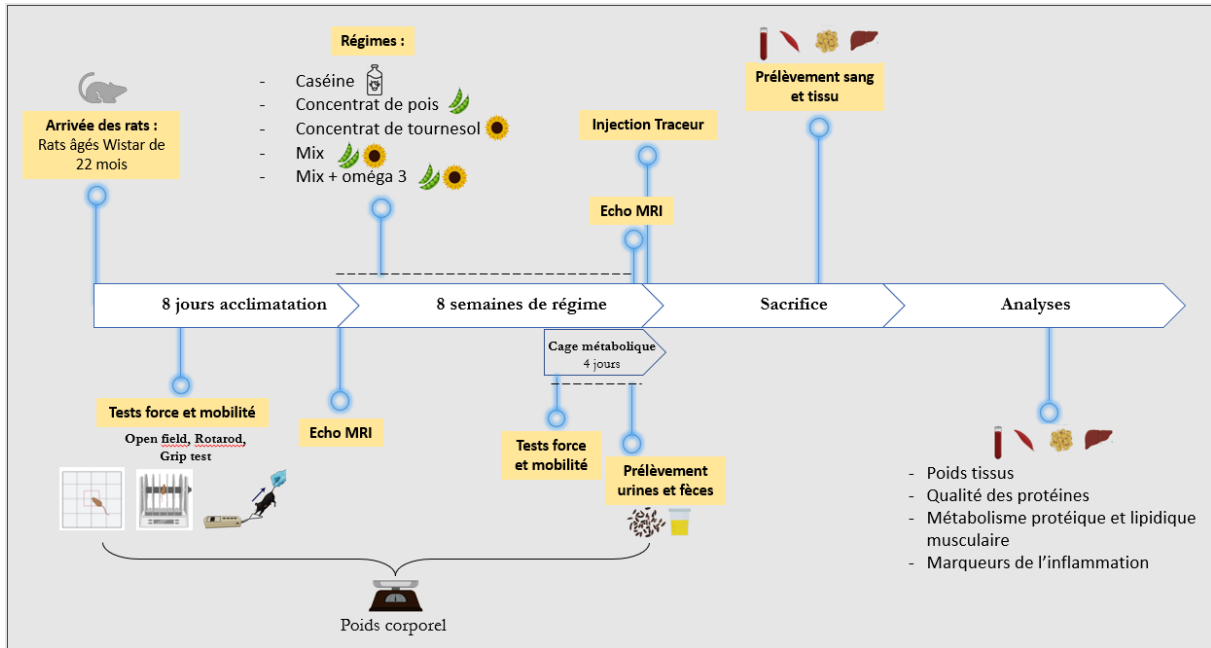


Figure 27. Schéma récapitulatif du travail expérimental chez le rat âgé.

ARTICLE N°1



ARTICLE 1

Digestibilité *in vitro* des ingrédients protéiques des graines oléagineuses et importance de la composition de la matrice.

La transition vers une alimentation plus durable nécessite de réduire la consommation de protéines animales et d'augmenter le recours aux protéines végétales. Les graines oléagineuses, bien que principalement exploitées pour leur teneur en lipides dans l'industrie de l'huile, contiennent également des quantités importantes de protéines qui pourraient être mieux valorisées pour la consommation humaine.

Les ingrédients oléagineux présentent une matrice complexe dans laquelle les interactions entre les protéines et les autres composants, comme les lipides et les fibres, peuvent influencer la digestion. Cette étude se concentre donc sur la caractérisation détaillée de la composition des matrices protéiques de ces ingrédients et leur influence sur la digestion *in vitro* de plusieurs protéines oléagineuses. De plus, bien que la digestibilité des protéines de tournesol et de colza ait déjà été examinée dans la littérature, elle n'a jamais été réalisée à l'aide du protocole *in vitro* standardisé INFOGEST. Cette étude vise donc à combler cette lacune en comparant la digestibilité de ces protéines oléagineuses à celle de la protéine de pois, une référence pour sa bonne digestibilité, déjà étudiée avec ce protocole (Jiménez-Munoz *et al.* 2023). Cette comparaison permet de situer la digestibilité des protéines de tournesol et de colza par rapport à une source végétale reconnue.

L'objectif principal de ce travail est donc d'évaluer la protéolyse d'ingrédients protéiques oléagineux tout en approfondissant la compréhension des relations entre la composition d'un ingrédient, la complexité de la matrice protéique et l'accessibilité des protéines, afin d'optimiser l'utilisation de ces ressources pour l'alimentation humaine.

Les résultats de ces expériences sont présentés sous la forme d'un article à soumettre au journal

Food & Fonction.

In vitro digestibility of oilseed protein ingredients and the importance of their matrix composition

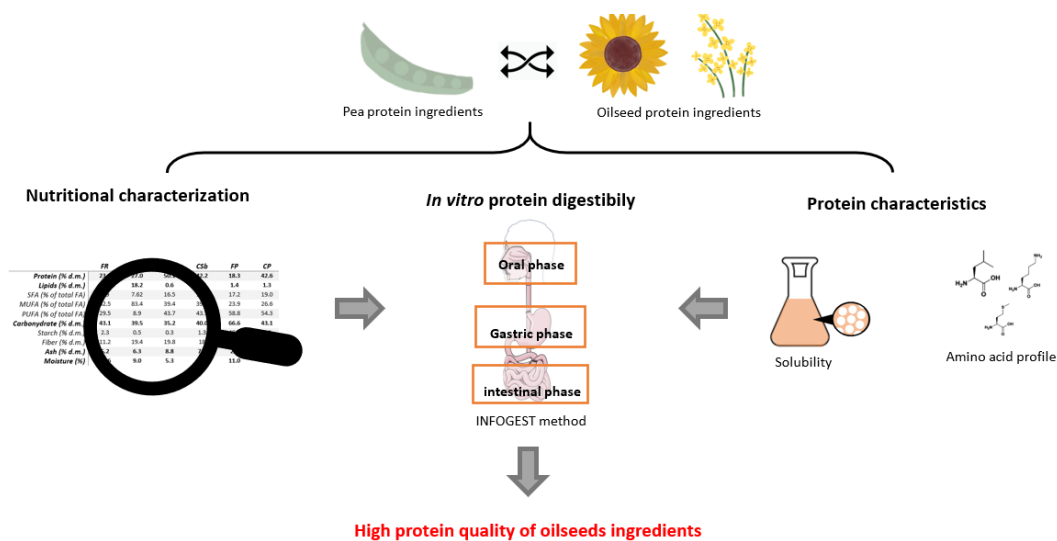
Lina Toutirais^{a*}, Stephane Walrand^{b,c}, Carole Vayssea

^aITERG Sciences, Department of Nutrition Sciences, 33610 Canéjan, France.

^bUniversité Clermont Auvergne, INRAE, Unité de Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France.

^cClinical Nutrition Department, CHU, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Abstract



The transition to a plant-based diet is becoming imperative. However, with a growing global population, it is essential to find new protein sources for human consumption. Protein ingredients derived from oilseed by-products could be promising sources. In this study, we characterized the proteins and matrix of protein ingredients from rapeseed and sunflower, and then evaluated their *in vitro* digestibility using the INFOGEST protocol. The digestibility results were analyzed and discussed in relation to the characterization of the ingredients, and compared to the digestibility of pea proteins, known for their good digestibility. Sunflower protein ingredients were found to be deficient in lysine, while rapeseed had a complete amino acid profile. Additionally, all the studied matrices contained a substantial amount of lipids,

with an interesting fatty acid profile, mainly composed of MUFAs and PUFAs, and a notable proportion of phospholipids in peas. Finally, rapeseed and sunflower ingredients showed *in vitro* digestibility ranging from 45% to 72%, depending on the source, processing method, and composition, but comparable to peas. These new insights into oilseed protein ingredients allow us to conclude that they represent promising high-quality protein sources, particularly rapeseed.

1. Introduction

Plants have long played an essential role in human nutrition and health by providing the nutrients and energy necessary to sustain life.¹ Nutritional patterns are currently moving towards more plant protein and away from animal protein, primarily due to rising concerns around health and climate change. The shift towards more sustainable diets requires a significant reduction in our reliance on animal proteins. This shift is prompting agri-food industries to explore new alternative sources of dietary proteins while engaging in new strategies to fully harness our natural resources.²

Soybean, wheat, and pea are the most common plant proteins available. However, other conventional, emerging, and innovative protein sources are also being explored and investigated, such as rice, corn, peanut, chickpea, lentil, and oilseed.³ Oilseed sources (rapeseed, sunflower, etc.), which are primarily used in the oil industry, not only have high lipid content but also contain a significant amount of protein, ranging from 15% to 45%.^{4,5} Consequently, coproducts from oilseed extraction processes, called meals or press cakes, are naturally rich in protein and also contain fibers, minerals, and residual lipids that are often rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs).⁵ However, these cakes are primarily used as animal feed or organic matter for soil composting, which clearly underutilizes their potential protein resources for human food.⁶ The growing global population is increasing demand for a more judicious exploitation of these byproducts. These cakes can be processed through various routes to be used for human consumption as bioactive compounds (antioxidants, biopeptides), as functional ingredients (surfactants, emulsifiers, foaming agents, stabilizers, etc.), and/or as processed protein ingredients (concentrate, isolate, or hydrolysate).⁷

The nutritional quality of plant proteins varies significantly depending on their digestibility, bioavailability, amino acid (AA) profile, processing route, and purity. It is therefore essential to conduct thorough research to characterize the extracted proteins, assess their nutritional

quality, and evaluate their potential as a viable and sustainable food source for human consumption.

Furthermore, it is widely recognized that the ingredient composition of the matrix and the structure of proteins either facilitate or hinder their digestibility.⁸ Understanding the relationship between the composition of the protein matrix, protein accessibility, and their digestibility is crucial. This entails considering various factors such as the ingredient source, and the conditions and methods of processing that affect the structure and quality of the final proteins. Such knowledge is essential for maximizing the utilization of food resources and contributing to the development of protein ingredients with optimal digestibility.

Studying digestibility through *in vivo* studies is made complicated by the fact that are expensive to set up and pose ethical and technical challenges. *In vitro* gastrointestinal digestion closely simulates the human digestive system, which makes it a good alternative to studies for studying and comparing the digestibility of proteins from various sources.⁹ The COST INFOGEST network has developed an *in vitro* protocol based on international consensus to standardize and harmonize the key digestion parameters and thereby enhance the reliability and comparability of results across different studies.¹⁰

The objective of this study was to use the INFOGEST protocol to assess the *in vitro* digestibility of proteins from four different oilseed protein ingredients, *i.e.* a rapeseed flour, a sunflower flour, and two sunflower concentrates obtained through different processing methods, and to compare the results against the *in vitro* protein digestibility of pea flour and concentrate, as pea known is known to have good digestibility. We went on to explore the relationship between protein characterization, composition of the protein matrix, and digestibility outcomes.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The protein matrices listed in Table 1, were provided in powder form by different suppliers. Porcine pepsin (P7012), porcine pancreatin (P7545; 8xUSP specifications activity), and bile extract (B8631) were obtained from Sigma-Aldrich, France. Rabbit gastric extract (RGE15) was purchased from Lipolytech, France. All other chemicals and reagents used were provided by Fisher, Belgium, except for heptane (Honeywell, France) sodium hydroxide

(Chemlab, Belgium) and 2',7'-dichlorofluorescein (Sigma Aldrich, USA). Water was Milli-Q water.

Table 1. Description of the protein ingredients

Source	Fractionation process	Abbreviation	Transformation Processes
Pea	Flour	FP	Cleaned, peeled and milling
Pea	Concentrate	CP	Milling and air classification
Rapeseed	Flour	FR	Cold pressing at 70°C and milling
Sunflower	Flour	FS	Cold pressing at 70°C and milling
Sunflower	Concentrate	CSa	Peeling, cold pressing at 75°C, ethanol extraction, drying, milling
Sunflower	Concentrate	CSb	Milling and sieving

2.2. Characterization of protein matrices

2.2.1. Composition of protein ingredients and AAs profile

According to standardized methods, the nutrient concentration was determined in each protein ingredient: the crude protein was analyzed by the Kjeldahl method according to regulation 152/2009 and calculated using nitrogen conversion factors specific to the plant sources: 5.36 for peas, 5.35 for rapeseed, and 5.29 for sunflower; the crude fat by the gravimetric method according to regulation 152/2009 Annex III; the starch by an enzymatic and spectrophotometry method; the fiber by the gravimetric method according to AOAC 985.29; and the ash by the gravimetric method according to the decree of 08/09/1997. The samples' total carbohydrate content was estimated by difference. The AA profile was determined according to the standard ISO 13903:2005 method. The samples were hydrolyzed with 6M HCl, then analyzed by high-performance liquid chromatography.

The amino acid score (AAS) was determined by following the essential amino acids (EAAs) requirement for older child, adolescent, adult group (FAO 2013)¹¹ and calculated by:

$$(1) \text{ AAS (\%)} = \frac{\text{milligram of limiting amino acid in 1 gram of test proteint}}{\text{milligram of the same amino acid of reference protein}} * 100$$

The AAS was not truncated at 100% to account for the potential of high-quality proteins to complement those lacking IAA in mixed diets.¹²

2.2.2. Extraction and identification of lipid fraction and FA profile

Lipids were extracted from protein ingredients by the Folch method with a chloroform/methanol/ mixture (2/1, v/v).¹³ Their fatty acid (FA) profile was determined after FA derivatization into FA methyl esters (FAME) by transmethylation method.¹⁴ The resulting FAME were analyzed by gas chromatography (GC, TRACE GC, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), equipped with a flame ionization detector (FID) and a split injector. A fused-silica capillary column (BPX 70, 60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film; SGE, France) was used with hydrogen as a carrier gas (inlet pressure: 120 kPa). GC peaks were integrated using Chromquest software (Thermofinnigan, Courtaboeuf, France).

Lipid fractions (monoglycerides (MAG), diglycerides (DAG), free fatty acids (FFA), triglycerides (TAG) and phospholipids (PL)) were separated by thin layer chromatography (glass plates 20 × 20 cm pre-coated with silica gel 60H) using a solvent mixture composed of heptane/ether/formic acid (55/45/1, v/v/v). After vaporization of 2,7-dichlorofluorescein and visualization under UV-light, spots corresponding of MAG, DAG, FFA, TAG and PL were scraped-off to be derived into FAME by transmethylation method.¹⁴ The resulting FAME were analyzed by GC-FID as above-described.

2.2.3. Quantification of phytic acid

The quantification of phytic acid relies on its extraction using an acidic solution. Purification of the extract on an ion exchange resin was performed. Subsequently, quantification was carried out via spectrophotometry (Perkin Elmer – Lambda 365) after complexation of phytic acid with iron present in the WADE reagent (blend of FeCl₃ and sulphosalicylic acid). The iron in the WADE reagent forms a purple-colored complex; however, upon preferential binding to phytic acid, it forms a colorless molecule. Therefore, the amount of phytic acid present in the sample being measured is determined by the degree of decolorization of the WADE reagent, which is measured at 500 nm. The quantification of phytic acid on each ingredient were performed two times (n=2).

2.2.4. Solubility

The solubility is considered as the quantity of proteins that do not sediment during centrifugation. Here, the protein solubility was tested on protein suspensions at 2% protein content on at pH 7. After solubilization of the protein in deionized water during 1h, solution was centrifuged (15000 g, 10 min). The supernatant was weighted and its protein content was measured by Kjeldahl method. The protein solubility was calculated as follows (equation2)¹⁵:

$$(2) \text{ Solubility (\%)} = \frac{\text{Nitrogen content on supernatant}}{\text{Nitrogen content total}} * 100$$

2.3. Protein digestibility

2.3.1 Digestion protocol

The *in vitro* digestion experiments were conducted in a 50mL glass tube immersed in a water bath at 37°C. The agitation was performed using a magnetic stirrer. During the proteolysis in the gastric phase, protons were consumed, leading to an increase in pH. In the intestinal phase, proteolysis resulted in the release of protons, leading to a decrease in pH. To maintain pH at 3 for the gastric phase and 7 for the intestinal phase, an automatic titration by pH stat (Metrohm, France) was used with 0.1N NaOH and HCl solutions.

Electrolyte solutions mimicking oral, gastric, and intestinal fluids were prepared, and enzyme activities and bile salt concentrations in the bile extracts were measured according to the harmonized INFOGEST protocol.¹⁶

Protein sources (FP, CP, FR, FS, CSa, CSb) (table 1) were dispersed in water at 0.1g of protein per mL and mixed with salivary fluid (1:1, v:v), without salivary alpha-amylase and subjected to INFOGEST *in vitro* digestion. The oral phase was conducted to achieve appropriate electrolyte concentrations and matrix dilution. The oral bolus was mixed with gastric fluid pepsin and RGE to achieve a pepsin concentration of 2000U/mL and a gastric lipase concentration of 60U/mL, and incubated at pH 3 for 2 hours at 37°C. The resulting gastric chyme was then mixed with the intestinal fluid containing bile (10mmol/L) and pancreatin (100U/mL trypsin activity), incubated at pH 7 for another 2 hours. Aliquots were taken for protein analysis at specified intervals, and proteolytic enzymes were inactivated by heating. Each protein digestion was repeated four times for independent analysis (n=4).

2.3.2 Degree of proteolysis and IV-PDCAAS calculation

The heated aliquots of digesta were directly centrifuged at 12000 x g for 5 minutes and then analyzed. The supernatants, representing the digestible protein fractions, were analyzed for small peptides and free AAs using the ortho-phthaldehyde (OPA) test.¹⁷ This method detects complexes formed between the α -amino groups of peptides and OPA at 340nm. In brief, the samples of supernatant were diluted with perchloric acid (0.5 mol/L) to precipitate proteins and longer peptides. After derivatization with OPA and in the presence of 2-mercaptoethansulfonic acid, the resultant 1-alkylthio-2-acylisonindol compounds were measured by UV/VIS photometry at 340 nm using a BIOTEK synergy HTX multimode reader. The results were calculated based on a L-leucine standard curve. Digestibility was determined relative to the total protein digestion using the following equation:

$$(3) \text{ IVPD (\%)} = \frac{\frac{\text{Ds Tx (mmol)} - \text{Ds T0 (mmol)} - \text{Blank (mmol)}}{\text{Protein ingredient Ds (g)}}}{\frac{\text{Ptot (mmol)}}{\text{Protein ingredient Ptot (g)}}} * 100$$

Where Ds Tx: NH_2 amount in the supernatant of the digestate; Ds T0: NH_2 amount in the supernatant at time zero; Blank: NH_2 amount in the supernatant of the enzyme solution; Ptot: NH_2 amount in the supernatant from the total hydrolysis of the protein ingredient; Protein ingredient Ds (g): Quantity of protein ingredient added for digestion; Protein ingredient Ptot (g): Quantity of protein ingredient used for total hydrolysis.

The blank was defined by measuring the amount of NH_2 in the enzymatic solutions. Previous experiments involving digestion without substrates or denatured enzymes, leading to overestimation of the blank. Therefore, the blank was measured by determining the NH_2 amount in pepsin, RGE, and pancreatin solutions diluted under the same conditions as during gastric and intestinal digestion, using the OPA method (as described for the digestates).

The total amount of NH_2 was determined by total hydrolysis with hydrochloric acid.¹⁸ For this, 0.05g of protein matrix was hydrolyzed in 6N HCL at 110°C for 24 hours. The pH of the hydrolyzed solution was adjusted to 7.0 and centrifuged. The NH_2 amount in the supernatant was measured using the OPA method (following the same protocol as for the digestates).

Then, the *in vitro* protein digestibility corrected amino acid score (IV-PDCAAS) was calculated (4):

$$(4) \text{ IV - PDCAAS (\%)} = \text{IVPD} * \text{AAS}$$

Where IVPD represents the *in vitro* protein digestibility and AAS represents the amino acid score, calculated based on the reference protein for children aged 6 months to 3 years, as recommended by the FAO.¹¹

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed using XLSTAT (version 2023). Normality and homogeneity of variance were assessed. All data showed homogeneity and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey-Kramer post-hoc tests to evaluate differences between groups. Pearson's correlation test was also performed. Statistical significance was determined at $p < 0.05$, and significantly different groups were indicated by different lowercase letters in tables and figures. Data are presented as mean \pm standard.

3. Results & discussion

3.1. Composition and characterization of oilseed protein ingredients

All the protein matrices were analyzed for lipid, protein, starch, fiber, ash, moisture and antinutritional factor contents. Table 2 reports the compositions of all these variants. Table 3 reports the EAA profile, AAS and limiting EAA of each protein product. Figures 1 and 2 show the composition of FA and lipid fractions, respectively, per 100 mg of lipid extract from each protein matrix. Table 4 reports the phytic acid contents.

Table 2. Composition of flours and concentrates of rapeseed, sunflower and pea.

	FP	CP	FR	FS	CSa	CSb
Proteins (% d.m.)	18.3	42.6	23.1	27.0	50.1	42.2
Lipids (% d.m.)	1.4	1.3	18.0	18.2	0.6	2.9
SFA (% of total FA)	17.2	19.0	7.9	7.62	16.5	12.0
MUFA (% of total FA)	23.9	26.6	62.5	83.4	39.4	45.7
PUFA (% of total FA)	58.8	54.3	29.5	8.9	43.7	42.4
Carbohydrates (% d.m.)	66.6	43.1	43.1	39.5	35.2	40.0
Starch (% d.m.)	48.0	6.0	2.3	0.5	0.3	1.3
Fiber (% d.m.)	7.6	15.1	11.2	19.4	19.8	18
Ash (% d.m.)	2.7	5.4	5.2	6.3	8.8	7.2
Moisture (%)	11.0	7.6	10.6	9.0	5.3	7.1

FR: Flour rapeseed; FS: Flour sunflower; CSa: Concentrate sunflower A; CSb: Concentrate sunflower B; FP: Flour Pea; CP: Concentrate Pea.

3.1.1 Protein

The protein content of the different protein ingredients is given in table 2. Differences were observed among the protein ingredients for most variants. The protein content of the flours ranges from 23.1% to 27% (d.m.), compared to 42.2% to 50.1% (d.m.) for the concentrates. These values were determined using nitrogen conversion factors specific to the plant sources: 5.36 for peas, 5.35 for rapeseed, and 5.29 for sunflower.¹⁹ The obtained protein content conforms to their classification: flours containing less than 35% protein and concentrates containing between 35% and 80% protein.²⁰ The results of flour are consistent with those of Barta et al.,²¹ who reported an average crude protein content of 30% for rapeseed flour and 34% for sunflower flour (d.m., Nx6.25), which equates to 26% and 29% using the specific conversion factors. The protein contents in pea and sunflower concentrates also align with the literature.^{22,23} It can be observed that the protein content in flours varies depending on the plant source, with oilseeds having as much or slightly more protein content than peas. Additionally, the protein content of different concentrates from the same source can vary, as seen in our two sunflower concentrates, which show a 10% difference. This can be explained by differences in variety, cultivation conditions, and processes. A higher protein content in an ingredient can lead to improved protein digestibility by limiting interactions with non-protein compounds and reducing interference with enzymatic activities. Consequently, concentrates have generally better digestibility than flours.²⁴

After ingestion, proteins undergo hydrolysis by proteolytic enzymes and thus break down into AAs and small peptides, which are then absorbed by the body. The EAAs, *i.e.* threonine, lysine, phenylalanine, isoleucine, leucine, histidine, methionine, valine, and tryptophan, cannot be produced by the human body and must therefore be obtained through diet. It is essential to know the AA profile and the presence of any limiting AA in oilseed proteins to characterize their nutritional value. Table 3 below reports the EAA profile for all protein ingredients together with the AAS and limiting AA of the oilseed proteins and pea protein tested here.

Table 3. Indispensable amino acid profile and score of pea, sunflower and rapeseed products.

AA	Pattern	FP		CP		FR		FS		CSa		CSb	
		AA ^a	Score ^b	AA ^a	Score ^b	AA ^a	Score ^b	AA ^a	Score ^b	AA ^a	Score ^b	AA ^a	Score ^b
Thr	25	46	184	43	173	55	218	46	185	45	179	42	168
Lys	48	95	198	94	195	74	153	47	<u>97</u>	46	<u>95</u>	45	<u>93</u>
AAA	41	102	249	104	254	87	211	82	200	88	215	76	184
Ile	30	50	167	50	167	48	162	46	152	49	163	45	151
Leu	61	87	143	89	146	86	<u>141</u>	74	121	77	126	71	117
His	16	31	192	30	185	32	203	30	186	31	192	28	176
SAA	23	29	<u>125</u>	26	<u>113</u>	55	239	49	214	48	208	44	190
Val	40	57	143	57	143	64	160	58	144	60	149	53	133
Trp	6.6	11	166	11	161	17	255	18	277	17	251	16	244

^aAA = Amino acid composition (mg/g of protein).

^bAmino acid score = amino acid content in test protein/amino acid content of reference pattern for Older child, adolescent, adult group according to 2013 WHO/FAO/ONU report.

Values underlined represent the first limiting amino acid of the sample.

FP, flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; CSa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B; Thr, Threonine; Lys, Lysine; AAA, aromatic amino acid (phenylalanine + tyrosine); SAA, Sulfur amino acid (methionine + cysteine); Ile, Isoleucine; Leu, Leucine; His, Histidine; Val, Valine; Trp, Tryptophane.

Amino Acid Score was calculated for all protein sources, according to the FAO expert consultation system (2013), and ranged from 78 for CSb to 129 for FR. The score ranking identified rapeseed protein as having the best AA profile, meeting all the body's EAAs needs, followed by pea and sunflower. Moreover, all the sunflower protein sources were lysine-deficient according to the FAO system. San Juan & Villamide (2001) examined the nutritional value of sunflower byproducts and noted that lysine was the AA most significantly impacted by the extraction of sunflower oil.²⁵ FR had no limiting AA and had an AAS of over 100 for all AAs. All the oilseed ingredients tested showed high levels of the sulfur-containing EAA, i.e. methionine and cysteine, reaching up to 55 mg/g in FR compared to 27 mg/g in the FAO reference protein. These findings are consistent with the literature, which has extensively documented that oilseed proteins, especially sunflower, are generally deficient in lysine but rich in sulfur AAs.^{26–28} In contrast, the pea protein sources tested showed high levels of lysine and the aromatic AAs, i.e. phenylalanine and tyrosine, but were generally deficient in sulfur AAs, as was the case for CP. Sunflower ingredients and pea concentrate thus had complementary AA profiles and could potentially be consumed together to ensure adequate AA intake.

Note that the highest AAS values are mainly observed in flour. The process used to obtain the concentrates therefore decreased the content of limiting AAs, *i.e.* lysine and sulfur AAs. A review examined the effects of different soy processing methods on protein quality and found processing and post-processing conditions such as autoclaving, dry heating, and alkaline treatment modified the AA profile of the soy proteins produced.²⁹

3.1.2 Lipids

Table 2 reports lipid content data for all the protein ingredients tested. Figures 1 and 2 report the composition of FAs and lipid fractions, respectively, per 100 mg of lipid extract for each protein matrix. Lipid contents ranged from 0.6% to 18.2% in the different protein matrices, with the highest values observed in oilseed flours (FR and FS). The pea protein matrices showed equivalent lipid contents between the concentrate and the flour (1.6% and 1.3%, respectively). For sunflower protein ingredients, CSa had near-negligible lipid content (0.6%) compared to the flour (18.2%). Note too that the two oilseed flours FR and FS, obtained by the same production process, had the same lipid content. The lipid content in these protein ingredients depends on whether they underwent a de-oiling step before protein extraction.³⁰ Here, the oilseed flours and concentrates were de-oiled, as evidenced by their significantly lower lipid contents than the 40%-plus lipid content found in feedstock rapeseed and sunflower seed.³¹ In contrast, neither the FP nor the CP underwent a de-oiling process. Consequently, they exhibit a lipid content close to 2%, similar to that naturally present in peas.³² The challenge for industry is generally to provide matrices with as low oil content as possible to improve protein quality.³³ Indeed, it is crucial to consider the sensitivity of lipids to oxidation and possible lipid–protein interactions that would impact the technological processability and protein digestibility of oilseed-based products. Marambe *et al.* showed that flaxseed protein digestibility improved after de-oiling.³⁴

Beyond lipid content, the FA composition of lipids in protein ingredients is a quality factor that can influence protein digestibility. The FA composition of the residual lipids in the protein ingredients tested here (Table 2 and Figure 1) showed that they are rich in PUFAs (FP, CP, CSa, and CSb) or MUFAs (FR and FS) and low in saturated fatty acids (SFAs). Note that despite the low lipid levels in pea ingredients, they had the highest percentage of linoleic acid, reaching nearly 50% in FP and CP. FR and FS were predominantly composed of oleic acid (60% in FR and 83% in FS), and FR also had the best omega-3-to-omega-6 ratio, which is crucial for

maintaining low inflammation and promoting cardiovascular health.³⁵ CSa and CSb shared the same FA profile. The differences in composition between FS and CSa/CSb stem from the sunflower variety tested: CSa and CSb are linoleic or conventional varieties, whereas FS is a high-oleic variety. The FA profile of these protein matrices align with the FA profile of their respective seeds, indicating that for this protein ingredient, processing the protein does not impact the FA profile of the residual lipids.^{31,36} PUFAs and MUFAs, mainly linolenic and oleic acids, can have health benefits, such as reducing blood lipids and cholesterol.³⁶ This suggests that these proteins could potentially play a role in promoting cardiovascular and metabolic health. Note, however, that PUFAs may negatively affect protein digestibility due to their tendency to oxidize during processing.³⁸ This oxidation can form covalent bonds with proteins or oxidize AAs and therefore reduce their accessibility to proteolytic enzymes and thus their also reduce their digestibility. A previous study observed a decrease in the digestibility of extruded proteins containing FAs that correlated with the degree of FA unsaturation.³⁹

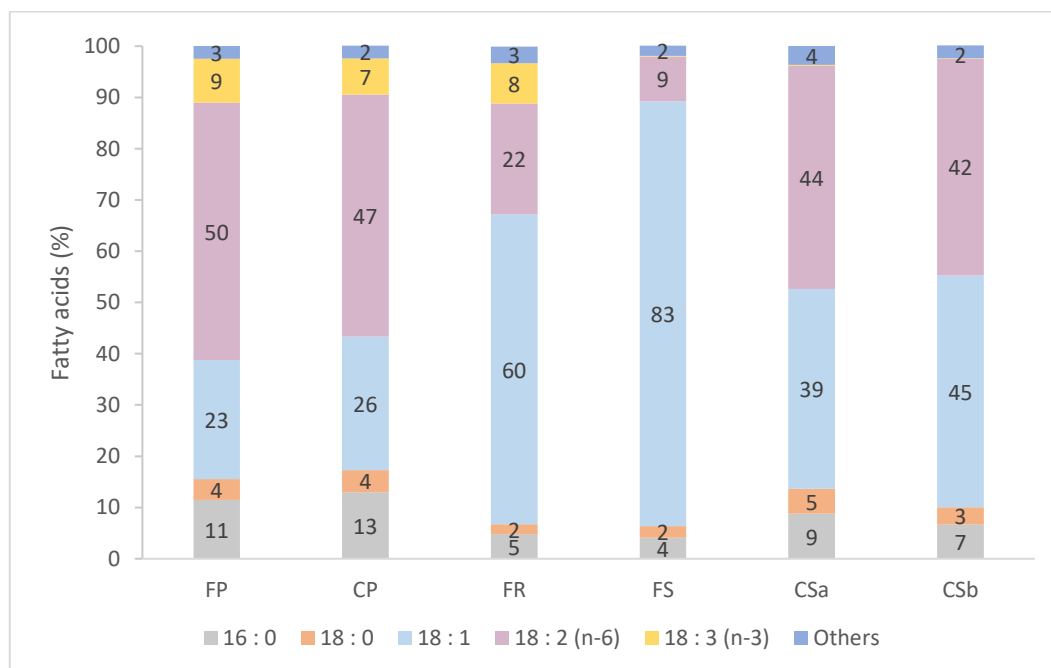


Figure 1: Fatty acid distribution per 100g of lipid extract from protein ingredients. FP, flour of pea; CP, concentrate of pea, FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; CSa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B.

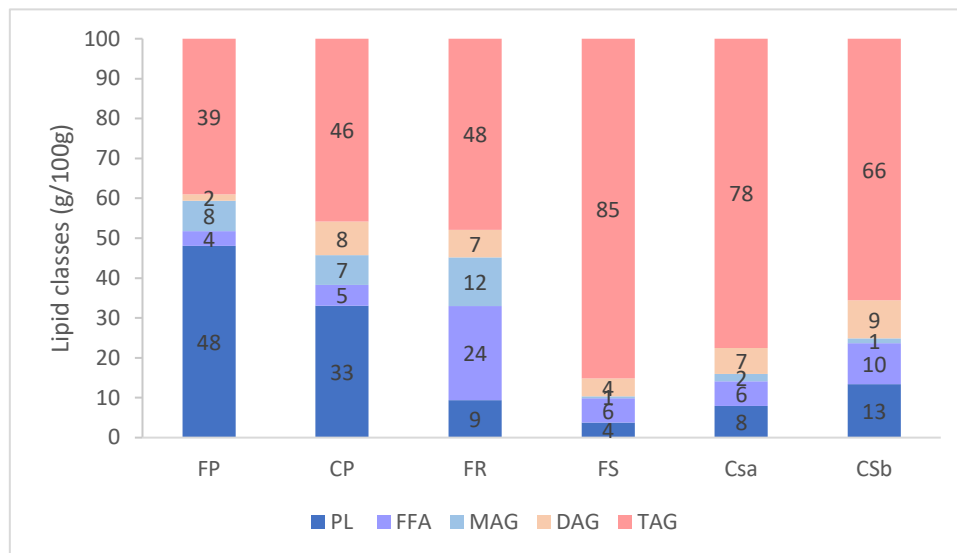


Figure 2. Lipid classes distribution per 100mg of lipid extract from protein ingredients. FP, flour of pea; CP, concentrate of pea, FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; Csa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B.

In addition to the FAs composition, the nature of residual lipids in plant protein matrices can also have an impact on the protein functionality and digestibility.⁴⁰ PL, in particular, due to their emulsifying properties, can positively affect protein digestion in the presence of lipids. For instance, lecithin, a type of PL found in oilseeds, has been shown to stabilize emulsions and prevent flocculation, which would otherwise reduce the specific surface area of proteins available for interaction with digestive enzymes.⁴⁰ In the presence of lipids, the exposure of hydrophobic groups on proteins and their interactions with lipids increase, promoting protein unfolding at the surface of lipid droplets.^{41,42} However, if lipid flocculation occurs within the digestive system, lipids may obstruct protein cleavage sites, hindering digestion.⁴⁰ Additionally, in solution, phosphatidylcholines (PCs) have been demonstrated to bind to proteins, which can further modulate their digestion.⁴³ To better understand the potential impact of these lipid fraction on protein digestion, we evaluated the lipid profiles of six protein ingredients (Figure 2). The primary lipid components in peas were PL (33-48%) and TAG (39-46%), while sunflower protein ingredients were predominantly composed of TAG (65-85%). Rapeseed proteins also contained mainly TAG (50%) but included significant amounts of FFA and MAG (23.7% and 12.1%, respectively).

3.1.3. Carbohydrate, ash and moisture

The carbohydrate, ash and moisture content of the different protein ingredients have been determined (Table 2).

The starch content varies between pea flour (48%) and oilseed ingredients (0.5-2.5%). Oilseed sources are known to have a very low starch content, unlike legumes and cereals. The protein concentration process in peas helps reduce starch content, as seen in CP (6%) versus FP (48%). This reduction could potentially enhance protein digestibility, by increasing protein availability for enzymatic action, as starch can bind to proteins during digestion.⁴⁴⁻⁴⁶

Regarding fiber content, which consists of non-digestible carbohydrates for human digestive enzymes, values range from 7.6% for FP to 19.8% for CSa, with higher content observed in sunflower-based ingredients. Furthermore, during the pea protein concentration process, a significant portion of starch is extracted, while fibers are concentrated along with the proteins. Dietary fibers play an important role in normalizing bowel function and promoting gastrointestinal health. However, in the context of protein digestibility, fibers are considered antinutritional compounds as they bind to proteins and proteolytic enzymes, preventing enzyme access to proteins and decreasing hydrolysis efficiency.⁴⁷

The ash composition differs within these matrices, ranging from 2.7% to 8.8%, with a higher percentage in oilseed matrices (5.2 to 8.8%) than in peas (2.7% to 5.4%). Furthermore, it can be observed that the ash concentration is higher in concentrates compared to flours, suggesting that the protein concentration process concentrates the ash. Minerals and metal ions such as iron (III) can affect the accessibility of the proteins to enzymes, inhibiting proteolysis by forming complexes with proteins or enzymes.^{48,49}

The moisture level of the plant ingredients is an important parameter for product stability, as low moisture inactivates enzymatic activity and microbial growth (fungal and bacterial). To prevent mold growth, the moisture content of oilseeds and their meals must be lower than 14.5%.⁵⁰ In our study, the oilseed sources meet this requirement, with rapeseed flour at a maximum of 10.6% and sunflower flour at 9.6%.⁵¹

3.1.4. Antinutritional factors

ANFs are compounds found in plants that can hinder the digestibility of nutrients. The use of oilseed proteins in food, is notably restricted by the presence of toxic ANFs, such as

protease inhibitors, phenolic compounds and phytic acids.⁵² Table 4 displays the levels of phytic acid in the protein ingredients.

Phytic acid acts as a potent chelator due to its ionic properties, promoting complexes with minerals and proteins, thus reducing their solubility, digestibility, and bioavailability. The oilseed sources contain higher quantities of phytic acid than peas, with the highest levels found in sunflower ingredients. Only rapeseed meal has a phytic acid content comparable to that of pea concentrate. Similar levels in sunflower and rapeseed meals have been observed in the literature.^{53,54} Additionally, it is noteworthy that phytic acid levels increased during protein concentration processes, as phytic acid content is higher in CP than in FP and in CS than in FS. Due to their chelating property, phytates bind to proteins, affecting efforts to eliminate them during the process. According to the literature, it may be possible to extract sunflower meal using water at pH 4.6 to reduce phytic acid without extracting proteins, although this wasn't the case for our ingredients. Furthermore, the phytic acid content might decrease in isolates obtained through protein extraction at a pH above 11.6, a value that induces phytic acid precipitation while preserving protein solubility.³³

Table 4. Phytic acid content on flours and concentrates of rapeseed, sunflower and pea.

	FP	CP	FR	FS	CSa	CSb
Phytic acid (g/100g)	0.63 ± 0.02 ^e	2.02 ± 0.12 ^d	2.27 ± 0.08 ^d	3.99 ± 0.05 ^c	6.30 ± 0.16 ^a	5.06 ± 0.06 ^b

Data are presented as mean ± standard. Different letters in the columns indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Tukey Test).

FP, flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; CSa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B.

3.1.5. Solubility

Understanding the solubility of a protein ingredient is important for industry professionals. It impacts both the functionality of protein ingredients in food formulation and their nutritional properties, particularly their digestibility. Solubility, calculated as the ratio of nitrogen content in the supernatant to the suspension of plant proteins at pH 7, provides insights into these aspects.

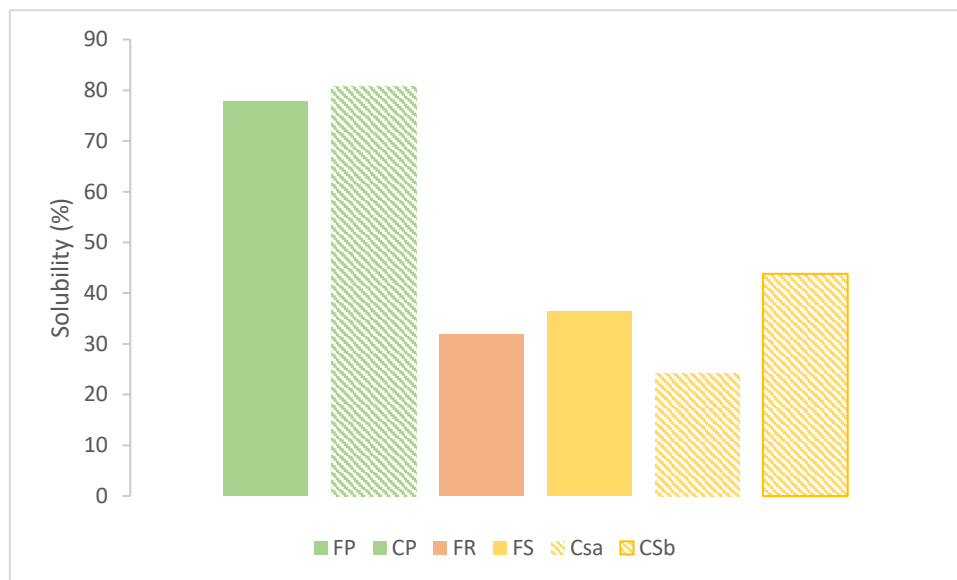


Figure 3. Solubility of the plant protein powder at pH 7.

FP, flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; CSa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B.

The solubility rates of oilseeds were relatively low, ranging from 24% for CSa to 44% for CSb. FS and FR showed solubility rates of 36% and 32%, respectively. In contrast, peas exhibited solubility values about twice as high as those of oilseeds, with solubility rates around 80%. These differences in solubility between plant families (legumes and oilseeds) can be attributed to different parameters such as the lipid content³³, the nature of proteins¹⁵, the production process^{55,56}. High lipid levels are known to reduce protein solubility because of interactions between lipids and proteins that can increase hydrophobic interactions, which leads to the formation of less soluble aggregates. Additionally, lipids promote protein oxidation, affecting both solubility and digestibility.^{57,58} Variations in solubility could also be linked to the different processing methods applied. Indeed, processes like ethanol extraction⁵⁵ and heat treatments can denature proteins and promote the aggregation of basic protein residues, thus reducing both solubility and digestibility.⁵⁶ For the oilseed flours (FR and FS), we hypothesize that their high lipid content could account for their low solubility. In contrast, the low solubility of sunflower concentrates may be due to their processing methods; the process applied to CSa appears to have had a greater impact than that applied to CSb. In contrast, pea proteins demonstrated higher solubility, which can be explained by their lower lipid content and the nature of their proteins, which differ from those found in oilseeds.¹⁵ Proteins from legumes, such as vicilin and legumin, have a lower isoelectric point, making them more soluble at neutral pH. This increased solubility in pea proteins may positively affect

their digestibility compared to oilseeds. Indeed, a positive relationship between protein solubility and digestibility has been observed.^{59,60} Soluble proteins are more accessible to digestive enzymes, whereas insoluble proteins, often present as aggregates, are less accessible to enzymatic action.⁵⁶

3.2. Digestibility of oilseed protein

After formation of the food bolus in the mouth, proteins pass into the stomach where the pH is 3 and where they meet gastric pepsin. They then move to the intestine where the pH is 7 and where they are exposed to a variety of enzymes, such as trypsin, chymotrypsin, and elastase, as well as various biosurfactants such as bile acids, phospholipids, and products of lipolysis. The INFOGEST protocol physiologically mimics human digestion, reproducing these stages of the digestive process. However, there is still little data describing the *in vitro* digestibility of oilseed protein ingredients. Here we compared the protein quality of various rapeseed and sunflower protein ingredients, along with pea protein, by examining their *in vitro* digestibility (Figure 4.A.) and *in vitro* PDCAAS (Table 5). To facilitate comparison of protein hydrolysis among the samples, protein content was normalized before *in vitro* digestion. Degree of proteolysis was determined at the end of the gastric and intestinal phases (Figure 4.B.). The *in vitro* PDCAAS of these protein ingredients was then compared to the *in vivo* protein digestibility of the same types of materials reported in the literature using the *in vivo* PDCAAS method (Table 5).

3.2.1. Gastric phase

Overall, our results show that the *in vitro* hydrolysis of pea and oilseed proteins at the end of the gastric phase ranges from 10.7% +/- 3.5 for FR to 16.0% +/- 3.8 for FS (Fig 6.A). These results are consistent with the values reported *in vivo*, indicating that the pepsin digestion process accounts for 10 to 20% of protein degradation.⁶¹ Moreover, it is interesting to note that during this phase, hydrolysis was statistically not different for all protein matrices ($p > 0.05$). Plant proteins are mostly resistant to pepsin action due to their structure β -sheet-rich structure and the abundance of components such as lipids, carbohydrates, and ANF present in the matrix. These elements reduce enzyme access to proteins and decrease the activity of proteolytic enzymes.^{52,62} Furthermore, because of the lower solubility of oilseed proteins, directly related to protein aggregation⁶³, the sites of action of proteases are differently localized, making them less accessible to enzymes, which reduces protein

digestibility⁶⁴ Each protein has its own solubility in water, which varies according to thermodynamic state of the environment (pH, temperature, pressure), isoelectric point, and ionic strength. When the pH is close to the protein's isoelectric point, its solubility decreases, and the neutral net charge at the surface promotes protein aggregation. According to the literature, in gastric conditions at pH 3, pea, sunflower, and rapeseed proteins all have low solubility, which could explain this low pepsinolysis.^{65–67}

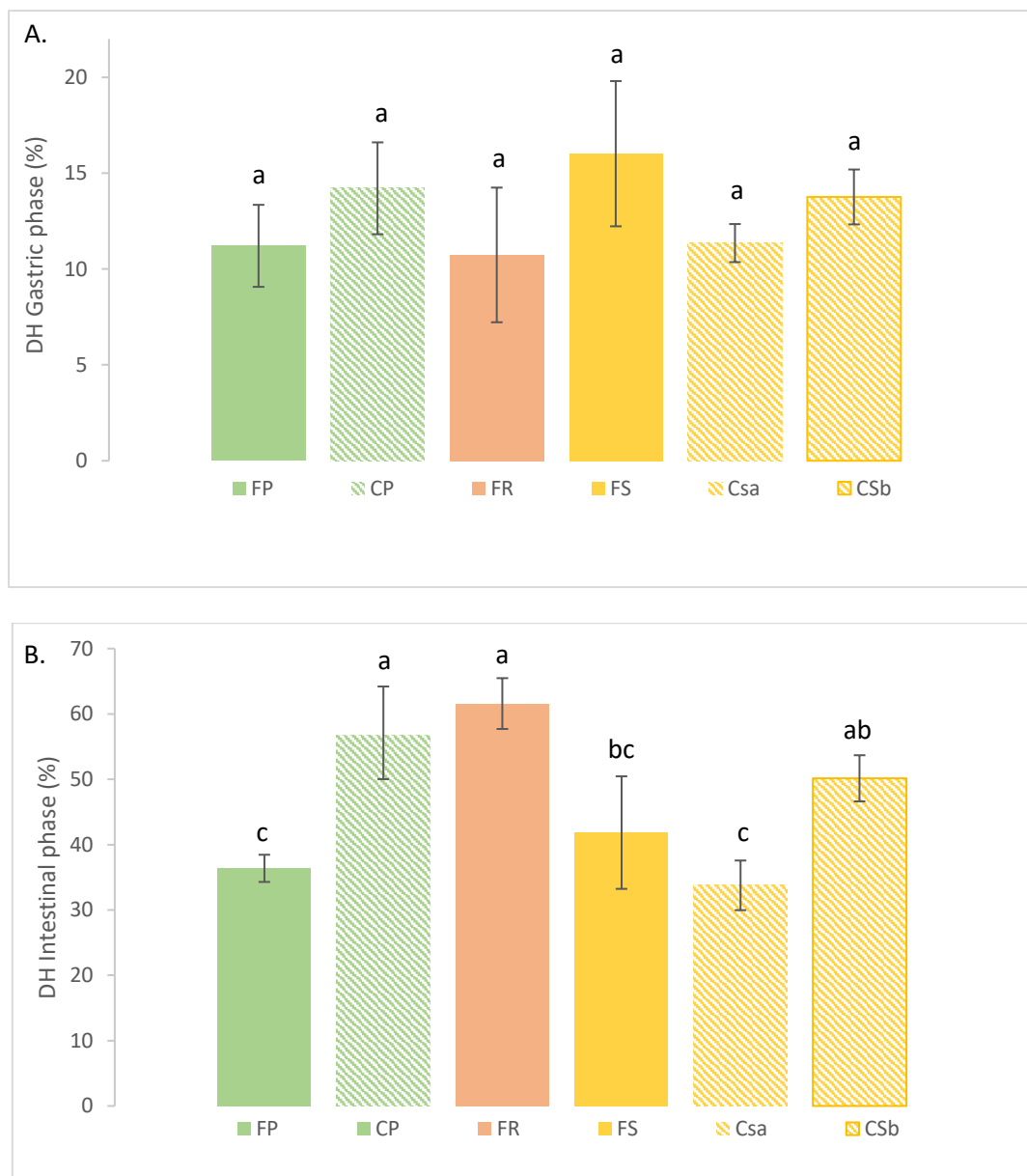


Figure 4. A. Degree of hydrolysis of oilseed and pea protein at the end of gastric phase. **B.** Degree of hydrolysis of oilseed and pea protein at the end of intestinal phase. FP, flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; Csa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B; DH, degree of hydrolysis. Different letters indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Tukey Test).

Table 5. *In vitro* protein digestibility (IVPD), *in vitro* protein digestibility corrected amino acid score (IV-PDCAAS) of oilseed and pea protein, and *in vivo* PDCAAS reported in previous studies^{12,78}.

	FP	CP	FR	FS	CSa	CSb
IVPD (%)	47.6 ± 3.1 ^{cd}	70.9 ± 7.5 ^a	72.3 ± 2.4 ^a	57.9 ± 6.0 ^{bc}	45.1 ± 3.5 ^d	64 ± 5.0 ^{ab}
IV-PDCAAS	50.4 ± 3.3 ^c	68.8 ± 7.3 ^b	93.3 ± 3.0 ^a	47.4 ± 5.0 ^c	36.1 ± 2.8 ^d	49.8 ± 3.7 ^c
<i>In vivo</i> PDCAAS	69 ⁷⁸	72 ⁷⁸	92 ¹²	54 ¹²	NA	NA

IV-PDCAAS was calculated using the recommended AAS pattern for older children, adolescents, and adults. FP, flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; CSa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B; NA, No Available. Different letters indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Tuckey Test).

3.2.2. Intestinal phase and IVPD

The results for at the end of the intestinal phase showed significantly higher levels of proteolysis compared to pepsinolysis, with variations ranging from 33.8 ± 3.8 for CSa to 61.6 ± 2.4 for FR (Fig 6.b). Furthermore, unlike in the gastric phase, there were significant differences ($p < 0.05$) in protein hydrolysis at the end of the intestinal phase, resulting in different IVPD values depending on protein source and type of ingredient (Table 5).

Comparison of the digestibility of the three flours showed that FR had the highest degree of hydrolysis during the intestinal digestion phase, as well as the highest IVPD value, while FS and FP exhibited comparable values. These differences can be partially explained by the composition of each protein matrix. For instance, compared to FR, FS contained higher levels of phytic acid (4.0% versus 2.3%) and fiber (19% versus 11%). Both these components are known to reduce protein digestibility. Fiber increases the viscosity of the digestive medium, limiting enzyme access to proteins,⁴⁴ while phytic acid acts as a potent chelator, forming insoluble complexes with proteins and minerals and inhibiting the activity of digestive enzymes like trypsin.⁶⁸ These interactions directly impact protein bioavailability, which could explain the lower digestibility of FS proteins compared to FR. However, we hypothesize that the better digestibility of rapeseed protein could also stem from lipid interactions during digestion. Although FR and FS have similar lipid percentages in their original composition, the isoproteic formulation of the ingestates led to a larger proportion of matrix in FR's ingestate due to its lower protein content. This means that FR's ingestate contains more lipids than FS's. This lipid concentration difference could play a crucial role in protein digestibility of FR, particularly due to the higher presence of PLs (1.62% dry matter), which have emulsifying

properties. Literature suggests that PLs reduce lipid droplet flocculation, thereby improving protease access to amphiphilic proteins adsorbed at the droplet surface.^{40,42} This interaction could potentially enhance protein hydrolysis, contributing to the higher digestibility of FR compared to FS. Additionally, in the presence of oleosins (stabilizing proteins surrounding TAG in seeds), which are present in rapeseed, PLs show increased emulsification efficiency and stability.⁶⁹ This combination could promote the formation of a stable structured interface throughout the digestive tract that could optimize rapeseed protein digestion.

When analyzing the solubility results at pH 7, we initially expected FP proteins to be more digestible than oilseed flours due to its higher solubility. However, it is important to note that these solubility analyses were conducted in water, not in the intestinal ionic environment, which could lead to differences in solubility and therefore digestibility. Additionally, we observed that FP contains a high starch content (48%). Starch has been shown to negatively correlate with protein digestibility by increasing viscosity, binding to proteins, and forming an amylose network that prevents proteolytic enzyme access.⁴⁴⁻⁴⁶ Thus, starch content appears to be a parameter that strongly influences protein digestibility, which could explain the difference in digestibility between FP and FR.

Another significant factor influencing protein digestibility, not measured in this study, is the proportion of albumins and globulins. Due to the presence of trypsin inhibitors in albumin fractions, native albumins are the most resistant to hydrolysis.⁴⁴ However, according to the literature, peas, sunflower, and rapeseed have relatively similar globulin and albumin contents. Pea proteins consist of 20% albumins and 50-60% globulins⁷⁰, while sunflower proteins contain 40-90% globulins and 10-35% albumins, and rapeseed proteins are composed of 20-40% albumins and 50% globulins.⁶⁸ Therefore, this factor does not appear to explain FR's better digestibility compared to the other flours.

In comparison with the literature, the IVPD results for FS and FP were lower than those previously reported (respectively, FS (83.1%)⁷¹ and FP (84%)⁷²) whereas for FR, our IVPD value was comparable (74.0% to 79.5%)^{73,74}. This disparity can be attributed to the differences in *in vitro* digestibility methods used, distinct from the INFOGEST protocol, as well as the production processes applied to obtain the flours (oil extraction with hexane, seed cooking, ...). According to another study, FR and FS showed lower IVPD values compared to other oilseed flours such as chia, sesame, flaxseed, pumpkin, and grape seed, ranging from 70 to

85%.⁷⁵ However, these evaluations were conducted using the pH drop method and not the INFOGEST protocol.

Moreover, we observed that for the same protein source, there were differences in digestibility depending on type of ingredient and the process applied. For instance, the two sunflower concentrates (CSa and CSb) showed significant differences, with more efficient hydrolysis for CSb than CSa. FS proteins were significantly better-hydrolyzed than CSa proteins but similarly hydrolyzed to CSb proteins. The differences between CSa, FS, and CSb could be explained by the higher solubility of CSb than CSa at pH 7. In fact, we observed a positive correlation between sunflower protein solubility at pH 7 and IVPD ($p=0.0001$; $r^2 = 1$) (data not shown). In addition, Table 4 shows that phytic acid content was highest in CSa, followed by CSb, and then FS. This is consistent with the literature, which reports that ANFs, including chlorogenic acid and phytic acid, are co-extracted into protein concentrates and can inhibit protease activity.⁷⁶ At a pH above the isoelectric point, the COOH group of proteins becomes electronegative and can bind cations like Ca^{2+} to form ternary complexes with phytic acid. At intestinal pH, this may induce the formation of protein-cation-phytate complexes and thus reduce protein digestibility.³³ Thus, the higher phytic acid content in CSa could also explain the digestibility differences during the intestinal phase. Finally, the differences between CSa, FS, and CSb may also be due to the thermal treatments applied to CSa during drying, which can affect the physicochemical state of the proteins. According to literature, these modifications could potentially lead to protein denaturation and modify the hydrophobicity of the exposed surface, thus promoting aggregation which reduces the sensitivity of proteins to digestive enzymes.⁷⁷

3.2.3. IV-PDCAAS

PDCAAS is a widely used method for evaluating the quality of a protein based on human AA requirements and its digestibility. However, while PDCAAS remains the most commonly used method, it has certain limitations, and the Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) is now recommended for more accurate *in vivo* evaluations of protein quality.¹¹ PDCAAS and DIAAS can also be measured *in vitro*⁷⁹. However, in this study, DIAAS was not calculated as the digestibility of proteins at the individual AA level was not measured.⁸⁰ According to the FAO Expert Working Group, a high-quality protein source will have a PDCAAS score from 90 to 100. In contrast, protein ingredients with a PDCAAS score below 90 are

considered incomplete proteins and are unsuitable as the sole protein source in a diet. Their use in formulation would therefore require another protein supplement to meet requirements. FR showed the highest value of IV-PDCAAS (93.3) among the samples, representing a good source of protein with high digestibility and a profile of AAs without deficiency in EAA. For the sunflower samples, despite their fairly good digestibility, their IV-PDCAAS values were low, less than 50, due to their unbalanced EAA composition. The lowest result was obtained for sample CSa (30.7), which reflected the lowest digestibility and a lysine deficiency. Thus, compared to peas, rapeseed has a higher IV-PDCAAS, while sunflower has an IV-PDCAAS that is lower or equal. In a diversified diet, limiting AAs from one source can be compensated for by another source, either together in a blend or as balanced products in a meal or diet. For example, sunflower ingredients deficient in lysine but rich in sulfur AAs can be complemented by rapeseed with a balanced EAA profile or with peas rich in lysine and deficient in sulfur AAs.

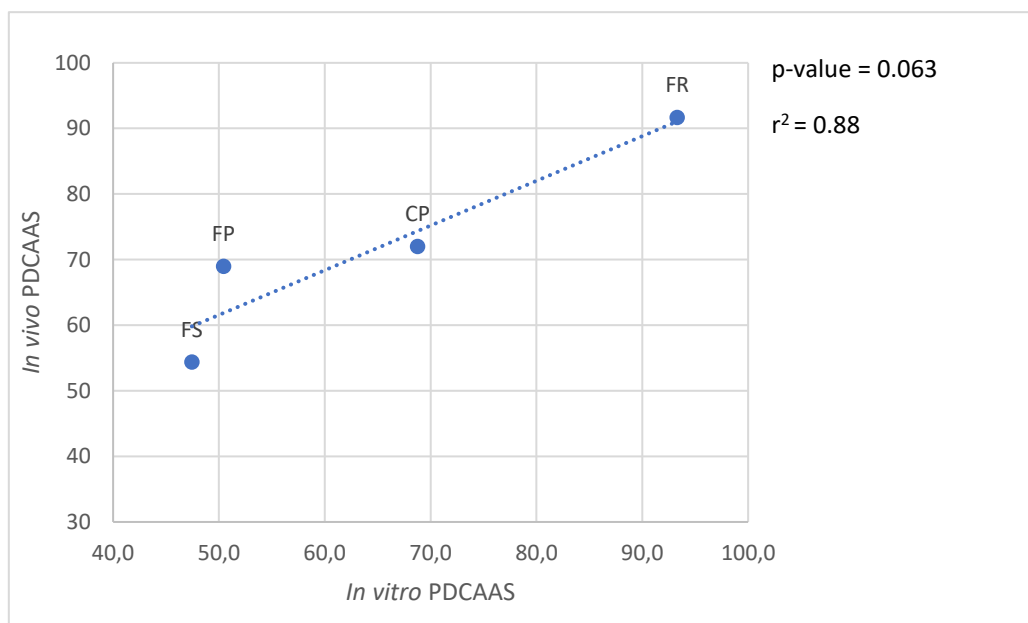


Figure 5. Pearson's correlation between IV-PDCAAS and *in vivo* PDCAAS reported in previous studies.^{12,78}

FP, flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower.

In this study, IV-PDCAAS values were compared to available *in vivo* PDCAAS values in the literature, assessed on animal models (Figure 5). Unfortunately, IV-PDCAAS values for CSa and CSb could not be compared due to missing data regarding *in vivo* PDCAAS of concentrate of

sunflower in the literature. Correlation analyses revealed a relationship between protein digestibility measured *in vivo* in animals and that evaluated *in vitro* using the INFOGEST protocol (p-value=0.063, $r^2=0.88$), supporting the validity of the experimental procedures in this study. However, it should be noted that these *in vitro* vs. *in vivo* digestibility values should be interpreted with caution, as they were obtained from different protein ingredients and originate from different studies. Moreover, it is noteworthy that the values obtained with the *in vivo* method tend to be higher. Given the ethical and financial challenges associated with evaluating *in vivo* digestibility using animal models, the use of *in vitro* PDCAAS according to the INFOGEST method is a validated alternative for assessing the protein quality of various ingredients.

4. Conclusion

In recent years, there have been substantial advances in understanding the AA profile and functional properties of oilseed proteins. However, few studies have deeply characterized the matrix constituting the protein ingredient and its relationship with processing methods and protein digestibility. Our results highlight that sunflower and rapeseed protein products constitute a valuable source of nutritional and bioactive components that are rich in fiber, MUFAs, and phytic acids with anti-inflammatory properties. However, challenges remain, such as poor protein solubility and high levels of anti-nutritional factors, including phytic acid, which require corrective measures to improve protein digestibility. Despite these challenges, oilseed proteins showed good digestibility, on a par with pea protein. However, unit processes such as prolonged heat treatment or the use of solvents during oil extraction can alter the physicochemical properties of proteins, thereby reducing their hydrolyzability.

These findings underscore the importance of understanding the physicochemical properties of plant-based protein ingredients with a view to their use in the food industry, both from functional and nutritional perspectives. They also open avenues for future studies to further explore the interactions between different components of plant-based protein ingredients and their impact on digestibility and ingredient quality. We find that sunflower and rapeseed protein products show promise for use as substitutes or complements in the human food industry.

Author Contributions

Lina Toutirais: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – Original Draft, Writing – Review and Editing, Visualization; **Stephane Walrand:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing – Review and Editing; **Carole Vaysse:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing – Review and Editing.

Conflicts of interest

The author declares no conflict of interest.

Acknowledgements

This article did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We thank the ANRT for funding Lina Toutirais's PhD grant. The authors would like to thank Improve for their expertise in the characterization of plant proteins and for the solubility analysis.

References

1. Salunkhe DK, Deshpande SS. Foods of Plant Origin: Production, Technology, and Human Nutrition. Springer Science & Business Media; 2012.
2. Aiking H. Future protein supply. Trends in Food Science & Technology. 2011;22(2):112-120. doi:10.1016/j.tifs.2010.04.005
3. Chandran A, Suri S, Choudhary P. Sustainable plant protein: an up-to-date overview of sources, extraction techniques and utilization. Sustainable Food Technology. 2023;1(4):466-483. doi:10.1039/D3FB00003F
4. Arntfield SD. 7 - Proteins from oil-producing plants. In: Yada RY, ed. Proteins in Food Processing (Second Edition). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing; 2018:187-221. doi:10.1016/B978-0-08-100722-8.00008-5
5. Guéguen J, Walrand S, Bourgeois O. Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. Cahiers de Nutrition et de Diététique. 2016;51(4):177-185. doi:10.1016/j.cnd.2016.02.001
6. Singh R, Langyan S, Sangwan S, Rohtagi B, Khandelwal A, Shrivastava M. Protein for Human Consumption From Oilseed Cakes: A Review. Frontiers in Sustainable Food Systems. 2022;6. Accessed July 4, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2022.856401>
7. Ancuța P, Sonia A. Oil Press-Cakes and Meals Valorization through Circular Economy Approaches: A Review. Applied Sciences. 2020;10(21):7432. doi:10.3390/app10217432
8. Norton JE, Wallis GA, Spyropoulos F, Lillford PJ, Norton IT. Designing Food Structures for Nutrition and Health Benefits. Annual Review of Food Science and Technology. 2014;5(1):177-195. doi:10.1146/annurev-food-030713-092315
9. Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends in Biotechnology. 2012;30(11):591-600. doi:10.1016/j.tibtech.2012.08.001
10. Brodkorb A, Egger L, Alming M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. Nat Protoc. 2019;14(4):991-1014. doi:10.1038/s41596-018-0119-1
11. Dietary Protein Quality Evaluation in Human Nutrition: Report of an FAO Expert Consultation [on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition], 31 March - 2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.
12. Ertl P, Knaus W, Zollitsch W. An approach to including protein quality when assessing the net contribution of livestock to human food supply. animal. 2016;10(11):1883-1889. doi:10.1017/S1751731116000902
13. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. Journal of Biological Chemistry. 1957;226(1):497-509. doi:10.1016/S0021-9258(18)64849-5
14. Castro-Gómez MP, Rodríguez-Alcalá LM, Calvo MV, et al. Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid

- system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*. 2014;97(11):6719-6728. doi:10.3168/jds.2014-8128
15. Ebert S, Gibis M, Terjung N, Weiss J. Survey of aqueous solubility, appearance, and pH of plant protein powders from carbohydrate and vegetable oil production. *LWT*. 2020;133:110078. doi:10.1016/j.lwt.2020.110078
 16. Minekus M, Alminger M, Alvito P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*. 2014;5(6):1113-1124. doi:10.1039/C3FO60702J
 17. Kopf-Bolanz KA, Schwander F, Gijs M, Vergères G, Portmann R, Egger L. Validation of an *In vitro* Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in Humans^{1–23}. *The Journal of Nutrition*. 2012;142(2):245-250. doi:10.3945/jn.111.148635
 18. Fountoulakis M, Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*. 1998;826(2):109-134. doi:10.1016/S0021-9673(98)00721-3
 19. Mariotti F, Tomé D, Mirand PP. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008;48(2):177-184. doi:10.1080/10408390701279749
 20. Meganaharshini M, Sudhakar V, Dhivya Bharathi N, Deepak S. Review on recent trends in the application of protein concentrates and isolates – A food industry perspective. *Food and Humanity*. 2023;1:308-325. doi:10.1016/j.foohum.2023.05.022
 21. Bárta J, Bártová V, Jarošová M, et al. Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences. *Foods*. 2021;10(11):2766. doi:10.3390/foods10112766
 22. Pöri P, Lille M, Edelmann M, et al. Technological and sensory properties of plant-based meat analogues containing fermented sunflower protein concentrate. *Future Foods*. 2023;8:100244. doi:10.1016/j.fufo.2023.100244
 23. Rekola SM, Kårlund A, Mikkonen S, Kolehmainen M, Pomponio L, Sozer N. Structure, texture and protein digestibility of high moisture extruded meat alternatives enriched with cereal brans. *Applied Food Research*. 2023;3(1):100262. doi:10.1016/j.afres.2023.100262
 24. Gbadamosi SO, Abiose SH, Aluko RE. Amino acid profile, protein digestibility, thermal and functional properties of Conophor nut (*Tetracarpidium conophorum*) defatted flour, protein concentrate and isolates. *International Journal of Food Science & Technology*. 2012;47(4):731-739. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02901.x
 25. San Juan LD, Villamide MJ. Nutritional Evaluation of Sunflower Products for Poultry as Affected by the Oil Extraction Process. *Poultry Science*. 2001;80(4):431-437. doi:10.1093/ps/80.4.431
 26. Jiménez-Munoz LM, Tavares GM, Corredig M. Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality. *Trends in Food Science & Technology*. 2021;113:139-150. doi:10.1016/j.tifs.2021.04.049
 27. Herreman L, Nommensen P, Pennings B, Laus MC. Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score. *Food Science & Nutrition*. 2020;8(10):5379-5391. doi:10.1002/fsn3.1809

28. Oseiko M, Romanovska T, Shevchyk V. Justification of the amino acid composition of sunflower proteins for dietary and functional products. Published online 2020. Accessed January 26, 2024. <https://dspace.nuft.edu.ua/handle/123456789/39718>
29. van den Berg LA, Mes JJ, Mensink M, Wanders AJ. Protein quality of soy and the effect of processing: A quantitative review. *Front Nutr.* 2022;9. doi:10.3389/fnut.2022.1004754
30. E. Verkempinck SH, Duijsens D, Mukherjee A, J. Wilde P. Pea protein extraction method impacts the protein (micro)structural organisation and *in vitro* digestion kinetics. *Food & Function.* 2024;15(2):953-966. doi:10.1039/D3FO04225A
31. Terres Univia. Accessed February 11, 2024. <https://www.terresunivia.fr/>
32. Fischer E, Cachon R, Cayot N. Pisum sativum vs Glycine max, a comparative review of nutritional, physicochemical, and sensory properties for food uses. *Trends in Food Science & Technology.* 2020;95:196-204. doi:10.1016/j.tifs.2019.11.021
33. Carré P. Reinventing the oilseeds processing to extract oil while preserving the protein. *OCL.* 2021;28:13. doi:10.1051/ocl/2021001
34. Marambe HK, Shand PJ, Wanasundara JPD. *In vitro* digestibility of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein: effect of seed mucilage, oil and thermal processing. *International Journal of Food Science & Technology.* 2013;48(3):628-635. doi:10.1111/ijfs.12008
35. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2002;56(8):365-379. doi:10.1016/S0753-3322(02)00253-6
36. Yoshida H, Tomiyama Y, Saiki M, Mizushima Y. Tocopherol Content and Fatty Acid Distribution of Peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 2007;84(11):1031-1038. doi:10.1007/s11746-007-1134-5
37. Zhang M, Wang O, Cai S, Zhao L, Zhao L. Composition, functional properties, health benefits and applications of oilseed proteins: A systematic review. *Food Research International.* 2023;171:113061. doi:10.1016/j.foodres.2023.113061
38. Sánchez-Vioque R, Vioque J, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, Millán F. Interaction of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Legumin with Oxidized Linoleic Acid. *J Agric Food Chem.* 1999;47(3):813-818. doi:10.1021/jf980889r
39. Chen Q, Zhang J, Zhang Y, Wang Q. Effect of fatty acid saturation degree on the rheological properties of pea protein and its high-moisture extruded product quality. *Food Chemistry.* 2022;390:133139. doi:10.1016/j.foodchem.2022.133139
40. Zhu X, Wang Q, Leng Y, et al. Lecithin alleviates protein flocculation and enhances fat digestion in a model of infant formula emulsion. *Food Chemistry.* 2021;346:128918. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128918
41. Zhou L, Yang Y, Wang J, Wei S, Li S. Effects of low fat addition on chicken myofibrillar protein gelation properties. *Food Hydrocolloids.* 2019;90:126-131. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.11.044
42. Mackie A, Macierzanka A. Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2010;15(1):102-108. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.005

43. Mandalari G, Mackie AM, Rigby NM, Wickham MSJ, Mills ENC. Physiological phosphatidylcholine protects bovine β -lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009;53(S1):S131-S139. doi:10.1002/mnfr.200800321
44. Kaur L, Mao B, Beniwal AS, et al. Alternative proteins vs animal proteins: The influence of structure and processing on their gastro-small intestinal digestion. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;122:275-286. doi:10.1016/j.tifs.2022.02.021
45. Capuano E, Janssen AEM. Food Matrix and Macronutrient Digestion. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2021;12(Volume 12, 2021):193-212. doi:10.1146/annurev-food-032519-051646
46. Rivera del Rio A, Boom RM, Janssen AEM. Effect of Fractionation and Processing Conditions on the Digestibility of Plant Proteins as Food Ingredients. *Foods*. 2022;11(6):870. doi:10.3390/foods11060870
47. Ye H, Yu W. Different influences of dietary fiber from various sources on the *in vitro* digestibility of casein as uncovered by the study of protein-dietary fiber interactions. *Food Research International*. 2024;176:113845. doi:10.1016/j.foodres.2023.113845
48. Naz S, Siddiqi R, Sayeed SA. *In vitro* study of the inhibitory effect of Fe(II), Fe(III) and Zn(II) ions on the activity of trypsin. *Food Chemistry*. 2001;73(3):381-384. doi:10.1016/S0308-8146(01)00119-4
49. He S, Simpson BK, Ngadi MO, Ma Y. *In vitro* studies of the digestibility of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*). *Food Chemistry*. 2015;173:397-404. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.045
50. Hesseltine CW. Fungal Toxins in Grains, Oilseeds and Other Agricultural Commodities Used in Feed And Food - A Review of Literature.
51. Rani R, Badwaik LS. Functional Properties of Oilseed Cakes and Defatted Meals of Mustard, Soybean and Flaxseed. *Waste Biomass Valor*. 2021;12(10):5639-5647. doi:10.1007/s12649-021-01407-z
52. Toutirais L, Walrand S, Vaysse C. Are oilseeds a new alternative protein source for human nutrition? *Food Funct*. Published online February 5, 2024. doi:10.1039/D3FO05370A
53. Herrmann KR, Ruff AJ, Schwaneberg U. Phytase-Based Phosphorus Recovery Process for 20 Distinct Press Cakes. *ACS Sustainable Chem Eng*. 2020;8(9):3913-3921. doi:10.1021/acssuschemeng.9b07433
54. Rodriguez D, Sulabo R, JC, Vega, HH, Stein. Energy concentration and phosphorus digestibility in canola, cottonseed, and sunflower products fed to growing pigs. *Can J Anim Sci*. 2013;93(4):493-503. doi:10.4141/cjas2013-020
55. Salgado PR, Drago SR, Molina Ortiz SE, et al. Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale. *LWT - Food Science and Technology*. 2012;45(1):65-72. doi:10.1016/j.lwt.2011.07.021
56. Carbonaro M, Cappelloni M, Nicoli S, Lucarini M, Carnovale E. Solubility–Digestibility Relationship of Legume Proteins. *J Agric Food Chem*. 1997;45(9):3387-3394. doi:10.1021/jf970070y
57. Boatright WL, Hettiarachchy NS. Effect of lipids on soy protein isolate solubility. *J Am Oil Chem Soc*. 1995;72(12):1439-1444. doi:10.1007/BF02577835

58. Sirison J, Matsumiya K, Samoto M, Hidaka H, Kouno M, Matsumura Y. Solubility of soy lipophilic proteins: comparison with other soy protein fractions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2017;81(4):790-802. doi:10.1080/09168451.2017.1282808
59. Bai M, Qin G, Sun Z, Long G. Relationship between Molecular Structure Characteristics of Feed Proteins and Protein *In vitro* Digestibility and Solubility. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2016;29(8):1159-1165. doi:10.5713/ajas.15.0701
60. Ding M, Huang Z, Jin Z, et al. The effect of fat content in food matrix on the structure, rheological properties and digestive properties of protein. *Food Hydrocolloids*. 2022;126:107464. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.107464
61. Smith ME, Morton DG. *The Digestive System: Systems of the Body Series*. Elsevier Health Sciences; 2011.
62. Maeda N, Dulko D, Macierzanka A, Jungnickel C. Analysis of the Factors Affecting Static *In vitro* Pepsinolysis of Food Proteins. *Molecules*. 2022;27(4):1260. doi:10.3390/molecules27041260
63. Liu B, Thacker P, McKinnon J, Yu P. In-depth study of the protein molecular structures of different types of dried distillers grains with solubles and their relationship to digestive characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(6):1438-1448. doi:10.1002/jsfa.5912
64. Kohli V, Singha S. Protein digestibility of soybean: how processing affects seed structure, protein and non-protein components. *Discov Food*. 2024;4(1):1-16. doi:10.1007/s44187-024-00076-w
65. González-Pérez S, Vereijken JM. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007;87(12):2173-2191. doi:10.1002/jsfa.2971
66. Day L, Cakebread JA, Loveday SM. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*. 2022;119:428-442. doi:10.1016/j.tifs.2021.12.020
67. Wanasundara JPD, McIntosh TC, Perera SP, Withana-Gamage TS, Mitra P. Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. *OCL*. 2016;23(4):D407. doi:10.1051/ocl/2016028
68. Arrutia F, Binner E, Williams P, Waldron KW. Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;100:88-102. doi:10.1016/j.tifs.2020.03.044
69. Deleu M, Vaca-Medina G, Fabre JF, Roiz J, Valentin R, Mouloungui Z. Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;80(2):125-132. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.05.036
70. Chéreau D, Videcoq P, Ruffieux C, et al. Combination of existing and alternative technologies to promote oilseeds and pulses proteins in food applications. *OCL*. 2016;23(4):D406. doi:10.1051/ocl/2016020
71. Alexandrino TD, Ferrari RA, de Oliveira LM, de Cássia S.C. Ormenese R, Pacheco MTB. Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions. *LWT*. 2017;84:426-432. doi:10.1016/j.lwt.2017.05.062

72. Ma Z, Boye JI, Hu X. Nutritional quality and techno-functional changes in raw, germinated and fermented yellow field pea (*Pisum sativum* L.) upon pasteurization. *LWT*. 2018;92:147-154. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.018
73. Zhang B, Liu G, Ying D, Sanguansri L, Augustin MA. Effect of extrusion conditions on the physico-chemical properties and *in vitro* protein digestibility of canola meal. *Food Research International*. 2017;100:658-664. doi:10.1016/j.foodres.2017.07.060
74. Li C, Shi D, Stone AK, et al. Effect of solid-state fermentation on select antinutrients and protein digestibility of cold-pressed and hexane-extracted canola meals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2023;100(7):529-538. doi:10.1002/aocs.12705
75. Sá AGA, Silva DC da, Pacheco MTB, Moreno YMF, Carciofi BAM. Oilseed by-products as plant-based protein sources: Amino acid profile and digestibility. *Future Foods*. 2021;3:100023. doi:10.1016/j.fufo.2021.100023
76. Kadam DM, Kumar M, Kasara A. Application of high energy electromagnetic radiations in elimination of anti-nutritional factors from oilseeds. *LWT*. 2021;151:112085. doi:10.1016/j.lwt.2021.112085
77. Duque-Estrada P, Berton-Carabin CC, Nieuwkoop M, Dekkers BL, Janssen AEM, van der Goot AJ. Protein Oxidation and *In vitro* Gastric Digestion of Processed Soy-Based Matrices. *J Agric Food Chem*. 2019;67(34):9591-9600. doi:10.1021/acs.jafc.9b02423
78. Petrusán JI, Rawel H, Huschek G. Protein-rich vegetal sources and trends in human nutrition: A review. *Current Topics in Peptide and Protein Research*. 2016;János-István Petrusán, Harshadrai Rawel and Gerd Huschek, 2016, Protein-rich vegetal sources and trends in human nutrition: A review, *Current Topics in Peptide&Protein Research*, Vol. 17, 1 –19:1-19.
79. Krul ES, Sá AGA, Goldberg EM, House JD. *In vitro* protein digestibility to replace *in vivo* digestibility for purposes of nutrient content claim substantiation in North America's context. *Front Nutr*. 2024;11. doi:10.3389/fnut.2024.1390146
80. Sousa R, Portmann R, Dubois S, Recio I, Egger L. Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model. *Food Research International*. 2020;130:108996. doi:10.1016/j.foodres.2020.108996

A retenir de l'article n°1

.....

L'objectif de cette étude était d'évaluer la protéolyse d'ingrédients protéiques de colza et tournesol, en comparaison avec des ingrédients de pois, tout en approfondissant la compréhension des relations entre la composition d'un ingrédient, la complexité de la matrice protéique et l'accessibilité des protéines. Les résultats ont montré que, bien que la digestibilité des protéines végétales soit globalement limitée dans la phase gastrique pour tous les ingrédients, des différences significatives ont été observées lors de la phase intestinale. Les ingrédients d'oléagineux ont présenté un IVPD comparable à celle des ingrédients de pois, à l'exception d'un des deux concentrats de tournesol qui avait une plus faible hydrolyse. Les protéines de la farine de colza ont présenté la meilleure digestibilité, probablement grâce à la présence de phospholipides, favorisant l'émulsification des lipides et l'accès des enzymes aux protéines. En revanche, les protéines de tournesol ont montré une digestibilité plus faible, pouvant être liée à la présence d'acides phytiques et de fibres. De plus, les deux concentrats de tournesol ont révélé des différences de protéolyse importantes, soulignant l'impact des procédés de transformation sur les propriétés physico-chimiques des protéines, telles que leur solubilité et par conséquent, leur capacité à être hydrolysées. Enfin, les indices de qualité protéique, comme l'IV-PDCAAS, ont confirmé le potentiel du colza en tant que source de protéines de haute qualité, en raison de son profil en AA répondant aux besoins humains. Les protéines de tournesol ont, quant à elles, présenté une digestibilité plus modérée et offrent un profil en AA globalement adapté aux besoins humains, à l'exception de la lysine, dont la teneur était inférieure aux apports recommandés. Ce déficit peut néanmoins être facilement compensé en associant le tournesol à d'autres sources protéiques au profil complémentaire en AA. Ainsi, cette étude met en lumière le potentiel prometteur des protéines de tournesol et de colza comme alternatives ou compléments protéiques dans l'industrie alimentaire humaine.

ARTICLE N°2



ARTICLE 2

Impact de mélanger des ingrédients protéiques issus d'oléagineux et de pois avec des lipides sur la cinétique de digestion *in vitro* des protéines et des lipides.

Nous avons vu dans l'article précédant que la digestibilité des protéines dépend de plusieurs facteurs, dont la composition de la matrice alimentaire et les interactions entre les nutriments. Bien que de nombreuses recherches aient été menées sur les interactions protéines-glucides, lipides-glucides, les relations entre protéines et lipides, en particulier dans des matrices non émulsionnées, restent encore peu explorées.

Cette étude se propose d'examiner les interactions entre les protéines et les lipides dans des matrices alimentaires plus ou moins complexe lors de la digestion gastro-intestinale, en utilisant le protocole *in vitro* standardisé INFOGEST. Ce protocole constitue un outil essentiel pour étudier l'hydrolyse des protéines et des lipides dans des conditions contrôlées. Ainsi, des expériences de protéolyse *in vitro* ont été réalisées sur des ingrédients protéiques dérivés du pois et des oléagineux, avec ou sans ajout d'huile de colza. Parallèlement, des tests de lipolyse ont été conduits sur l'huile de colza seule ou combinée à ces ingrédients protéiques.

Ce travail a pour objectif d'apporter des informations supplémentaires sur l'influence de la composition des matrices alimentaires sur l'efficacité et la cinétique de l'hydrolyse des protéines et des lipides. Le but était de contribuer à une meilleure compréhension des interactions protéines-lipides et à l'optimisation de la digestibilité des nutriments dans des aliments fonctionnels destinés à améliorer la santé humaine.

Les résultats de ces expériences sont présentés sous la forme d'un article à soumettre au journal

Food Research International

Impact of mixing oilseed and pea protein ingredients with lipids on the *in vitro* digestion kinetics of proteins and lipids.

Lina Toutirais^{ab*}, Leslie Couedelo^a, Cécile Joseph^d, Stephane Walrand^{b,c}, Carole Vaysse^a

^a*ITERG sciences, Department of Nutritional Life Sciences, 33610 Canéjan, France.*

^b*Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, 63000 Clermont-Ferrand, France.*

^c*Clinical Nutrition Department, CHU, 63000 Clermont-Ferrand, France.*

^d*ITERG sciences, Department of Formulation, 33610 Canéjan, France.*

Abstract

Nutrients interact both within a food matrix and throughout their passage in the gastrointestinal tract. These interactions within the digestive system can influence nutrient bioavailability and absorption, underscoring the importance of knowing the specific nutrient compositions of food sources. This study aims to explore the impact of lipid-protein interactions in various plant-based protein ingredients on the digestibility of these nutrients. To achieve this, an *in vitro* digestion of oilseed and pea protein ingredients, with or without added rapeseed oil, was conducted following the INFOGEST protocol, enabling the measurement of *in vitro* proteolysis and lipolysis kinetics. The results show that the presence of rapeseed oil does not affect the gastric digestibility of the proteins studied but has variable effects on intestinal digestibility depending on the protein ingredient. We hypothesize that adding oil to starch-rich or lipid-rich matrices reduces proteolysis, whereas in matrices low in non-protein components, oil enhances proteolysis. Additionally, the addition of protein ingredients reduces or has no effect on lipid digestion. Notably, protein ingredients with larger particle sizes and low solubility tend to reduce the lipolysis of rapeseed oil. These findings provide new insights into lipid-protein interactions and their impact on the respective digestibility of these nutrients.

1. Introduction

The nutritional value of food depends not only on its nutrients content but also on the food matrix, which refers to the interactions among ingredients within the food and within the gastro-intestinal tract (GIT) during the digestion [1]. Macronutrients (proteins, fats and carbohydrates), which are the body's primary energy sources, interact in the GIT due to their respective physical and chemical properties and the complex digestive environment [2]. These interactions in the digestive system modulate the availability of the nutrients in the organism, thereby influencing their health effects and underscoring the importance of understanding how proteins and lipids from different food sources, each with different nutrient compositions, can modulate their respective bioavailability. Moreover, the kinetics of dietary protein digestion is also a determinant factor for the health effects of this nutrient. Indeed, slow- and fast-digesting dietary proteins, classified based on the postprandial release rates of their amino acids, differently influence postprandial protein metabolism, protein accretion [3], and satiety [4].

Among current plant-based protein sources, studied as a sustainable alternative to animal protein, there is a growing interest in legumes and oilseeds, due to their interesting nutritional composition. Peas, one of the most widely cultivated legumes, are particularly valued for their high protein (around 20%) and high starch contents, which accounts for nearly 45% of their composition [5]. Meanwhile, oilseeds are notable for their high lipid concentration, averaging 45% in seeds such as rapeseed and sunflower, while also containing proteins (20% for rapeseed and 16% for sunflower) and fibers [6]. Protein ingredients from oilseeds are by-products of the oil industry, obtained after extracting oil from the seeds. Among the extracted oils derived from oilseed plants, rapeseed oil stands out as a significant natural source of unsaturated fatty acids, beneficial to human health, with a high content of oleic acid (55%) and alpha linolenic acid (19%), and a low content of saturated fatty acids (7%) [5].

In this context, the combination of plant-based protein ingredients, such as those derived from oilseeds or legumes such as pea, with rapeseed oil, could lead to functional foods with potential synergistic nutritional benefits. However, a fundamental aspect to consider in this approach is the digestibility of proteins and lipids, a key factor for their bioavailability and metabolic efficiency in human. Indeed, in the GIT, pH variations and the action of digestive enzymes contribute to the evolution of the molecular structure and physicochemical

properties of dietary proteins and lipids [7], promoting new interactions between these macronutrients themselves or with other food components such as fiber, carbohydrates or antinutritional factors. While many studies have explored the interactions between proteins and carbohydrates, especially starch [8–10], the relationships between proteins and lipids, particularly in non-emulsified matrices, are less well understood. Yet, proteins are amphiphilic molecules, allowing them to bind to lipids through hydrophobic interactions [11]. In the literature, these interactions have been shown to influence protein digestibility, although they depend on numerous factors such as lipid form, oxidation state, protein source, and their three-dimensional structure [11–14].

The study of gastrointestinal digestion through *in vitro* systems is an effective way to explore these mechanisms. Among the many existing *in vitro* methods, the standardized INFOGEST protocol, developed by international consensus, allows for the harmonization of experimental conditions and improves the comparability of results between different studies [15]. This protocol replicates the key stages of human digestion, from the oral to the intestinal phase, simulating the enzymatic and chemical conditions present in the digestive tract [16]. Moreover, these *in vitro* methods offer practical and ethical advantages over *in vivo* studies, which are often expensive, time-consuming, and technically challenging to set up. Following FAO guidelines and the 4R principles (Replacement, Reduction, Refinement, and Responsibility), these methods help reduce the use of laboratory animals [17].

The present study aims to examine how mixing lipids with several plant matrices with different protein content and compositions affects digestion, using the INFOGEST protocol. Specifically, *in vitro* digestion experiments were conducted on oilseed and pea protein ingredients, with or without addition of rapeseed oil, to assess their *in vitro* proteolysis and lipolysis kinetics. The results provide insights into the influence of food matrix composition on the kinetics and efficiency of protein and lipid hydrolysis, and the optimization of nutrient digestibility in health-promoting foods.

2. Materials and method

2.1. Materials and reagents

The oilseed and pea protein ingredients were sourced from various suppliers (Table 1). Rapeseed oil was acquired from a local supermarket. Porcine pepsin (P7012), porcine pancreatin (P7545; 8xUSP activity), and bile extract (B8631) were supplied by Sigma-Aldrich,

USA. Rabbit gastric extract (RGE15) was obtained from Lipolytech, France. The lipase inhibitor orlistat was also sourced from Sigma-Aldrich, USA. All other chemicals and reagents were provided by Fisher, Belgium, with the exception of heptane (Honeywell, France), sodium hydroxide (Chemlab, Belgium), and 2',7'-dichlorofluorescein (Sigma-Aldrich, USA). Milli-Q water was used.

Table 1. Description of the protein matrices samples.

Name	Supplier	Source	Fractionation process	Abbreviation
Yellow Pea Flour	Muller's Muhle, Germany	Pea	Flour	FP
Pea Protein F55X	Vestkorn, Denmark	Pea	Concentrate	CP
Flour Rapeseed	Iterg, France	Rapeseed	Flour	FR
Flour Sunflower	Iterg, France	Sunflower	Flour	FS
Sunbloom 60%	Sunbloom, Germany	Sunflower	Concentrate	CSa
Sunflower seed protein	Seah, France	Sunflower	Concentrate	CSb

2.2. Composition of protein ingredients

The six protein ingredients used in this study were previously analyzed (Toutirais, 2024 submitted). The detailed composition of these ingredients, including protein, lipid, starch, fiber, and mineral contents, as well as lipid distribution, was presented therein.

2.3. Analysis of particle size distribution of ingredients

The particle size distribution of the powder was measured with a particle size analyzer, model Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical, Netherlands). It provides measurements ranging from 10nm to 3.5mm using an optical measuring path.

2.4. In vitro digestion by INFOGEST method

Various protein sources (FP, CP, FR, FS, CSa, CSb) (Table 1) underwent *in vitro* digestion using the INFOGEST method [15]. The protein matrices were dispersed in Milli-Q water at a concentration of 0.1 g of protein per mL [18], equivalent to 0.5 g of protein. For substrates containing rapeseed oil, the oil was added at a ratio of 0.43g of lipids per gram of protein. It was placed in the digestion tube before adding the protein solutions. For the lipolysis experiment involving oil alone, the oil was also placed in the digestion tube, but water was added instead of protein solutions to maintain comparable concentrations.

Next, the food matrices were mixed with salivary fluid (1:1, v/v) without salivary α -amylase. The oral phase was conducted to reach appropriate electrolyte concentrations and matrix dilution. Following this, the oral bolus was diluted with gastric fluid (1:1, v:v) containing pepsin and RGE, to achieve a pepsin concentration of 2000 U/mL and a gastric lipase concentration of 60 U/mL. The pH was adjusted to 3 with 3N HCl and maintained at 3 with 0.1N HCl. The digestion tube was incubated for 2 hours at 37°C with continuous stirring. For the intestinal phase, intestinal fluid containing bile (10mmol/L) and pancreatin (100 U/mL trypsin activity) were added to the gastric chyme (1:1, v/v). The pH was adjusted to 7 with 6N NaOH and continuously titrated with 0.1N NaOH. The digestion tube was incubated for an additional 2 hours at 37°C with continuous agitation. Samples for protein and lipid analyses were collected throughout digestion (T0 before digestion; T15, T45, T80, T120 for the gastric phase; T2, T20, T70, T120 for the intestinal phase). For protein analyses, proteolytic enzymes were inactivated by heating and for lipid analyses, proteolytic enzymes were inactivated by adding HCl 0.1N followed by chloroform/methanol (2:1, v/v). Each protein digestion, with or without the addition of oil, was repeated three times (n=3).

2.5. Inhibition of lipase

In a separate experiment aimed at studying the impact of lipid-protein interactions on protein digestibility, gastric and pancreatic lipases were inhibited at the start of digestion. To achieve this, an orlistat solution was prepared to reach concentrations of 8.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for RGE and 2.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ for pancreatin. This orlistat solution was then added to the protein solution, while adjusting the water content to maintain the protein concentration at 0.1 g/mL. This experiment was repeated three times (n=3) for each protein ingredient in the presence of oil. The use of orlistat to inhibit lipases during digestion has been previously documented [19,20].

2.6. Determination of degree of hydrolysis of proteins

The heated aliquots were centrifuged at 12,000 x g for 5 minutes and directly analyzed. The resulting supernatants were considered the digestible protein fractions. The concentrations of small peptides and free amino acids in the supernatants were measured using the ortho-phthalaldehyde (OPA) assay. [21] This method detects a complex formed between the α -amino groups of peptides and OPA at 340 nm. In short, 10 μ L of diluted supernatant (undiluted for T0, diluted 1/10 for gastric phase digestates, and 1/50 for intestinal phase digestates) and an L-leucine standard range (Ref #61819, Sigma) were pipetted into a 96-well plate. Then, OPA reagent containing dithiothreitol (Ref #D0632, Sigma), OPA (P0657-1G), sodium dodecyl sulfate (Ref #436143, Sigma), and mol/L sodium tetraborate were added to the samples and standards. After 20 minutes incubated at room temperature, the absorbance was measured at 340 nm (BIOTEK synergy HTX). Peptide and free amino acid concentrations were calculated using a standard curve of L-leucine, and the degree of proteolysis (DP) was determined based on total protein digestion, as described in equation (1):

$$(1) \text{ DP (\%)} = \frac{\frac{\text{Ds Tx (mmol)} - \text{Ds T0 (mmol)} - \text{Blank (mmol)}}{\text{Protein ingredient Ds (g)}}}{\frac{\text{Ptot (mmol)}}{\text{Protein ingredient Ptot (g)}}} \times 100$$

Where Ds Tx, NH_2 amount in the supernatant of the digestate during the digestion; Ds T0, NH_2 amount in the supernatant at the beginning of the digestion; Blank, NH_2 amount in the supernatant of the enzyme solution; Ptot, NH_2 amount in the supernatant from the total hydrolysis of the protein ingredient; Protein ingredient Ds (g), Quantity of protein ingredient added for digestion; Protein ingredient Ptot (g), Quantity of protein ingredient used for total hydrolysis.

The blank was determined by measuring the amount of NH_2 in the enzymatic solutions. Previous experiments using digestion without substrates or with denatured enzymes led to an overestimation of the blank. Therefore, the blank was measured by determining the NH_2 content in pepsin, RGE, and pancreatin solutions, diluted under the same conditions as during gastric and intestinal digestion, using the OPA method (as described for the digestates).

The total NH₂ content was determined through complete hydrolysis with hydrochloric acid. Specifically, 0.05 g of the protein matrix was hydrolyzed in 6N HCl at 110°C for 24 hours. The hydrolyzed solution was centrifuged, and the NH₂ content in the supernatant was measured using the OPA method, following the same procedure as for the digestates.

2.7. Determination of degree of hydrolysis of lipids

The lipids in the aliquots were extracted using the Folch method.[22] The chloroform phase was recovered and then dried under nitrogen N₂. 100µL of silylating agent (95µL of N-Methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutyramide and 5µL of N-Methylimidazole) were added to the dry extract, and the mixture was placed in an oven at 100°C for 15 minutes. 400µL of isopropanol was added, and then 1µL of the solution was injected into a gas chromatography column (ZB-5HT inferno). The lipolysis rate is calculated by quantifying the fatty acids (FA) in different lipid fractions by GC. The degree of lipolysis (DL) calculation considers the concentrations (%) of the lipid fractions obtained by GC (2):

$$(2) \text{ DL (\%)} = \frac{[\text{MAG}]_{\text{Tx}} + [\text{FFA}]_{\text{Tx}} - ([\text{MAG}]_{\text{T0}} + [\text{FFA}]_{\text{T0}})}{[\text{MAG}] + [\text{DAG}] + [\text{FFA}] + [\text{TAG}]} \times 100$$

Where MAG, monoacylglycerol; FFA, free fatty acid; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol, DH, degree of hydrolysis; T0, at the beginning of digestion; Tx, during the digestion.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed using XLSTAT (version 2023). Data are expressed as mean ± standard deviation. Each proteolysis was repeated 3 times (n=3), while the lipolyses were repeated 2 times (n=2). Normality and homogeneity of variance were assessed. All data showed homogeneity and were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey post-hoc tests to assess differences between means. Moreover, Pearson's correlation test was also performed.

3. Results

3.1. Nutritional composition and physical characterization of protein ingredients

The protein ingredients used in this study exhibit highly variable protein contents, reflecting the diversity of plant sources and processing methods used. To ensure comparability of hydrolysis kinetics between samples, protein amounts were normalized before *in vitro* digestion. A fixed amount of 0.5 g of protein was used for each sample, with specific conversion factors for each plant source: 5.36 for peas, 5.35 for rapeseed, and 5.29 for sunflower [23].

Table 2. Composition of ingredients of flours and concentrates of rapeseed, sunflower, and pea.

	FP	CP	FR	FS	CSa	CSb
Protein (% d.m.)	18.3	42.6	23.1	27.0	50.1	42.2
Lipid (% d.m.)	1.4	1.3	18.0	18.2	0.6	2.9
PL (% of total lipid)	48	33	9	4	8	13
FFA (% of total lipid)	4	5	24	6	6	10
MAG (% of total lipid)	8	7	12	1	2	1
DAG (% of total lipid)	2	8	7	4	7	9
TAG (% of total lipid)	39	46	48	85	78	66
Carbohydrate (% d.m.)	66.6	43.1	43.1	39.5	35.2	40.0
Starch (% d.m.)	48.0	6.0	2.3	0.5	0.3	1.3
Fiber (% d.m.)	7.6	15.1	11.2	19.4	19.8	18
Ash (% d.m.)	2.7	5.4	5.2	6.3	8.8	7.2

FP, Flour of pea; CP, concentrate of pea; FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; CSa, concentrate of sunflower A; CSb, concentrate of sunflower B; PL, phospholipids; FFA, free fatty acid; MAG, monoacylglycerol; DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol.

The composition of the six protein ingredients presented in Table 2, reveals marked heterogeneity in lipid, starch, and fiber contents. Lipid levels are particularly high in FR (18.0%) and FS (18.2%), standing out significantly from the other ingredients. This richness in lipids in FR and FS is reflected by the prevalence of triglycerides (TAG), representing the majority of the lipid fractions. A high proportion of phospholipids (PL) was observed in the FP ingredient. Consequently, the PL content in FP ingestates, normalized to 0.5 g of protein, reaches 18 mg, which falls within the same range as the PL content of FS and FR ingestates, with PL levels of 18 mg and 38 mg, respectively. Additionally, FP is also distinguished by its high starch content (48%), making it the most concentrated starch source among the analyzed ingredients. The other ingredients contain much lower levels of starch, less than 6%, and almost negligible in FS and CSa. Dietary fiber content also exhibits significant variability. FS and CSa show the highest fiber levels (19.4% and 19.8%, respectively). However, in terms of quantity normalized to 0.5 g of protein, FS contains the most fiber (380 mg), followed by FR (260 mg), while CSb contains the least (50 mg).

In addition to compositional differences, the protein ingredients show significant variability in particle size, as illustrated in Figure 1. This variability is largely attributable to the plant source and the processing methods used for the protein powders. The flours of FR and FS exhibit a predominant distribution of particles in the 500-700 μm fraction, with a notable proportion of larger particles, ranging between 700 and 3000 μm . The presence of large particles indicates strong cohesion within the matrices, likely due to the high lipid content of these ingredients, which could influence their behavior during digestion, particularly in nutrient release. Conversely, FP and all protein concentrates (CSa and CSb) are primarily composed of small particles, less than 150 μm , reflecting a finer and more homogeneous structure. CP powders are particularly homogeneous, with no particles larger than 150 μm .

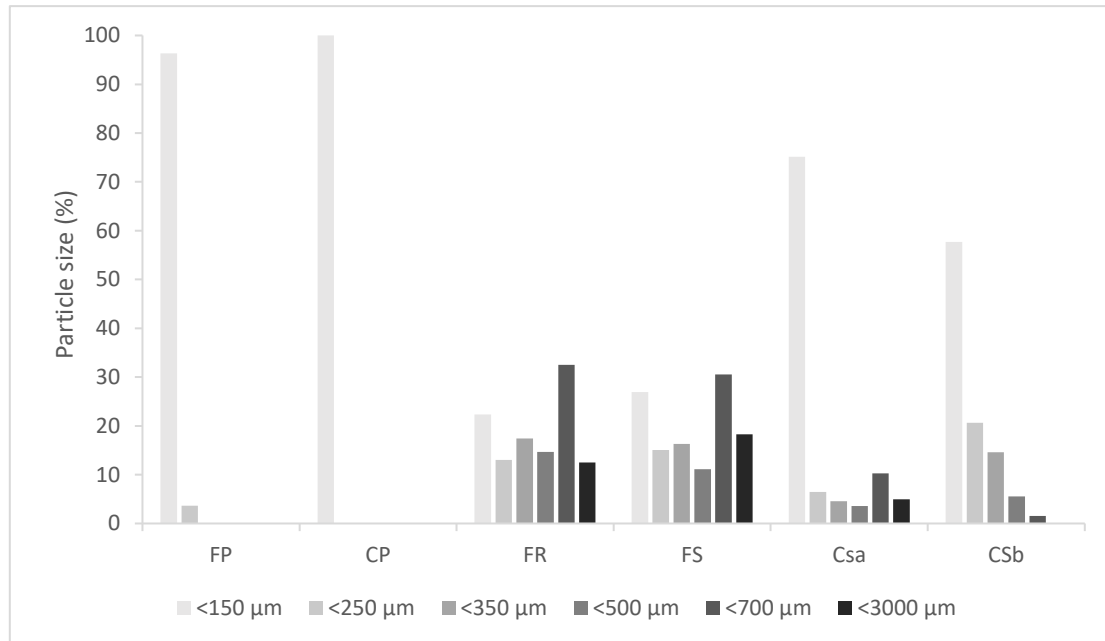


Figure 1. Particle size distribution of oilseed and pea protein powder.

FP, flour of pea; CP, concentrate of pea, FR, flour of rapeseed; FS, flour of sunflower; Csa, concentrate of Sunflower A; CSb, concentrate of Sunflower B.

3.2. Protein hydrolysis

The protein digestibility kinetics of the six ingredients, with or without oil, were monitored during the gastric phase (0 to 120 minutes) and intestinal phase (120 to 240 minutes), as illustrated in Figure 2.

For all substrates tested, the protein hydrolysis profile shows a similar pattern: a rapid increase in DP is observed within the first 15 minutes of the gastric phase, followed by a more moderate increase until the end of the gastric phase, to reach a final DP ranging from 10% to 17% according the protein ingredient. Then, during the intestinal phase, the proteolysis sharply increases within the first two minutes of the addition of pancreatin, then continues at a slower but variable rate depending on the samples. The DP at the end of the digestion varies from 38% to 78%.

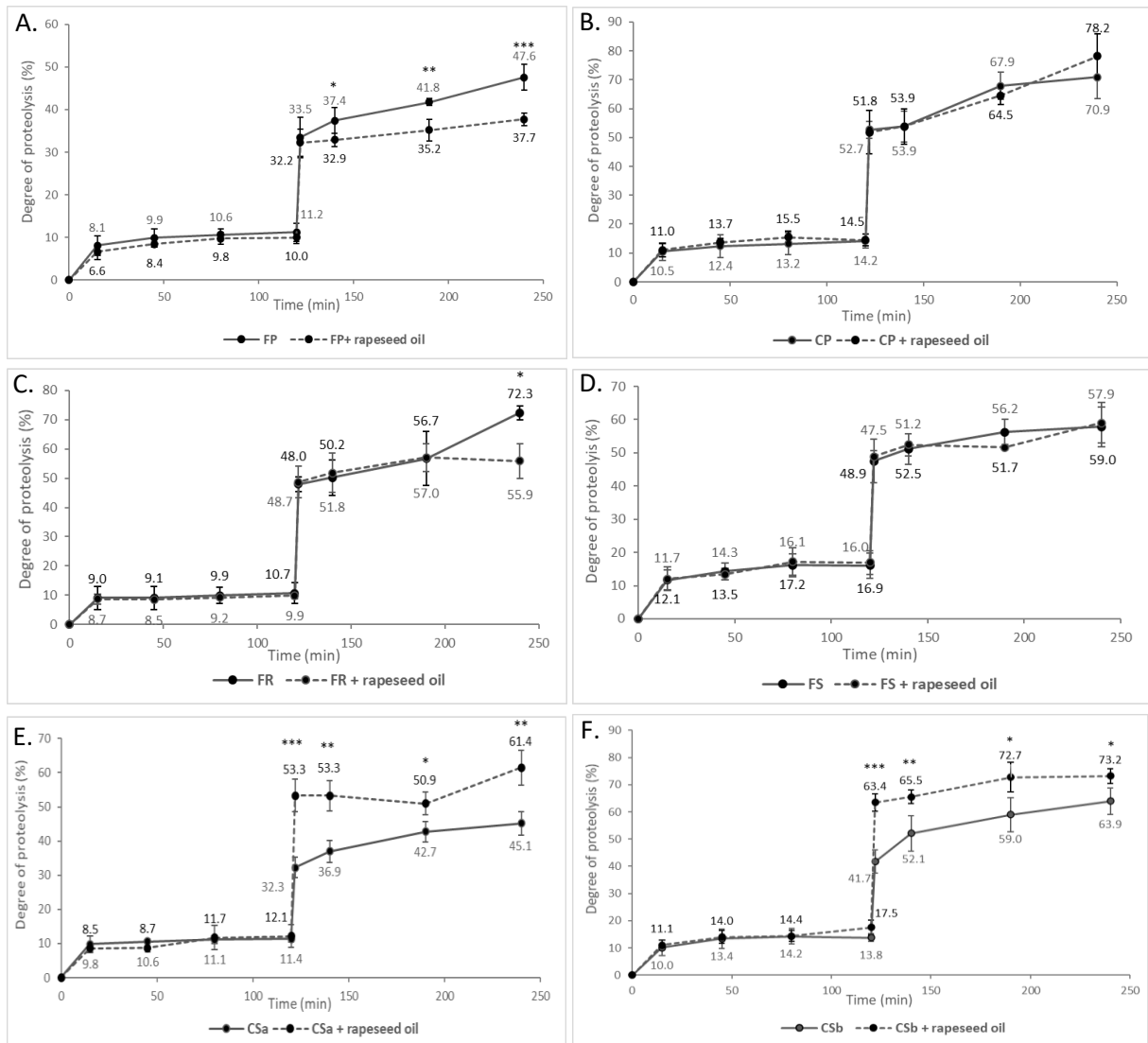


Figure 2. Proteolysis (n=3) during *in vitro* digestion of the six protein ingredients, without rapeseed oil addition (solid lines) and with rapeseed oil addition (dash lines): flour of pea (FP) (A), concentrate of pea (B), flour of rapeseed (FR) (C), flour of sunflower (FS) (D), concentrate of sunflower A (CSa) (E), concentrate of sunflower B (CSb) (F).

Significant differences between matrices at a given time are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Tukey test).

Mixing rapeseed oil with the protein ingredient did not significantly impact proteolysis during the gastric phase ($p > 0.05$), but it modified proteolysis during the intestinal phase, with different effects depending on the protein ingredient. For FP proteins, the addition of rapeseed oil significantly reduced proteolysis from the beginning of the intestinal phase ($p < 0.05$) through to the end of digestion ($p < 0.001$), leading to a reduction of -20.8% in proteolysis compared to the no-oil condition. For FR proteins, a similar trend is observed, though the inhibitory effect of oil on proteolysis only became significant after 70 minutes into

the intestinal phase, resulting in a significant difference ($p < 0.05$) of -22.7% compared to the no-oil condition.

In contrast, for FS proteins, the addition of oil had no significant effect on proteolysis during the intestinal phase. The same was observed for CP, when it was mixed with oil. On the contrary, for both sunflower protein concentrates, CSa and CSb, the addition of oil significantly enhanced protein digestion, increasing hydrolysis rates from the start of the intestinal phase. Two minutes after pancreatin addition, the DP for CSa reached 53.3% in the presence of oil, compared to only 32.3% without, representing an increase of +65% ($p < 0.001$). This positive effect continued until the end of digestion, with a final increase DP of +36% in the presence of oil ($p < 0.01$). For CSb, a similar beneficial effect of oil was observed within the first two minutes, with a DP of 41.7% without oil and 63.4% with oil, representing an enhancement of +52% ($p < 0.001$). By the end of digestion, the presence of oil led to an increase of +14.6% in proteolysis for CSb proteins ($p < 0.05$). Overall, these results suggest that the impact of oil on protein hydrolysis is significantly influenced by the composition of the protein ingredient.

3.3. Proteolysis in the presence of orlistat

Table 3. *In vitro* protein digestibility under different experimental conditions: without oil, with oil, and with oil + orlistat, for protein ingredients where oil affected proteolysis.

	IVPD of protein ingredient	IVPD of protein ingredient + oil	IVPD of protein ingredient + oil + orlistat
FP	47.6 ± 3.1 ^a	37.7 ± 1.3 ^b	51.5 ± 5.0 ^a
FR	72.3 ± 2.4 ^a	55.9 ± 6.0 ^b	54.0 ± 1.9 ^b
CSa	45.1 ± 3.5 ^b	61.4 ± 5.1 ^a	59.0 ± 6.1 ^a
CSb	63.9 ± 4.8 ^b	73.2 ± 2.7 ^a	65.0 ± 2.7 ^b

FP, Flour of pea; FR, flour of rapeseed; CSa, concentrate of sunflower A; CSb, concentrate of sunflower B; IVPD, *in vitro* protein digestibility. Different letters indicate a statistically significant difference at $p < 0.05$ (Tuckey Test).

Table 3 shows the impact of lipolysis inhibition by a lipolysis inhibitor, the “orlistat”, on protein digestibility of the ingredients showing a modification of the proteolysis in the presence of oil. For FP and CSb, the addition of orlistat with oil induced a significant change in

in vitro protein digestibility (IVPD) compared to IVPD with oil alone. This difference amounted to +36.6% and -11.2% for FP and CSb, respectively. Moreover, in the presence of orlistat, the IVPD values for FP and CSb were comparable to those observed without oil. In contrast, for FR and CSa, the IVPD in the presence of both oil and orlistat did not significantly differ from the IVPD with oil alone, resulting in a decrease of -25% of IVPD for FR and an increase of +30.8% for CSa when comparing the no-oil condition to the condition with both oil and orlistat.

3.4. Lipid hydrolysis

Figure 3 shows the kinetics of lipolysis of rapeseed oil alone (solid lines) or in the presence of different protein ingredients (dash lines).

During gastric digestion, lipolysis of rapeseed oil alone is low, reaching 8.3% at the end of the 120-minute digestion period. This lipolysis is gradual and does not plateau, suggesting continuous lipid hydrolysis throughout the gastric phase. Upon the addition of pancreatic digestive enzymes in the intestinal phase, lipolysis increases rapidly within the first two minutes. The DL of oil rises from 8.3%, at the end of the gastric phase to 41.6% after 2 minutes of intestinal digestion. After 70min of the intestinal phase, the rate of lipolysis still increases but in a lesser extent. By the end of the intestinal phase (240 minutes), the DL of oil alone reaches 81.3%.

The addition of protein solutions has minimal impact on lipid digestion during the gastric phase, with effects depending on the specific protein ingredient. In the presence of CP, FS, CSa, and CSb proteins, there is no significant effect on lipolysis during the gastric phase. The lipid digestion profile in the presence of these ingredients is similar to that of oil alone, characterized by continuous low-level hydrolysis. However, the addition of FP leads to a rapid increase in lipolysis up to 45 minutes (T45), after which a plateau is reached. At T45, the degree of lipolysis in the presence of FP is significantly higher than with oil alone. This difference became non-significant after T45, as lipolysis of the oil alone continues to increase and approaches the level observed with FP, particularly at T80 and T120. A similar trend is observed with the addition of FR protein, where lipolysis reaches a plateau from T80, creating a significant difference between the DL of oil alone and that of oil with FR, although this difference disappears by the end of the gastric phase.

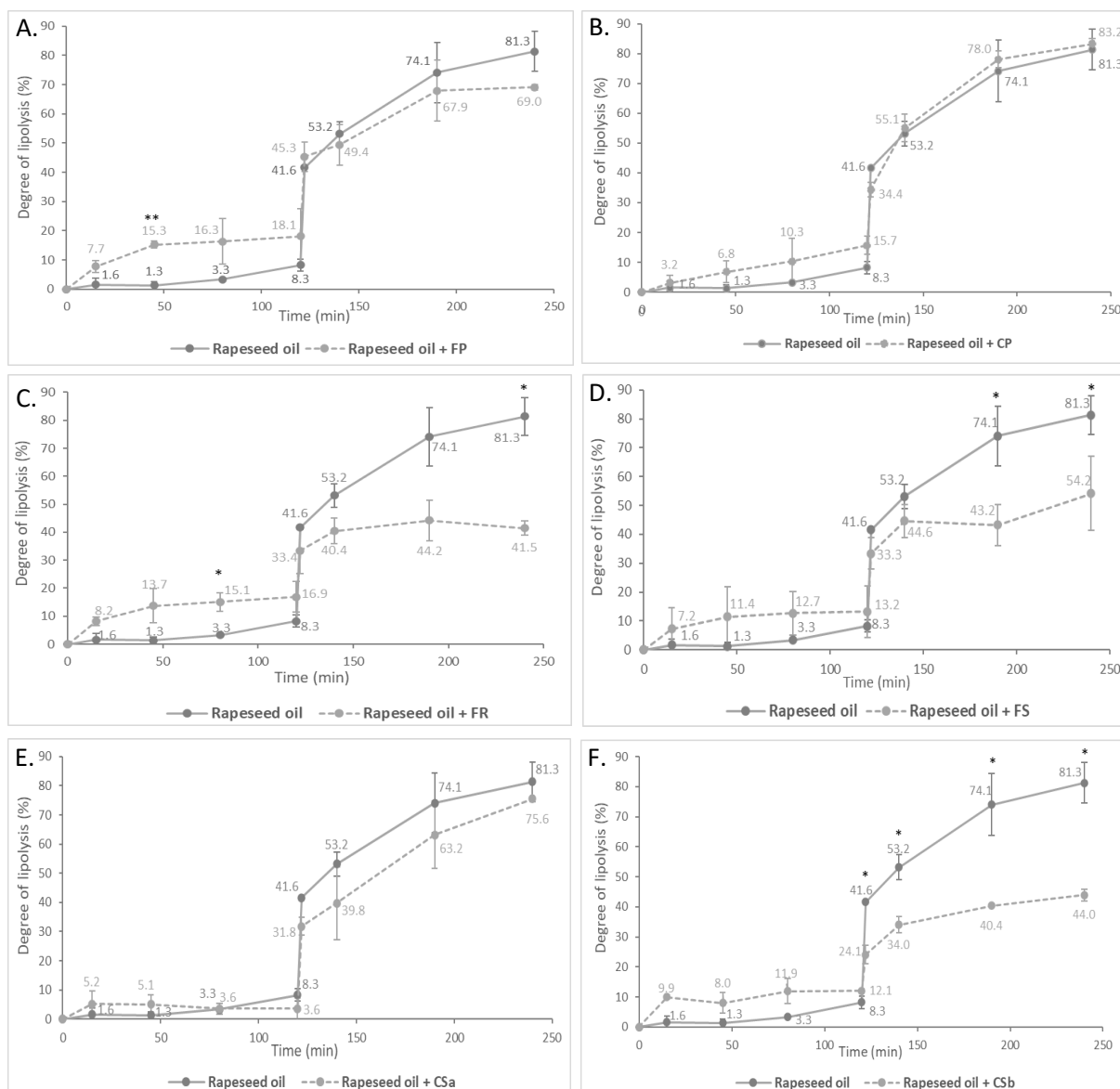


Figure 3. Lipolysis (n=2) during *in vitro* digestion of the rapeseed oil, without plant protein ingredients (solid lines) and with plant protein ingredients (dash lines): flour of pea (FP) (A), concentrate of pea (B), flour of rapeseed (FR) (C), flour of sunflower (FS) (D), concentrate of sunflower A (CSa) (E), concentrate of sunflower B (CSb) (F).

Significant differences between matrices at a given time are indicated by * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (Tukey test).

In the intestinal phase, the presence of protein ingredients impacts the lipolysis kinetics, depending on the composition of the protein ingredient. With FP, CP, or CSa proteins, the intestinal lipolysis profile is similar to that of oil alone. However, with FR, FS, and CSb proteins, the intestinal lipolysis of rapeseed oil is significantly decreased. At the end of the intestinal phase, DL is reduced by -49% with FR, -33% with FS, and -46% with CSb, compared to oil alone. The addition of CSb leads to a significant reduction in DL from beginning of the intestinal phase, while with FS and FR, the lipolysis is reduced only at the end of digestion.

Moreover, lipolysis with FR, FS, and CSb tends to stabilize or progress more slowly after the initial minutes of the intestinal phase.

4. Discussion

Protein and lipid digestion can be modulated by the accessibility of enzymes to cleavage sites and the surface area available for enzyme adsorption [24].

4.1. Impact of Oil Addition on Proteolysis

This article highlights that the addition of lipids in the form of oil can influence protein digestibility, although the effects vary depending on the protein ingredient. These variations can be attributed to several factors: the composition and the structure of the food matrix, the physicochemical properties of the protein ingredients, the protein tridimensional structure and the amino acid profile [12,25]. These factors play a crucial role in how proteins interact with lipids during digestion, particularly by modifying the solubility and conformation of protein and affecting the accessibility of digestive enzymes to proteins.

During the gastric phase, the addition of rapeseed oil in all the protein ingredients did not show an effect on the kinetic and the degree of proteolysis. This suggests that the addition of lipids did not impact the enzymatic activity of pepsin or the accessibility of proteins to this enzyme. These findings align with a previous study showing that the proteolysis of a pea protein isolate during the gastric phase was not significantly different when the proteins were in an aqueous solution without lipids or in the presence of oil and soy lecithins [13]. One possible explanation lies in the physical behavior of lipids and proteins at gastric pH. In fact, all the proteins studied (sunflower, pea, and rapeseed) have shown low solubility at acidic pH in the literature, suggesting protein aggregation [26–28]. Additionally, acidic pH promotes the coalescence of oil droplets, particularly since, in our study, lipids were added in the form of oil—a liquid that, in the absence of surfactants, tends to float on top of the aqueous contents due to its lower density compared to water [29]. Consequently, the potential aggregated form of the dietary proteins at gastric pH would limit interactions between lipids and proteins, which could explain why oil addition had no notable effect on gastric protein digestion. However, if the lipids were instead present in emulsified form, then proteins could adsorb onto the surface of lipid droplets, potentially affecting protein digestibility, as reported in the literature [30,31]. For example, Sams et al., found that the gastric digestion of β -casein was

slower in a rapeseed oil emulsion than in solution, with N-terminal sequencing of peptides indicating that lipids interacted with β -casein, thus altering its cleavage by pepsin [30].

In the intestinal phase, the addition of oil influenced protein digestion kinetics differently depending on the nature of protein ingredient. Across the different flour matrices (FP, FR, FS), the general trend shows that adding lipids either reduces or does not impact proteolysis. Interestingly, this effect could depend on the flour's intrinsic lipid content and composition. Indeed, pea flour, which has a much lower lipid concentration than oilseed flour, exhibited reduced proteolysis upon oil addition, whereas the oilseed flours with higher lipid content are not impacted or only at the end of the digestion. Additionally, starch and fiber content across these matrices may also contribute, as interaction among starch, protein, fiber and lipid can affect enzyme accessibility and, thus digestion efficiency [10].

For pea flour specifically, the addition of oil had a significant effect on protein digestion, leading to reduced digestibility after the first 20 minutes of the intestinal phase. During the first two minutes, no notable difference was observed between the conditions with or without oil, suggesting that the oil's effect gradually manifests throughout the intestinal digestion. This effect seems related to the fatty acids released during lipid hydrolysis, which interfere with protein hydrolysis. This hypothesis is supported by the use of orlistat, an inhibitor of gastric and pancreatic lipase, which blocks the release of lipolysis products composed of FFAs and MAG. The addition of orlistat when CP is mixed with rapeseed oil restored the IVPD to a level comparable to that observed without oil, supporting the hypothesis that for pea flour, released FFAs and MAG disrupt protein hydrolysis. Literature suggests that MAGs and FFAs may serve as "bridges" between proteins and starch through electrostatic interactions [32], forming protein-starch-FFA complexes. It can be hypothesized that such complexes form an intricate network that restricts the accessibility of digestive enzymes, such as the proteases. Such phenomenon explains the resistance to hydrolysis previously observed for starch digestibility [10]. Therefore, the inhibition of FFA release by orlistat, would prevent the formation of the protein-starch-FFA complexes.

For rapeseed flour, the addition of oil didn't disturb the protein digestion, except at the end of the intestinal phase, revealing a delayed inhibitory effect on protein digestion. While protein digestion tends to increase at the end of the intestinal phase without oil, this progression is significantly inhibited in the presence of oil. As rapeseed flour was rich in lipids, especially TAG, FFA and MAG, it can be asked if this hydrophobic environment of the proteins

didn't hide the effect of oil addition on proteolysis. Indeed, it has been observed in a study that the presence of lipids in an oilseed matrix can negatively impacts protein digestibility and that total oil extraction can improve proteolysis [33]. It was then supposed that intrinsic lipids may form a complex network with proteins, limiting protease access to protein cleavage sites. Thus, lipolysis during the intestinal phase would release proteins, thereby enhancing proteolysis [20,34]. This could explain why, without added oil, rapeseed protein digestion spikes toward the end of the intestinal phase. Additionally, inhibition of lipolysis by orlistat in the presence of oil did not affect proteolysis, consistent with the hypothesis that in the case of protein ingredients rich in lipids, the addition of oil does not interfere with the proteolysis.

This hypothesis could also apply to sunflower flour, given the similarity in lipid content across both oilseed flours. However, in sunflower flour, protein hydrolysis does not progress at the end of the intestinal phase, suggesting that some proteins remain trapped even without oil addition. This could be due to higher fiber content in sunflower flour, compared to the rapeseed flour. Studies have shown that protein digestibility decreases with increased dietary fiber content [35]. This effect can be explained by the fibers increasing the viscosity of the digestive medium and interacting with proteins, thereby limiting enzyme access [36]. Consequently, oil addition does not significantly influence proteolysis in sunflower flour, as proteins may remain trapped within a fibrous and lipid-rich network, whether from intrinsic or added lipids.

In the case of pea protein concentrate, where starch content has been significantly reduced, the addition of oil did not significantly affect protein digestibility. This difference could be due to the lack or minimal formation of protein-starch-FFA complexes, given the substantial reduction in starch content in pea protein concentrate compared to pea flour (Table 2). Furthermore, in the study by Guevara-Zambrano et al., 2022, the presence of lipids in emulsified form in a shaker had no significant effect on the digestion of pea protein isolate compared to a protein solution [13]. These findings, consistent with our own results, suggest that the hydrolysis of pea proteins in a low-starch food matrix (such as a protein concentrate or isolate) is not affected by the presence of lipids, whether in oil or emulsion form.

When ingested, fats are subjected to the mechanical action of the stomach and small intestine, where they are emulsified into small droplets. In this environment, food proteins, which are amphiphilic molecules, can interact with lipids via hydrophobic interactions [11]. This interaction enables proteins to unfold on the surface of lipid droplets, can allow better

access to digestive enzymes and, consequently, more efficient protein hydrolysis [12]. Additionally, the hydrophobic interactions between lipids and proteins may reduce protein aggregation, further enhancing digestibility [12]. These effects were observed in the study by Ding et al., where the presence of lipids in casein and soy-based diets, compared to pork and chicken proteins, led to the formation of an emulsion, with smaller, more dispersed particles, which facilitated protein hydrolysis [12]. We hypothesize that a similar phenomenon could occur in the two sunflower concentrates used in our study. Indeed, literature notes that sunflower proteins have good emulsifying capacity at pH 7, and that heating, by increasing protein hydrophobicity, further improves their emulsifying ability [37]. For the sunflower concentrates, some proteins may have been denatured during the oil extraction process, potentially enhancing their capacity to emulsify lipids. This could explain why the addition of oil promoted protein hydrolysis from the beginning of the intestinal phase for these both sunflower concentrates. In contrast, the sunflower flour and pea concentrate, whose addition of oil did not impact the digestibility of the proteins, underwent different processing methods, involving only cold extraction and grinding, and air classification and grinding, respectively. These processes can preserve the protein native structure, limiting the exposure of hydrophobic groups and thereby reducing interactions with lipids. Additionally, our hypothesis for sunflower and rapeseed flour, based on the formation of a network between proteins and intrinsic lipids that create a physical barrier against digestive enzymes, suggests that intrinsic lipids (naturally present) and extrinsic lipids (added as oil) interact differently with proteins, resulting in distinct effects on protein digestibility.

4.2. Impact of Protein Addition on Lipolysis

The study of the effect of various protein ingredients on lipid lipolysis highlights variable impacts depending on the nature of the protein ingredient, with differing influences during the gastric and intestinal phases. This modulation can be explained by several factors, including the composition of food matrices and the complex interactions between proteins, lipids, such as PLs, and other components such as starch [13,38,39]. These interactions directly influence the efficiency of lipolysis by altering the lipid environment and the properties of the lipid-water interface.

In the gastric phase, lipid digestion from oil alone followed a continuous but relatively slow kinetic, without reaching a plateau. This phenomenon can be explained by the absence

of other macronutrients or natural emulsifiers in the oil, such as PLs, proteins, and polysaccharides, which play a crucial role in lipid dispersion by facilitating their emulsification. The literature indicates that the lack of emulsifiers limits the action of lipases, leading to low lipid hydrolysis. Indeed, among various lipid-rich foods, oil exhibited the lowest extent of lipolysis [40]. Un-emulsified lipids float on the surface of the gastric contents due to their low density, limiting contact with digestive enzymes and thus their hydrolysis [29,41,42]. The addition of protein ingredients did not significantly modify lipolysis in most cases, except for rapeseed and pea flours, which showed transient acceleration of digestion at the start of the gastric phase before stabilizing. This observation could be linked to the high PL content in these matrices, known for their emulsifying properties, which enhance lipase action by increasing the contact surface between lipids and digestive enzymes. This mechanism has been confirmed in previous studies, which showed that PLs in protein-stabilized emulsions improve lipolysis by preventing lipid droplet coalescence and flocculation [43]. However, the accumulation of free fatty acids at the lipid interface gradually inhibits gastric lipase activity, which would explain the slowdown of lipolysis and the plateau until the end of gastric digestion after the initial acceleration phase [41].

During the intestinal phase, oil digestion alone followed a rapid initial kinetic before gradually slowing down. This behavior reflects the effective action of pancreatic lipases, supported by bile acids that enhance lipid emulsification, thereby facilitating their hydrolysis [40]. The addition of protein ingredients, however, led to differentiated effects on intestinal lipolysis. The two pea-based ingredients and sunflower concentrate A did not significantly affect lipolysis compared to oil alone. However, the high starch content of pea flour (48 g/100 g of ingredient) could have been expected to reduce lipolysis, in line with data from the literature suggesting that high starch concentrations (>30 g/100 g) can slow down lipid digestion in low-fat matrices by forming a barrier around lipid droplets and increasing the viscosity of the digestive medium [40]. We can hypothesize that this effect was not observed in our study because the oil and starch were not incorporated within the same food but added separately, which may have limited their interactions. On the other hand, the oilseed flours (rapeseed, sunflower) and sunflower concentrate B significantly reduced intestinal lipolysis compared to oil alone. This effect could be attributed to the particle size of the protein ingredients. Indeed, particle size plays a key role in the functional properties of ingredients, influencing their ability to stabilize emulsions, hydrate, and dissolve [44,45]. In this context, a correlation (p -value=0.04, $R^2=0.83$) was observed between the proportion of particles smaller

than 150 nm and the difference in DL between oil alone and oil in the presence of protein ingredients (data not shown). Larger particles might create steric hindrance, preventing the effective adsorption of bile salts and lipases to the surface of lipids, thus slowing down their hydrolysis. Furthermore, protein solubility also plays a crucial role. Poorly soluble, more hydrophobic proteins can interact with bile acids through hydrophobic interactions, thereby preventing their action on lipids [39]. In this study, ingredients such as sunflower flour, rapeseed flour, and sunflower concentrate B exhibited low water solubility (data not shown), supporting the hypothesis that proteins bound to bile acids, explaining the negative effect of these three protein ingredients on lipolysis.

This study sheds light on the interplay between oil and protein ingredients in influencing proteolysis and lipolysis, emphasizing the critical role of protein matrix composition and physical properties in modulating lipid and protein digestibility. Specifically, the addition of lipids in the form of oil was found to impact proteolysis either positively or negatively, depending on the protein matrix composition. Based on our findings and previous literature, we hypothesize that adding oil to starch-rich or lipid-dense matrices reduces proteolysis. Conversely, in matrices with partially denatured proteins, the oil could adsorb into the surface of lipid droplets, promoting protein unfolding and thereby enhancing proteolysis. However, adding protein ingredients generally decreased or did not impact lipid digestion. Notably, protein ingredients with larger particle sizes and low solubility tended to reduce the lipolysis of rapeseed oil. Future research should delve deeper into the complex interactions between lipids and protein ingredients during digestion, employing techniques such as confocal microscopy to visualize nutrient dispersion and interactions within food matrices throughout digestion. Additional factors, including protein structure, physicochemical properties, and rheological characteristics, have been shown to affect protein digestibility. Thus, to build on our findings and better understand how plant protein matrices influence protein and lipid digestion, future studies should incorporate these parameters. With these insights, food formulations combining proteins and lipids, particularly health-beneficial omega-3 PUFAs, could be developed for health-oriented food products.

Acknowledgments

This article did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We thank the ANRT for funding Lina Toutirais's PhD grant. The authors would like to thank Improve for their expertise in the characterization of plant proteins and for the particle size distribution analysis.

Conflicts of interest

The author declares no conflict of interest.

Author Contributions

Lina Toutirais: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – Original Draft, Writing – Review and Editing, Visualization; **Stephane Walrand:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing – Review and Editing; **Leslie Couedelo:** Conceptualization, Methodology; **Cécile Joseph:** Methodology, Validation; **Carole Vaysse:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing – Review and Editing.

References

1. Capuano E, Janssen AEM. Food Matrix and Macronutrient Digestion. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2021 Mar 25;12(Volume 12, 2021):193–212.
2. Singh H, Ye A, Ferrua MJ. Aspects of food structures in the digestive tract. *Current Opinion in Food Science*. 2015 Jun 1;3:85–93.
3. Dangin M, Boirie Y, Guillet C, Beaufrère B. Influence of the Protein Digestion Rate on Protein Turnover in Young and Elderly Subjects. *The Journal of Nutrition*. 2002 Oct 1;132(10):3228S-3233S.
4. Barbé F, Ménard O, Gouar YL, Buffière C, Famelart MH, Laroche B, et al. Acid and rennet gels exhibit strong differences in the kinetics of milk protein digestion and amino acid bioavailability. *Food Chemistry*. 2014 Jan 15;143:1–8.
5. Terres Univia [Internet]. [cited 2024 Feb 11]. Available from: <https://www.terresunivia.fr/>
6. Toutirais L, Walrand S, Vaysse C. Are oilseeds a new alternative protein source for human nutrition? *Food Funct* [Internet]. 2024 Feb 5 [cited 2024 Feb 29]; Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/fo/d3fo05370a>
7. Hiolle M, Lechevalier V, Flourey J, Boulier-Monthéan N, Prioul C, Dupont D, et al. *In vitro* digestion of complex foods: How microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility. *Food Research International*. 2020 Feb 1;128:108817.
8. Chao C, Liang S, Zhang Z, Gidley MJ, Liu Y, Wang S. New Insight into the Effects of Endogenous Protein and Lipids on the Enzymatic Digestion of Starch in Sorghum Flour. *Foods*. 2024 Jan;13(5):663.
9. Ye J, Hu X, Luo S, McClements DJ, Liang L, Liu C. Effect of endogenous proteins and lipids on starch digestibility in rice flour. *Food Research International*. 2018 Apr 1;106:404–9.
10. Lin L, Yang H, Chi C, Ma X. Effect of protein types on structure and digestibility of starch-protein-lipids complexes. *LWT*. 2020 Dec 1;134:110175.
11. Zhou L, Yang Y, Wang J, Wei S, Li S. Effects of low fat addition on chicken myofibrillar protein gelation properties. *Food Hydrocolloids*. 2019 May 1;90:126–31.
12. Ding M, Huang Z, Jin Z, Zhou C, Wu J, Zhao D, et al. The effect of fat content in food matrix on the structure, rheological properties and digestive properties of protein. *Food Hydrocolloids*. 2022 May 1;126:107464.
13. Guevara-Zambrano JM, Verkempinck SHE, Hernandez-Ruiz L, Infantes-Garcia MR, Hendrickx ME, Van Loey AM, et al. Digestion kinetics of lipids and proteins in plant-based shakes: Impact of processing conditions and resulting structural properties. *Food Chemistry*. 2022 Jul 15;382:132306.
14. Chen Q, Zhang J, Zhang Y, Wang Q. Effect of fatty acid saturation degree on the rheological properties of pea protein and its high-moisture extruded product quality. *Food Chemistry*. 2022 Oct 1;390:133139.
15. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*. 2019 Apr;14(4):991–1014.
16. Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*. 2012 Nov 1;30(11):591–600.
17. Stilling R, Treue S. The 4Rs in animal-based neuroscience research: Refinement, Reduction, Replacement, Responsibility. 2021;

18. Ariëns RMC, Bastiaan-Net S, van de Berg-Somhorst DBPM, El Bachrioui K, Boudewijn A, van den Dool RTM, et al. Comparing nutritional and digestibility aspects of sustainable proteins using the INFOGEST digestion protocol. *Journal of Functional Foods*. 2021 Dec 1;87:104748.
19. Carrière F, Renou C, Ransac S, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, et al. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001 Jul;281(1):G16–28.
20. Zahir M, Fogliano V, Capuano E. Food matrix and processing modulate *in vitro* protein digestibility in soybeans. *Food Funct*. 2018 Dec 13;9(12):6326–36.
21. Kopf-Bolanz KA, Schwander F, Gijs M, Vergères G, Portmann R, Egger L. Validation of an *In vitro* Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in Humans^{1–23}. *The Journal of Nutrition*. 2012 Feb 1;142(2):245–50.
22. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*. 1957 May 1;226(1):497–509.
23. Mariotti F, Tomé D, Mirand PP. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008 Jan 31;48(2):177–84.
24. Mackie A, Macierzanka A. Colloidal aspects of protein digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2010 Apr 1;15(1):102–8.
25. Smith ME, Morton DG. *The Digestive System: Systems of the Body Series*. Elsevier Health Sciences; 2011. 226 p.
26. González-Pérez S, Vereijken JM. Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007;87(12):2173–91.
27. Wanasundara JPD. Proteins of Brassicaceae Oilseeds and their Potential as a Plant Protein Source. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011 Aug 1;51(7):635–77.
28. Day L, Cakebread JA, Loveday SM. Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*. 2022 Jan 1;119:428–42.
29. van Aken GA. Relating Food Emulsion Structure and Composition to the Way It Is Processed in the Gastrointestinal Tract and Physiological Responses: What Are the Opportunities? *Food Biophysics*. 2010 Dec 1;5(4):258–83.
30. Sams L, Amara S, Mansuelle P, Puppo R, Lebrun R, Paume J, et al. Characterization of pepsin from rabbit gastric extract, its action on β -casein and the effects of lipids on proteolysis. *Food Funct*. 2018 Nov 14;9(11):5975–88.
31. Macierzanka A, Sancho AI, Mills ENC, Rigby NM, Mackie AR. Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin. *Soft Matter*. 2009 Jan 27;5(3):538–50.
32. Mondal D, Awana M, Mandal S, Pandit K, Singh A, Syeunda CO, et al. Functional foods with a tailored glycemic response based on food matrix and its interactions: Can it be a reality? *Food Chemistry: X*. 2024 Apr 9;101358.
33. Marambe HK, Shand PJ, Wanasundara JPD. *In vitro* digestibility of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein: effect of seed mucilage, oil and thermal processing. *International Journal of Food Science & Technology*. 2013;48(3):628–35.
34. Zhou H, Hu Y, Tan Y, Zhang Z, McClements DJ. Digestibility and gastrointestinal fate of meat versus plant-based meat analogs: An *in vitro* comparison. *Food Chemistry*. 2021 Dec 1;364:130439.

35. Lin Y, Chen K, Tu D, Yu X, Dai Z, Shen Q. Characterization of dietary fiber from wheat bran (*Triticum aestivum* L.) and its effect on the digestion of surimi protein. *LWT*. 2019 Mar 1;102:106–12.
36. Kaur L, Mao B, Beniwal AS, Abhilasha, Kaur R, Chian FM, et al. Alternative proteins vs animal proteins: The influence of structure and processing on their gastro-small intestinal digestion. *Trends in Food Science & Technology*. 2022 Apr 1;122:275–86.
37. Kaur R, Ghoshal G. Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2022 Aug 1;306:102725.
38. Wang X, Ye A, Singh H. Structural and physicochemical changes in almond milk during *in vitro* gastric digestion: impact on the delivery of protein and lipids. *Food Funct*. 2020 May 26;11(5):4314–26.
39. Ding M, Huang Z, Huang Z, Zhao Z, Zhao D, Shan K, et al. Proteins from different sources in a high-fat food matrix influence lipid hydrolysis through bolus coalescence and interactions with bile salts. *Food Hydrocolloids*. 2023 Apr 3;108748.
40. Calvo-Lerma J, Fornés-Ferrer V, Heredia A, Andrés A. *In vitro* Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components. *Journal of Food Science*. 2018;83(10):2629–37.
41. Lundin L, Golding M, Wooster TJ. Understanding food structure and function in developing food for appetite control. *Nutrition & Dietetics*. 2008;65(s3):S79–85.
42. Capuano E, Pellegrini N, Ntone E, Nikiforidis CV. *In vitro* lipid digestion in raw and roasted hazelnut particles and oil bodies. *Food Funct*. 2018 Apr 25;9(4):2508–16.
43. Ahn N, Imm JY. Effect of phospholipid matrix on emulsion stability, microstructure, proteolysis, and *in vitro* digestibility in model infant formula emulsion. *Food Research International*. 2023 Jan 1;163:112218.
44. He X, Chen J, He X, Feng Z, Li C, Liu W, et al. Industry-scale microfluidization as a potential technique to improve solubility and modify structure of pea protein. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2021 Jan 1;67:102582.
45. Bojanić N, Vidosavljević S, Fišteš A, Šereš Z, Fodor E, Maravić N. Emulsion stabilising capacity of sunflower meal depending on fraction protein content and particle size. *International Journal of Food Science & Technology*. 2024;59(1):333–42.

A retenir de l'article n°2

.....

Cette étude a apporté des éclairages sur l'impact de la composition des matrices alimentaires sur le taux et la cinétique de l'hydrolyse des protéines et des lipides. Il en ressort que l'ajout de lipides, sous forme d'huile, n'influence pas la protéolyse pendant la phase gastrique mais influence la digestion intestinale des protéines de manière différenciée selon la nature de l'ingrédient protéique. Plusieurs facteurs peuvent entrer en jeu, notamment la composition de la matrice, les propriétés physico-chimiques des protéines, ainsi que les interactions complexes entre protéines, lipides et autres nutriments (amidon, fibres). Concernant la lipolyse, l'ajout d'ingrédients protéiques peut également moduler la digestion des lipides, mais dépend probablement de la taille des particules et de la teneur en phospholipides des ingrédients protéiques, ainsi que de la solubilité et l'hydrophobicité des protéines, influençant la capacité d'adsorption et d'hydrolyse des lipases. Ces résultats soulignent l'importance des interactions entre les nutriments dans la modulation de la digestibilité des lipides et des protéines, ouvrant ainsi des perspectives pour l'optimisation des formulations alimentaires visant à améliorer la biodisponibilité des nutriments.

ARTICLE N°3



ARTICLE 3

Qualité nutritionnelle et effets des protéines de tournesol et de pois sur le métabolisme protéique musculaire chez les rats âgés

Dans les études précédentes, nous avons montré que les protéines issues d'oléagineux présentaient une bonne digestibilité *in vitro* par rapport aux protéines de pois. De plus, il est bien établi qu'un apport adéquat en protéines de haute qualité, associé aux AGPI w3, peut avoir des effets bénéfiques dans la prévention de la sarcopénie associée au vieillissement. Cette étude vise dans un premier temps à évaluer la qualité nutritionnelle des protéines de concentrat de tournesol et d'un mélange tournesol-pois (formulé pour répondre aux besoins en AA des humains et des rats), en comparaison avec des protéines de pois et de caséine chez des rats âgés. Deuxièmement, l'accent est mis sur la capacité de ces protéines à maintenir la masse musculaire et à soutenir le métabolisme protéique. Pour cela, la composition corporelle, les indices de qualité protéique, la synthèse et la dégradation des protéines musculaires, ainsi que le profil lipidique intramusculaire ont été mesurés après 8 semaines de consommation de ces protéines. L'impact d'un apport en ALA a également été étudié sur ces paramètres. Ainsi, cette recherche a pour but d'approfondir les connaissances sur l'évaluation des protéines végétales, en particulier les protéines de tournesol, pour favoriser un vieillissement en bonne santé.

Les résultats de ces expériences sont présentés sous la forme d'un article à soumettre au journal *The Journal of nutrition*

Nutritional quality and effects of sunflower and pea proteins on muscle protein metabolism in old rats

Lina Toutirais^{ab*}, Jerome Salles^b, Christophe Giraudet^b, Marie Laure Collin^b, Ikram Chamekh^a, Corentin Bouju^a, Helène Abrous^a, Marine Gueugneau^b, Olivier Le Bacquer^b, Véronique Patrac^b, Jean-Paul Rigaudière^b, Carole Vaysse^a, Stephane Walrand^{b,c}

^aITERG Sciences, Department of Nutrition Sciences, 33610 Canéjan, France.

^bUniversité Clermont Auvergne, INRAE, Unité de Nutrition Humaine, 63000 Clermont-Ferrand, France.

^cClinical Nutrition Department, CHU, 63000 Clermont-Ferrand, France.

Abstract:

The growing interest in plant proteins as sustainable and healthy food sources underscores the importance of addressing environmental and public health concerns. With the global population on the rise, optimizing protein sources has become essential to meet increasing protein demands. In this context, sunflower proteins hold potential dietary interest for aging populations, which require a high-quality nutritional protein intake. This study aims to evaluate the digestibility and nutritional efficiency of sunflower proteins, as well as a sunflower-pea protein blend, compared to casein and pea proteins in aged rats. Casein showed higher digestibility than plant-based proteins like pea and sunflower. However, nitrogen balance, net protein utilization, and biological value were comparable across all sources, resulting in similar effects on body weight as well as on markers of muscle protein synthesis and degradation. These findings reveal that sunflower protein concentrates may have an anabolic effect comparable to that of pea and casein proteins in older rats. Furthermore, a diet with a high ALA/LA ratio did not significantly influence protein metabolism or plasma markers, though it did increase omega-3 content in intramuscular lipids. In conclusion, these results are promising for the use of sunflower proteins in older individuals, but additional studies in humans are necessary before making definitive recommendations.

1. Introduction

The growing interest in plant proteins as healthy and sustainable food sources reflects an increasing awareness of environmental and public health issues. With the global population steadily rising, optimizing protein sources has become a crucial part of efforts to cover the people's protein needs. In this context, harnessing underutilized natural resources such as by-products from the oil industry could offer a promising solution. Oilseeds, the primary sources of plant oil, are extracted by processes that leave behind by-products rich in proteins and fibers [1]. These by-products are typically used as animal feed but could provide valuable and sustainable protein with benefits for human diet.

Sunflower is one of the most widely-produced oilseed crops globally. Sunflower seeds contain between 10% and 27% crude protein, rising to 53%–63% in sunflower meal after oil extraction and seed dehulling [2]. Several studies have examined the digestibility and bioavailability of these proteins in rats [3], pigs [4,5,6], and humans [7]. However, to our knowledge, no study has investigated the potential value of these proteins in the context of aging-related diseases, such as sarcopenia.

Sarcopenia is characterized by a progressive loss of skeletal muscle mass and function that typically affects older adults. One of the main contributors to sarcopenia is anabolic resistance, a reduced muscle response to anabolic stimuli that occurs with aging. To counteract this resistance and effectively stimulate muscle protein synthesis, the body requires a higher protein intake [8] to reach a recommended 1 g of protein per kg of body weight per day for older adults [9]. Another key factor in sarcopenia is the digestibility of dietary proteins and the postprandial bioavailability of indispensable amino acids (IAAs), which are necessary to stimulate muscle protein synthesis. Animal proteins generally provide better postprandial availability of IAAs and consequently a higher rate of muscle protein synthesis compared to plant proteins [10]. However, studies suggest that plant proteins can have long-term benefits. For instance, prolonged consumption of plant-based proteins has been associated with higher muscle mass in elderly Chinese men and women [11,12]. This effectiveness of plant-based proteins could be attributed not only to the proteins themselves but also to their associated phytonutrients and fibers, which have demonstrated beneficial effects on muscle mass and function [13,14]. Furthermore, a high intake of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), particularly omega-3s, has shown anabolic effects in older adults. For example, supplementation with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid led to an

increase in muscle protein synthesis rates in response to amino acids (AAs) and insulin [15]. In addition, consumption of PUFAs such as alpha-linolenic acid (ALA) has shown anti-inflammatory effects [16], helping to reduce aging-related inflammation and the development of sarcopenia [17].

In this context, sunflower protein concentrates, obtained after oil extraction and subsequent dry fractionation, could offer several advantages. They have a high protein content (55%) and a high fiber content (25%), as well as providing valuable phytonutrients such as phenolic compounds and residual PUFAs [18]. Consumption of sunflower protein concentrates could therefore help maintain muscle mass and slow the progression of sarcopenia associated with aging. However, sunflower protein is deficient in lysine, an IAA that is necessary for protein synthesis in humans [2]. This limitation can be addressed by combining sunflower proteins with a legume such as pea that is rich in lysine but deficient in sulfur-containing amino acids [19]. This approach would achieve a balanced IAA profile that meets World Health Organization (WHO) recommendations for human beings [20].

To address this issue, this study set out to assess the nutritional quality of sunflower proteins and a sunflower–pea blend compared to casein and pea proteins in old rats. Nutritional quality of these proteins was assessed by focusing on protein digestibility and AA bioavailability and their effectiveness in maintaining muscle mass and protein metabolism in old rats. This study also analyzed the effects of ALA intake on these parameters and muscle lipid profiles in order to better understand the potential role of ALA in preventing sarcopenia.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design

2.1.1. Ethical considerations

This animal study was conducted in accordance with European guidelines for the care and use of laboratory animals, and all procedures were approved by the Auvergne-region institutional animal care and use committee (authorization number: APAFIS #40317-20230111110424741). The animals were housed at the INRAE's Human Nutrition Research animal facility (approval number: E6334515).

2.1.2. Diets

Pea protein concentrate was purchased from Vestkorn (Tau, Norway). Sunflower protein concentrate was purchased from Sunbloom Proteins GmbH (Munich, Germany). Palm oil, sunflower oil, rapeseed oil, and flax oil were purchased from METRO (Gradignan, France). All other ingredients, including defatted casein, cellulose, corn starch, vitamins, and minerals, were purchased from SAFE® (Augy, France).

Table 1. Composition of the experimental diets.

Diet composition (wt%)	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3
Proteins					
Casein	14.1				
Pea		14.4		6.4	6.4
Sunflower			14.2	7.6	7.7
Lipids	6.1	6.0	6.0	5.9	5.9
Starch	67.1	67.3	67.3	67.6	67.6
Cellulose/fiber	8.2	7.9	8.0	7.9	8.0
Vitamins	3.6	3.4	3.5	3.5	3.5
Minerals	1	1	1	1	1
Energy (Kcal/100g)	412	412	412	412	412

Cas, casein; Sun, sunflower; Mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 fatty acids.

The diets were prepared at the ‘CRT Agir’ food research facility (Pessac, France) and compositionally formulated to ensure that all diets with different protein sources were iso-nitrogenous (equal protein content), iso-lipidic (equal fat content), and iso-caloric (Table 1). The amino acid (AA) content of the diets was analyzed by Eurofins Laboratories using ISO 13903:2005 and EU 152/2009 standard method. To determine the free fatty acid (FFA) profile of the diets (Table 2), lipids were extracted using the adapted Folch method [21]. The fatty acids were methylated by the transmethylation method [22], and an internal standard (triacylglycerol, TAG, 17:0 at 10%) was added. The fatty acids were then analyzed by gas chromatography (TRACE GC, Thermo Scientific, Waltham, MA), coupled with a flame ionization detector and split injector. A fused-silica capillary column (BPX 70, 60 m × 0.25 mm

i.d., 0.25 μm film; SGE, France) was used with hydrogen as carrier gas (inlet pressure: 120 kPa). Gas chromatography peaks were integrated using Chromquest software (ThermoFinnigan, Courtaboeuf, France).

Table 2. Lipid composition of the experimental diets.

Lipid composition (g/100 g lipid)	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3
16: 0	10.6	10.1	9.8	10.4	9.8
18: 0	3.7	3.4	3.5	3.5	3.6
18: 1 cis	33.5	32.7	32.9	33.4	33.3
18: 2 cis	46.3	47.7	48.1	46.7	36.7
18: 3 cis	3.2	3.7	3.3	3.3	13.7
SFA	16	15	15	15	15
MUFA	35	34	34	35	35
PUFA	50	52	52	50	51
PUFA w3	3	4	3	3	14
w6/w3	14.3	12.9	14.5	14.2	2.7

Cas, casein; Sun, sunflower; Mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 FA; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; w3, omega-3 fatty acid; w6/w3, ratio of omega-6-to-omega 3 fatty acids.

2.1.3. Animals

Sixty old male Wistar rats (age: 22 to 23 months) with an average weight of 530g were obtained from Janvier Labs (Le Genest-St-Isle, France). Upon arrival, the rats were housed in individual cages with regulated temperature and light cycles and had free access to standard chow (A04, SAFE, Augy, France) and water.

After an 8-day acclimatization period with a standard chow, the rats were randomly divided into five treatment groups based on their body weight, lean mass and fat mass assessed using EchoMRI (Echo Medical Systems LLC, Houston, TX). The animals were assigned (n=12 per group) to either a standard diet with casein (Cas group) or one of four experimental diets: pea protein (Pea group), sunflower protein (Sun group), a pea–sunflower protein mix

(Mix group), or a pea–sunflower mix enriched with α -linolenic acid (Mw3 group) (Tables 1 and 2). The nutritional intervention lasted for 8 weeks. In the last four days, the rats were housed in metabolic cages to facilitate urine and fecal collection for metabolic analyses. One rat died shortly after arrival, and a further 11 rats either died or were euthanized over the course of the experiment due to tumor development or other health issues requiring euthanasia. At the end of the experiment, there were 7 rats in the Cas group, 11 in the Pea group, 10 in the Sun group, 11 in the Mix group, and 9 in the Mw3 group.

Food intake was measured weekly. At the end of the experiment, the rats were fasted overnight then anesthetized and sacrificed by exsanguination. Subcutaneous and epididymal fat, heart, liver, and various types of skeletal muscle from the legs (*plantaris*, *soleus*, *tibialis anterior*, *gastrocnemius*, and *quadriceps*) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis.

2.2. Body weight and body composition

Body weight was measured weekly throughout the 8-week study. Body composition, including fat mass and lean mass (in grams), was measured at the beginning and the end of the study (*i.e.* after 8 weeks). These body composition parameters were measured on live, non-anesthetized, overnight-fasted animals placed in an EchoMRI system (Echo Medical Systems, Houston, TX).

2.3. Analysis

2.3.1. Measurement of dietary protein quality indexes

During the final week of the experiment, the rats were placed in metabolic cages for the last 4 days. Urine and feces were collected, and the total excreted nitrogen was quantified at the UniLaSalle Institute (Beauvais, France) using the Dumas method. Nitrogen balance (NB), apparent digestibility (AD) and true digestibility (TD) of proteins, net protein utilization (NPU), and biological value (BV) were calculated using the following equations [23]:

$$\text{NB (g)} = \text{NI} - (\text{FN} + \text{UN})$$

$$AD (\%) = \frac{NI - FN}{NI} \times 100$$

$$TD (\%) = \frac{NI - (FN - EFN)}{NI} \times 100$$

$$NPU (\%) = \frac{NI - (FN + UN - EFN - EUN)}{NI} \times 100$$

$$BV (\%) = \frac{NPU}{TD} \times 100$$

where NI is nitrogen intake, FN is fecal nitrogen, UN is urinary nitrogen, EFN is endogenous fecal nitrogen, and EUN is endogenous urinary nitrogen. EFN and EUN excretion were deduced from a group of old rats that were given a nitrogen-free diet during the metabolic cage period.

2.3.2. Intramuscular lipid content

Total lipids from the plantaris muscle were extracted according to the procedure described by Folch et al. [21]. The extraction was performed in chloroform/methanol (2/1, v/v) under stirring, at room temperature. After 1 h, 0.2 volume of KCl (0.8 % in water, w/v) per volume of the extraction mixture was added, and the samples were centrifuged (1050 g, 5 min, 4°C). The chloroform phase containing the total lipids was filtered and evaporated under vacuum. The extracts were then re-dissolved in chloroform, filtered and then dried under nitrogen. Extracted lipids were dissolved in chloroform/ methanol (2/1, v/v) and stored at – 20°C until analysis.

Separation of lipid fractions by thin layer chromatography (TLC) and Fatty acid profile from lipid fractions

Triacylglycerol (TAG), diacylglycerol (DAG), monoacylglycerol (MAG), free fatty acid (FFA) and phospholipids (PL) fractions from Plantaris muscle were separated by TLC (glass plates 20 × 20 cm pre-coated with silica gel 60H) using a solvent mixture composed of

heptane/ diethyl ether/formic acid (55/44/1, v/v/v). After vaporisation of 2,7-dichlorofluorescein and visualisation under UV-light, spots corresponding to TAG, DAG, MAG, FFA and PL were identified by external standards spotted on the plate.

The fatty acid (FA) profile of lipid fractions from plantaris muscle (TAG, DAG, MAG, FFA and PL) were obtained after (trans) methylation procedure of FA.

The resulting fatty acid methyl esters were analysed by GC (TRACE GC, Thermo Scientific) equipped with a flame ionisation detector and a split injector. A fused-silica capillary column (BPX 70, 60 m× 0.25 mm i.d., 0.25 µm film; SGE) was used with hydrogen as a carrier gas. GC peaks were integrated using Chromquest software (Thermo Finnigan). FA were quantified using an internal standard added in each lipid fraction before the (trans)methylation reaction. TAG-17:0, DAG-17:0, MAG-17:0, FFA-17:0 and PL-17:0 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were used for TAG, DAG, MAG, FFA and PL quantification in the plantaris muscle.

2.3.3. Plasma analysis

Blood samples were collected from the abdominal aorta and transferred into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Plasma was immediately prepared and stored at -80°C until further analysis. Fasting plasma concentrations of TAG, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, non-esterified fatty acids (NEFA), glycerol, total protein, albumin, glucose, and the enzymatic activities of aspartate aminotransferase (ASAT) and alanine aminotransferase (ALAT) were measured using a Konelab 20 analyzer (Thermo-Electron Corporation, Waltham, MA). All kits were obtained from DiaSys Diagnostic Systems (Germany) except the glycerol kit which was sourced from Ben S.R.L. (Italy).

2.3.4. Measurement of muscle protein synthesis

Fractional synthesis rates (FSR) of proteins in the plantaris muscle were measured using the flooding dose method. After overnight fasting, each rat received an intravenous injection of L-[1-13C]valine (50% mol excess, 300 µM/100 g; Eurisotop, Saint-Aubin, France) 50 minutes prior to sacrifice. After extraction from 50 mg of plantaris muscle, total proteins were hydrolyzed (6 N HCl, 110°C, 24 h), and the amino acids were derivatized. Enrichment of

L-[1-¹³C]valine in the hydrolyzed protein fraction was measured using gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). Enrichment of L-[1-¹³C]valine in the free amino acid fraction of tissue fluid was measured using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Results were expressed in %/h and calculated according to the following equation:

$$\text{FSR (\%/h)} = \frac{E_i}{E_p \times t} \times 100$$

where E_i is percent atom excess enrichment of L-[1-¹³C]valine derived from protein valine at time t (minus basal enrichment), E_p is average enrichment in the precursor pool (L-[1-¹³C]valine in tissue fluid), and t is incorporation time in hours.

2.3.5. Western Blot analysis

Plantaris muscle (50 mg) was homogenized in a lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM NaPPi, 25 mM β -glycerophosphate, 100 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate, 10% glycerol, 1% Triton X-100) containing a protease inhibitor cocktail (1%). Homogenates were centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was collected, and protein content was determined using a BCA assay kit (BCA-23225, Pierce Biotechnology, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Laemmli buffer and β -mercaptoethanol were added, and the mixture was heated for 5 minutes at 95°C. Denatured proteins (50 μ g) were separated on a 10% polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene transfer membrane. Immunoblots were incubated in blocking buffer and then probed with the following primary antibodies: anti-phospho eukaryotic initiation factor 2- α (Ser51) (P-eIF2- α , 1:1000; #3398, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-total eIF2- α (1:1000; #9722, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-phospho eukaryotic elongation factor 2 (Thr56) (P-eEF2, 1:2000; #2331, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-total eEF2 (1:2000; #2332, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-phosphorylated p70 S6 kinase (Thr389) (P-p70S6K, 1:1000; #9205, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-total p70 S6 kinase (1:1000; #2708, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), anti-phospho p38 MAP kinase (1:5000; #M8177, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri), anti-p38 MAP kinase (1:5000; #M0800, Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri).

After washing with TBS + 0.1% Tween-20, the immunoblots were incubated with a secondary antibody. Luminescent visualization was performed using an ECL Western Blotting substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and an imaging system (Fusion Fx/Solo) (Vilber Lourmat, Collégien, France). Band density was quantified using MultiGaugeV3 software. Activation states were assessed by the ratio of phosphorylated protein to total protein expression. All results were normalized to Ponceau S staining.

2.3.6. Real-time quantitative RT-PCR

To extract total RNA, 50 mg of plantaris muscle was homogenized in Tri-Reagent according to the supplier's instructions (Euromedex, Mundolsheim, France). The quantity of RNA was determined using a Nanodrop LITE spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Then 5 µg of the total RNA was used to synthesize cDNA using SuperScript III reverse transcriptase and a combination of random hexamer and oligo dT primers (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The cDNAs were diluted 1:60 with sterile water and used as a template for PCR analysis. PCR amplification was carried out using an AriaMx™ real-time PCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, California) and ONEGreen® FAST qPCR Premix (2×) (Ozyme, France). The primers used for real-time PCR analysis are listed in Table 3. Cyclophilin-A (Cyp A) was used as housekeeping gene. The data was expressed in arbitrary units (AU).

Table 3. Primer sequences used for the quantitative analysis of gene expression.

Gene name	Forward and reverse primers
MAFbx (Muscle atrophy F-box)	For 5'-AGTGAAGACCGGCTACTGTGGAA-3' Rev 5'-TTGCAAAGCTGCAGGGTGAC-3'
MuRF1 (Muscle RING finger-1)	For 5'-GTGAAGTTGCCCCCTTACAA-3' Rev 5'-TGGAGATGCAATTGCTCAGT-3'
Cyp A (Cyclophilin-A)	For 5'-TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG-3' Rev 5'-CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC-3'

2.4. Statistical analysis

Data was analyzed using XLSTAT (version 2023). The data was tested for normality and homogeneity of variance. For homogeneous data, we conducted one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer post-hoc tests to assess significant differences between groups. For heterogeneous data, we used a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test to assess significant differences between groups. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. The data is expressed as mean \pm SEM.

3. Results

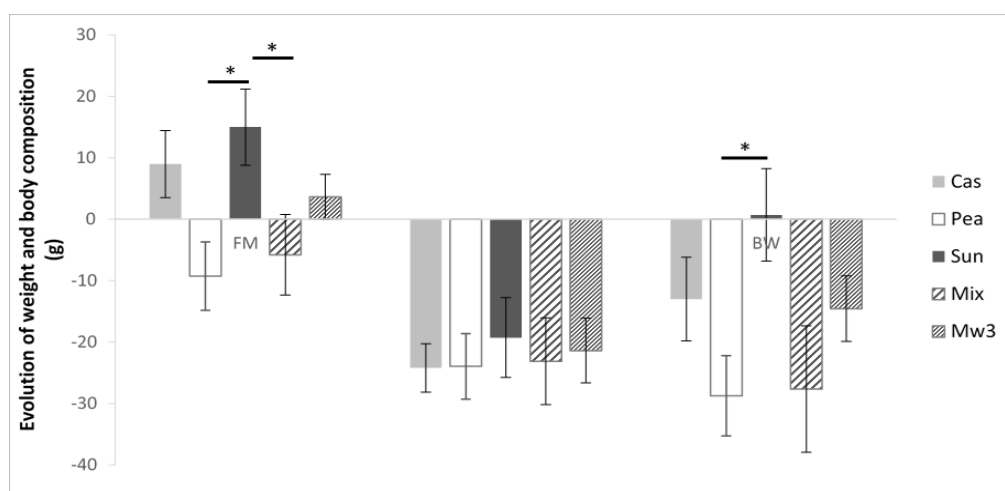
3.1. Evolution of food intake, fat mass, and body weight according to protein source

The food intake of the different groups remained constant throughout the 8-week study, with no significant differences between groups (75.7 \pm 2.6 kcal/day for the Cas group, 87.5 \pm 3.2 kcal/day for the Pea group, 82.0 \pm 2.0 kcal/day for the Sun group, 82.16 \pm 2.1 kcal/day for the Mix group, and 80.12 \pm 2.7 kcal/day for the Mw3 group). This suggests that the observed variations in physiological parameters are not due to differences in the energy consumed but rather to specific effects of diet composition, *i.e.* the protein sources. Rats were evenly distributed across groups based on body weight, fat mass, and lean mass, thus ensuring no significant between-group differences at the start of the diet treatments. At the end of the study, body weight, fat mass, and lean mass were still not statistically different between diets (Table 4). The reduction in lean mass during the 8-week study, likely due to the age effect, was not significantly different between groups. However, changes in fat mass and body weight, measured by the difference in values (in grams) between the start and end of the study, varied significantly according to protein source (Figure 1). Fat mass increased over the 8-week diet in Sun-group rats but decreased in the Pea and Mix groups. This difference led to significant variations in body weight changes between Sun rats and Pea rats, *i.e.* no body weight change in the Sun group but decreased body weight in the other groups, especially the Pea group. In line with these observations, there were no statistically significant between-group differences in tissue weight at the end of the study (Figure 2).

Table 4. Body composition and weight of the rats at the start and end of the study.

	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3
Body weight (g)					
Week 0	518 ± 23	521 ± 20	532 ± 21	528 ± 18	544 ± 19
Week 8	505 ± 26	488 ± 21	533 ± 22	500 ± 23	529 ± 18
Fat mass (g)					
Week 0	79 ± 13	85 ± 10	89 ± 14	84 ± 9	91 ± 11
Week 8	88 ± 17	76 ± 10	104 ± 20	78 ± 12	94 ± 12
Lean mass (g)					
Week 0	404 ± 13	401 ± 15	408 ± 12	407 ± 13	416 ± 11
Week 8	379 ± 10	377 ± 13	389 ± 9	385 ± 16	395 ± 9

Weeks 0 and 8 mark the start and end of the experiment, respectively. Data is expressed as means ± SEM. Cas, casein; Sun, sunflower; mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 FA.

**Figure 1.** Evolution of weight and body composition over the course of the study (difference between the end and start of the study, in g).

Data is expressed as means ± SEM. Cas, casein; Sun, sunflower; Mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 FA; FM, fat mass; LM, lean mass; BW, body weight. *Significant difference at $p < 0.05$ (ANOVA, Tukey).

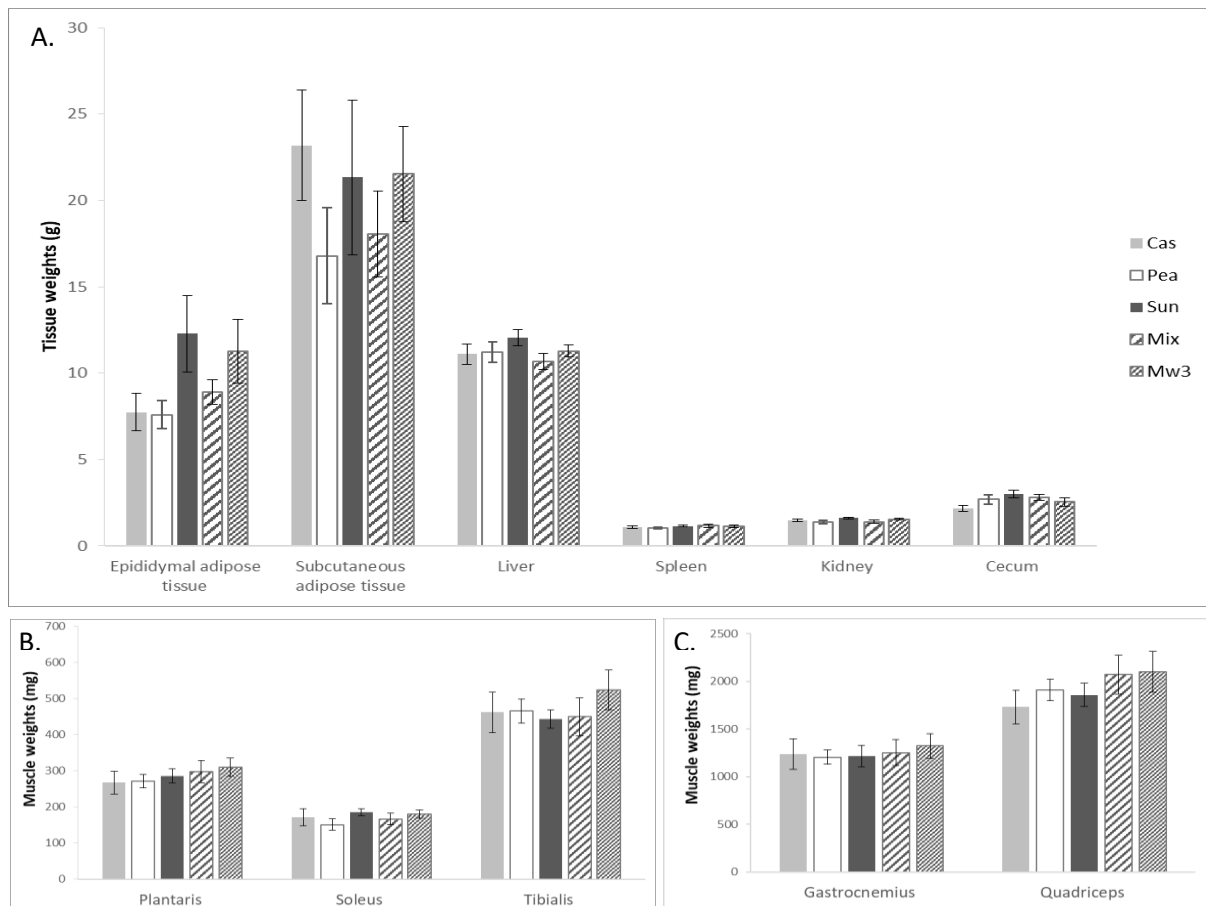


Figure 2. Tissue weights after 8 weeks on the different diets.

Data is expressed as means \pm SEM.

3.2. Assessment of protein quality

Table 5 reports the IAA contents of the proteins in each experimental diet, compared to the estimated requirements (National Research Council, 1995) for a 530g adult rat (weight of the rats in this study). This analysis reveals that casein, sunflower, and mix diets (Mix and Mw3) did not present any limiting AA, whereas the pea-based diet was deficient (*i.e.* only covering 91.4% of rat requirements) in sulfur-containing AA (cysteine and methionine).

Table 6 reports the various protein quality indexes for the different diets. Nitrogen balance, *i.e.* the difference between nitrogen absorbed and nitrogen lost via feces and urine, was similar across the five rat groups. However, protein digestibility indexes showed significant between-group differences. Apparent nitrogen digestibility was approximately 9.4%, 12.9% and 13% higher in the Cas group compared to the Mw3 group ($p < 0.01$), Mix group ($p < 0.001$), and Pea group ($p < 0.01$), respectively. The consumption of sunflower proteins did not result in significant differences in apparent digestibility compared to casein or other plant proteins. However, true nitrogen digestibility, which accounts for endogenous nitrogen losses, was significantly higher in the Cas group compared to all the plant-protein-based. NPU, *i.e.*

the ratio of nitrogen retained to nitrogen ingested, and BV, defined by the ratio of nitrogen retained to nitrogen absorbed, were comparable across all groups.

Table 5. Indispensable amino acid profile of the proteins in the different experimental diets, compared to estimated amino acid requirements for 530g rats according to the National Research Council of Canada.

Amino acid content (g/kg of diet)	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3	Requirements*
Threonine	6.2	5.3	5.4	5.3	5.3	2.8
Lysine	11.9	11.6	5.5	8.1	8.1	1.7
Tyrosine + Phenylalanine	15.9	12.9	10.6	11.4	11.5	2.9
Isoleucine	8.0	6.2	5.9	5.9	5.9	4.8
Leucine	13.6	11.0	9.2	9.8	9.9	2.8
Histidine	4.5	3.7	3.7	3.6	3.6	1.2
Cysteine + methionine	4.9	3.2	5.8	4.5	4.6	3.5
Valine	10.3	7.1	7.2	7.0	7.0	3.5
Tryptophan	1.7	1.3	2.0	1.7	1.7	0.8

Data is expressed as g of amino acid per kg of diet.

*Requirement: estimated amino acid requirements for maintenance of 530g body-weight rats, according to the National Research Council of Canada (1995). Cas, casein; Sun, sunflower; mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 FA.

Table 6. Evaluation of the protein quality of the different experimental diets.

	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3
NI	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.39 ± 0.02
FN	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.07 ± 0.01
UN	0.31 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03
NB	36.3 ± 13.3	33.4 ± 23.9	49.7 ± 27.0	36.9 ± 26.4	22.0 ± 24.7
AD	90.7 ± 1.0 ^b	78.9 ± 3.4 ^a	85.4 ± 1.6 ^{a,b}	79.0 ± 2.1 ^a	82.2 ± 1.6 ^a
TD	101.9 ± 0.5 ^b	92.3 ± 1.61 ^a	95.3 ± 1.29 ^a	92.5 ± 1.58 ^a	94.6 ± 0.7 ^a
BV	56.4 ± 7.8	74.6 ± 7.6	67.7 ± 5.0	72.5 ± 12.9	62.7 ± 5.2
NPU	57.5 ± 8.1	69.2 ± 7.4	64.7 ± 5.3	67.4 ± 12.3	59.4 ± 5.1

^{a, b, c} Values in the same row with different superscript letters were significantly different (Dunnett's multiple comparison tests, $p < 0.05$). Data is expressed as means ± SEM.

Cas, casein; Sun, sunflower; mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 FA; NI, nitrogen intake; FN, fecal nitrogen, UN, urinary nitrogen, EFN, endogenous fecal nitrogen; NB, nitrogen balance; AD, apparent digestibility; TD, true digestibility; BV, biological value; NPU, net protein utilization.

3.3. Impact of protein source on biochemical markers

Fasting levels of lipid metabolic markers such as TAG, total cholesterol, HDL, NEFA, and glycerol, showed no significant differences between the 5 rat groups (Table 7). Furthermore, after 8 weeks on the diet, there were no significant changes in fasting glucose levels. The different diets also had no impact on plasma total protein and albumin concentrations. Finally, ASAT and ALAT, the markers of liver function, were not significantly different between groups.

Table 7. Lipid, metabolic, and hepatic markers in fasting rats fed different dietary proteins.

	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3
Lipids					
Triacylglycerol (g/L)	0.85 ± 0.11	1.02 ± 0.16	1.08 ± 0.10	0.92 ± 0.18	0.96 ± 0.18
HDL cholesterol (g/L)	0.75 ± 0.06	0.67 ± 0.04	0.81 ± 0.08	0.70 ± 0.05	0.78 ± 0.06
Total cholesterol (g/L)	1.04 ± 0.07	0.92 ± 0.07	1.18 ± 0.11	1.03 ± 0.08	1.12 ± 0.07
NEFA (mg/L)	226 ± 16	235 ± 31	210 ± 15	214 ± 15	215 ± 20
Glycerol (mg/L)	24.9 ± 2.4	21.5 ± 1.9	22.9 ± 2.1	21.3 ± 1.1	21.5 ± 2.0
Proteins					
Total protein (g/L)	60.3 ± 1.0	55.3 ± 3.2	62.7 ± 1.9	60.0 ± 1.1	60.3 ± 2.5
Albumin (g/L)	33.4 ± 0.6	32.6 ± 0.7	34.5 ± 1.2	33.5 ± 0.4	33.6 ± 1.4
Glucose (g/L)	1.24 ± 0.09	1.21 ± 0.1	1.36 ± 0.07	1.25 ± 0.03	1.14 ± 0.09
Liver enzymes					
ASAT (UI/l)	139 ± 12	111 ± 11	140 ± 8	132 ± 8	127 ± 16
ALAT (UI/l)	54.4 ± 6	50.70 ± 9	67.4 ± 6	54.1 ± 5	58.9 ± 9

Data is expressed as means ± SEM.

Cas, casein; Sun, sunflower; mix, pea–sunflower mixed protein; Mw3, pea–sunflower mixed protein rich in omega-3 FA; NEFA, non-esterified fatty acid; ASAT, aspartate aminotransferase; ALAT, alanine aminotransferase.

3.4. Lipid metabolism in the plantaris muscle

Table 8 reports the concentrations of each lipid type (TAG, DAG, MAG, FFA, PL) in the plantaris muscle according to diet. TAG and MAG levels were not significantly different

between protein sources. However, DAG and FFA contents were higher in Sun-rat samples than other groups. Similarly, PL content was higher in sunflower protein-fed rats than in pea and casein-fed rats, and higher in Mix and Mw3-fed rats than casein-fed rats.

Table 8. Total fatty acid content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of muscle) in the different lipid fractions in rat *plantaris* muscle.

[FAtot] $\mu\text{g}/\text{mg}$ muscle	Cas	Pea	Sun	Mix	Mw3
TAG	18.6 \pm 2.7	14.0 \pm 2.2	18.2 \pm 3.0	15.6 \pm 2.4	17.1 \pm 2.1
DAG	0.45 \pm 0.05 ^a	0.43 \pm 0.04 ^a	0.83 \pm 0.10 ^b	0.44 \pm 0.03 ^a	0.40 \pm 0.04 ^a
MAG	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02
FFA	0.72 \pm 0.07 ^a	0.64 \pm 0.06 ^a	1.15 \pm 0.09 ^b	0.65 \pm 0.05 ^a	0.65 \pm 0.05 ^a
PL	5.36 \pm 0.21 ^a	5.87 \pm 0.17 ^{a,b}	6.84 \pm 0.17 ^c	6.31 \pm 0.13 ^{b,c}	6.52 \pm 0.38 ^{b,c}

^{a, b, c} Values in the same row with different superscript letters were significantly different ($p < 0.05$). Statistical significance was assessed by ANOVA followed by a Tukey-Kramer test or a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test depending on homogeneity of variance and normality. Data is expressed as means \pm SEM.

TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; MAG, monoacylglycerol; FFA, free fatty acid; PL, phospholipids.

We also analyzed the content of saturated fatty acids (SFA) and omega-3 PUFAs in each lipid fraction of the plantaris muscle. Highlighting these two FA families allows us to capture both ends of the FA spectrum in relation to muscle function and health outcomes, as omega-3 PUFAs generally offer beneficial effects whereas SFAs are generally associated with negative impacts. The results, shown in Figure 3, indicate that an exclusively sunflower-protein diet led to lower SFA in the TAG and PL fractions compared to other protein sources. In the DAG and FFA fractions, the Mix group had a higher SFA content than the Sun group. For the MAG fraction, the control group had a higher SFA content than the Mw3 group. The Mw3 group had a higher omega-3 PUFAs content in the TAG, DAG, MAG, and FFA fractions compared to the other groups. The Sun group had a higher omega-3 content in the PL fraction compared to the Pea and Mix groups.

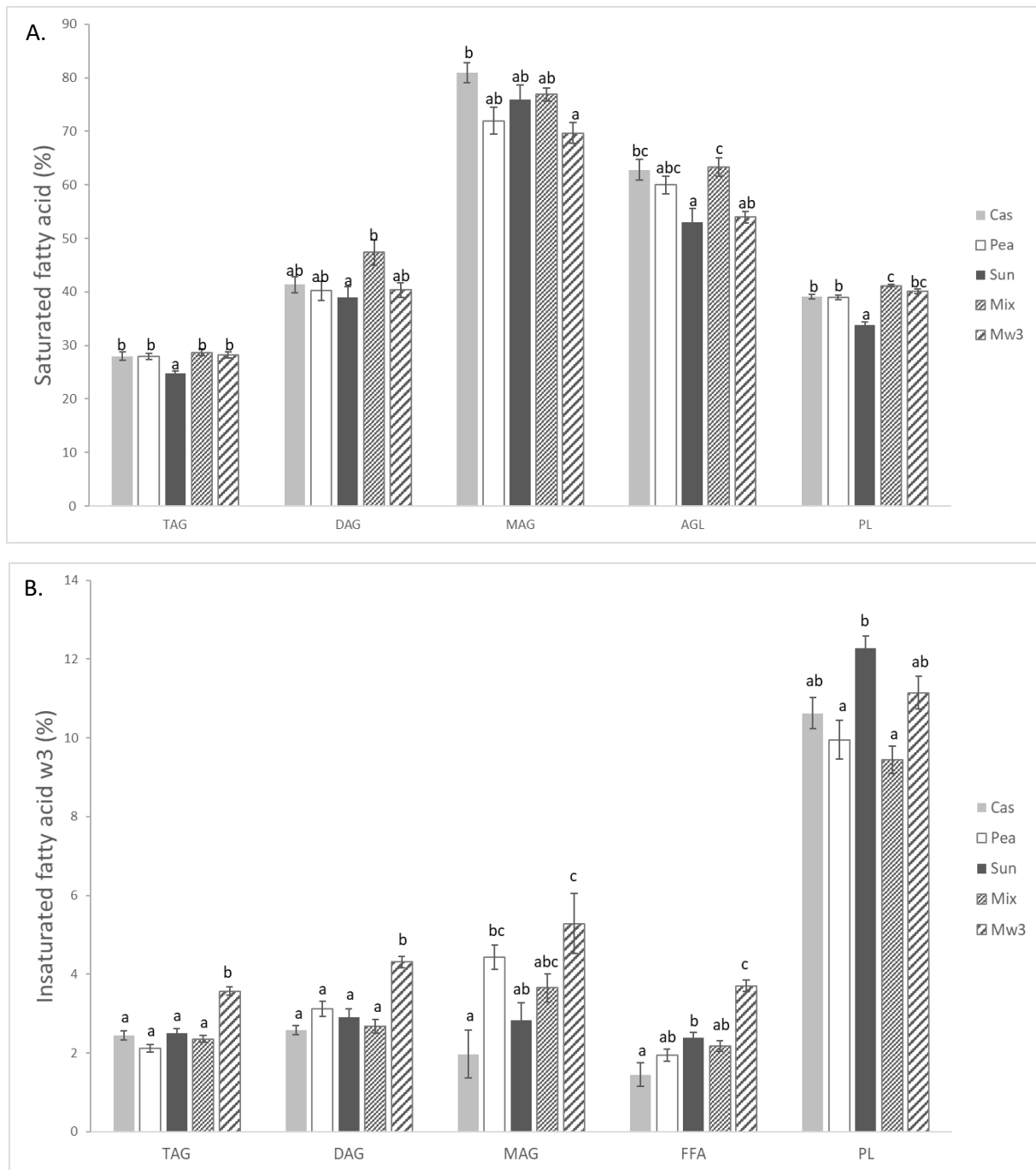


Figure 3. Fatty acid composition of lipids in the rat *plantaris* muscle. (A) Saturated fatty acid content (%) and (B) omega-3 fatty acid content (%) in each lipid fraction in muscles.

^{a, b, c} Different letters indicate significantly different means within a given lipid class ($p < 0.05$). Statistical significance was assessed by ANOVA followed by a Tukey-Kramer test. Data is expressed as means \pm SEM.

TAG, triacylglycerol; DAG, diacylglycerol; MAG, monoacylglycerol; FFA, free fatty acid; PL, phospholipids.

3.5. Muscle protein metabolism markers

We measured protein content and fractional synthesis rate (FSR) in the plantaris muscles of old rats (Figure 4). Regardless of the diet, protein content and FSR were not significantly different between diet groups. These results are consistent with the expression of markers of muscle protein synthesis and degradation, which also showed no significant differences between diets groups. In p38 MAPK phosphorylation, which activates the protein degradation process, as well as the expression of genes coding for MAFbx and MuRF1 proteins, which are markers of ubiquitination and muscle protein degradation, were not significantly different between groups (Figure 5). Similarly, markers of phosphorylation status (p70S6K, a key regulator of protein synthesis) and translation initiation (eIF2) did not show any significant variations between groups (Figure 6).

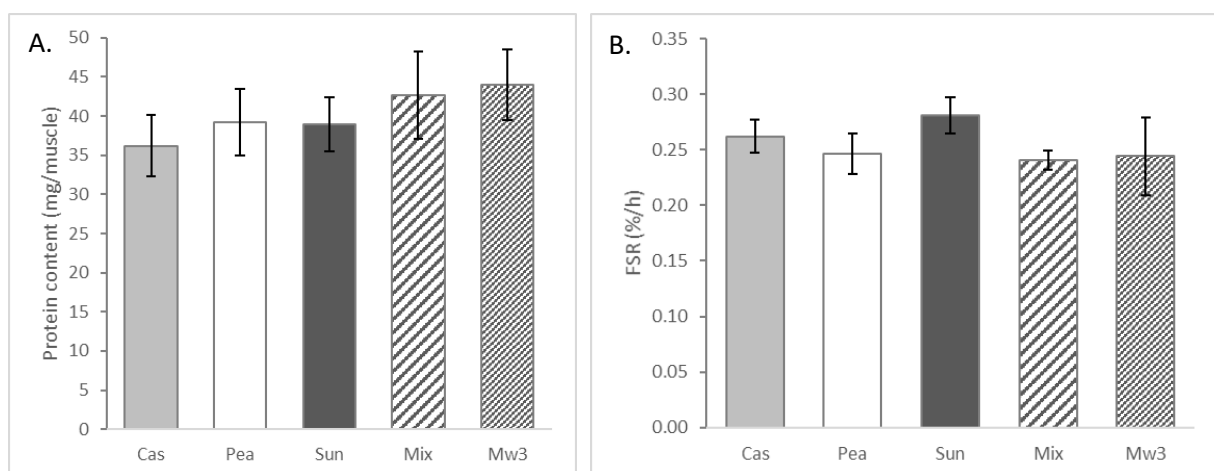


Figure 4. Effects of the different experimental diets on (A) protein content and (B) fractional synthesis rate (FSR) of proteins in the *plantaris* muscle.

Statistical significance was assessed by the Kruskal-Wallis test. Data is expressed as means \pm SEM.

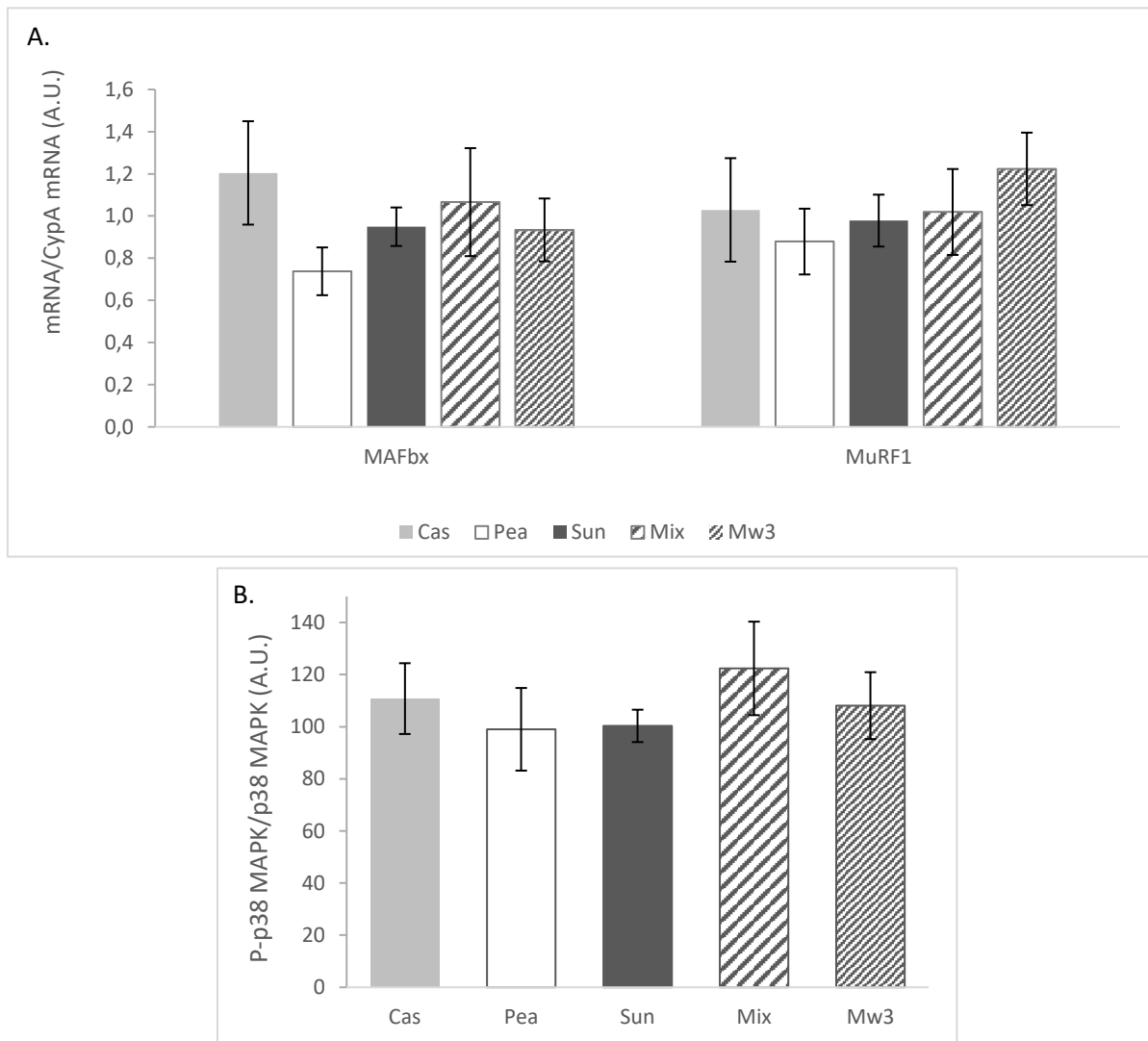


Figure 5. Effects of the different experimental diets on the expression of markers of protein degradation in the *plantaris* muscle of old rats. (A) Gene expression levels of the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx were analyzed by quantitative RT-PCR and normalized to CypA. (B) Phosphorylation states of the p38 MAP kinase were determined by Western blot and normalized to Ponceau S staining.

Statistical significance was assessed by the Kruskal-Wallis test. Data is expressed as means \pm SEM. A.U., arbitrary units; MAFbx, muscle atrophy F-box; MuRF1, muscle RING-finger protein-1; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinases; CypA, cyclophilin A.

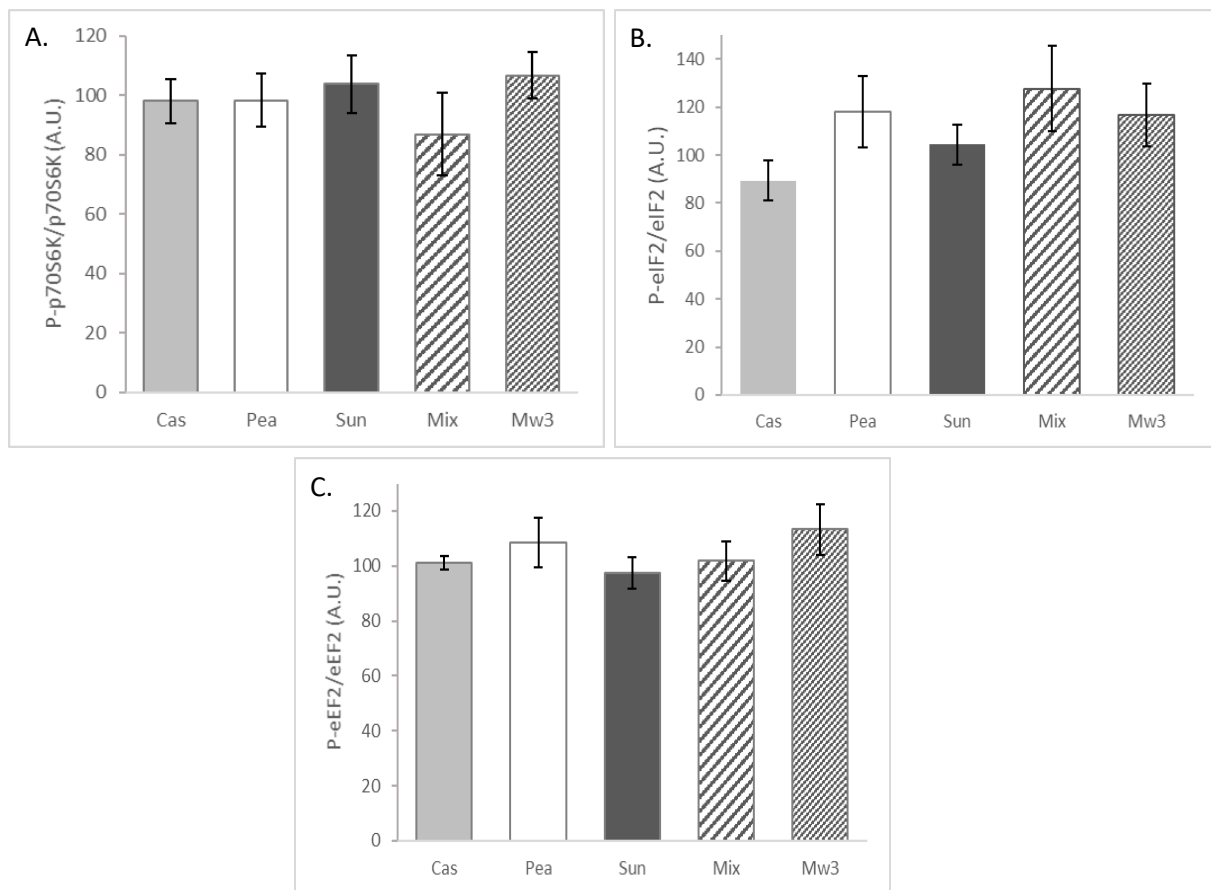


Figure 6. Effects of different experimental diets on the expression of protein synthesis markers in the plantaris muscle of aged rats. Phosphorylation states of (A) p70 S6 kinase, (B) eIF2, and (C) eEF2 were determined by Western blot and normalized to Ponceau S staining.

Statistical significance was assessed by ANOVA for p70S6K and by the Kruskal-Wallis test for eIF2 and eEF2, depending on homogeneity of variance and normality. Data is expressed as means \pm SEM. U.A.: arbitrary units.

4. Discussion

This study assessed the nutritional quality of sunflower protein and a sunflower–pea protein blend compared to casein and pea proteins, and investigated the potential role of sunflower-based protein for preventing age-related sarcopenia in old rats. We also explored the potential benefits of ALA supplementation on these parameters. Overall, we demonstrated that casein intake resulted in higher digestibility in old rats compared to plant-based proteins, without significantly affecting the efficiency of nitrogen utilization, particularly in muscle tissue. Muscle markers of protein synthesis and degradation remained unchanged after 8 weeks on the respective diets. Furthermore, ALA supplementation did not appear to

influence any of the measured parameters but did shift the FA profile towards a higher proportion of omega-3 PUFAs, especially ALA in intramuscular lipids.

When assessing the nutritional quality of proteins, it is crucial to consider how they are assimilated by the body, which is typically measured by nitrogen balance, digestibility, and protein utilization efficiency. Nitrogen balance, which measures the net difference between nitrogen absorbed and nitrogen lost, was similar across all groups of rats studied. Casein protein led to greater urinary nitrogen losses but lower fecal losses compared to plant proteins. This phenomenon balanced out the total nitrogen losses, thus explaining the lack of significant differences in NB between the groups. Digestibility, which accounts for fecal losses, was also analyzed. As expected, casein demonstrated superior digestibility to plant proteins, likely due to the absence of anti-nutritional factors (ANFs) and non-protein compounds such as starch, fiber, and lipids, which can hinder the digestion of plant proteins [24–26]. However, apparent digestibility was not significantly different between sunflower protein and casein. Salles et al. reported in old rats that apparent and true digestibility were not different between pea proteins and casein [27]. However, they focused on pea protein isolate, whereas here we used pea protein concentrate. It is well-established that plant protein isolates have better digestibility due to the lower presence of ANFs and non-protein compounds [28]. It was therefore not surprising that pea protein concentrate was found to have lower apparent and true nitrogen digestibility than casein in young rats [24]. The true nitrogen digestibility found here for sunflower protein was comparable to that reported by Canibe et al. for various varieties of sunflower meal in young rats. Protein digestibility is generally higher in younger individuals [29], so it is possible that the comparable digestibility observed here was due to the type of protein (concentrate vs. meal) and the age of the rats [3]. A study by Tessier et al. measuring the caecal digestibility of a sunflower isolate versus goat whey protein showed that they had similar values (96.3% vs. 97.5%) despite the higher digestibility of whey compared to casein [30]. These findings, demonstrating good digestibility of sunflower proteins, may explain why there was no significant difference in apparent nitrogen digestibility between the sunflower protein and casein.

The present results show that while casein is better absorbed than plant proteins, as evidenced by its greater digestibility, this does not necessarily translate into a better protein utilization efficiency. UPN and BV, which evaluate the efficiency of nitrogen retention, were comparable across all groups, regardless of protein source. These observations are consistent with two other studies conducted in old rats, where UPN and BV values did not show any

significant differences between different protein sources [27,31]. In addition, the BV and NPR values obtained here for sunflower concentrate in old rats were similar to BV and NPR reported for sunflower protein in young rats [3]. These findings are coherent with the AA profiles of the proteins, which showed a generally complete profile in terms of the estimated requirements for rats according to the National Research Council of Canada [32]. Only the sulfur AA content of pea protein was slightly below the estimated needs, but all diets had a high content of leucine, an IAA that drives the anabolic effects of nutrition by stimulating muscle protein synthesis through activation of the mTOR pathway in muscle cells [33]. The combination of sunflower and pea proteins compensates for the deficiency in sulfur AAs in pea, creating a well-balanced protein source that meets the rats' needs.

Note, however, that requirements for IAAs such as lysine are higher in growing rats. The low lysine content of sunflower proteins led to lower protein efficiency ratios for sunflower-based diets compared to casein-based diets in growing rats [34]. This suggests that while sunflower proteins are adequate for old rats, they may be limited in growing individuals or in situations that increase lysine requirements. Furthermore, it is essential to consider the differences between the IAA requirements of rats and humans. For example, comparing the IAA profile of sunflower protein to the WHO reference protein for adult humans, sunflower proteins appear to be deficient in lysine, resulting in a chemical score of 81%. However, the combination of sunflower protein and pea protein compensates for this deficiency, affording a chemical score > 100% (data not shown). These observations underscore the importance of accounting for metabolic differences between rats and humans when interpreting results, especially when applying them to human nutrition.

Aging is accompanied by changes in body composition that are characterized by a gradual increase in fat mass and a decrease in lean mass, particularly in skeletal muscles [35]. This phenomenon is largely influenced by factors such as diet, physical activity, and hormonal changes. These changes were also reproduced here, with a noticeable reduction in lean mass across all rat groups regardless of protein sources consumed. This observation suggests that the intake of pea and sunflower proteins, either alone or in combination, may affect loss of lean mass similarly to casein by influencing muscle anabolism and catabolism in a comparable way. However, the evolution of fat mass varied depending on protein source consumed. Rats fed the Cas, Sun, and Mw3 diets gained fat mass whereas rats fed the Pea and Mix diets lost fat mass. Only the change in fat mass from the Sun group was significantly different from that in the Pea and Mix groups. This result highlights the distinct impact of sunflower and pea-

based diets on lipid metabolism. The observed metabolic effects may stem not only from the proteins in pea and sunflower but also from the non-protein nutrients present in these diets. Since the protein sources used in this study were concentrates, nearly half of the nutrients in these ingredients consisted of non-protein components, such as fiber, starch, and residual lipids, which may also contribute to the observed metabolic effects. The effect of sunflower-protein diet on lipid metabolism was clearly manifested in the significantly higher concentrations of DAG and FFA in the plantaris muscles of Sun-group rats compared to other groups. The accumulation of intramuscular lipids, particularly in the form of DAG and FFA [36], is associated with dysregulated lipid metabolism, which is linked to a reduced capacity to oxidize fatty acids entering peripheral tissues cells, thereby promoting fat mass gain and metabolic complications [37]. The accumulation of DAG and FFA in the muscles of rats fed sunflower protein points to a disruption in lipid metabolism, which may contribute to increased fat storage and explain the observed fat mass gain. This fat gain offsets the loss of lean mass, resulting in no significant difference in total body weight between the start and end of the diet. A previous study on obese rats also found that a sunflower protein hydrolysate diet over three weeks did not result in weight loss [38], suggesting that sunflower protein does not promote weight loss. Conversely, the pea protein diet led to a reduction in fat mass, which is consistent with previous studies demonstrating beneficial effects of pea proteins on hepatic lipid metabolism. Compared to a casein-based diet, the pea-protein diet resulted in lower total liver cholesterol concentrations and lower cholesterol secretion via very-low-density lipoproteins after 16 days of consumption. However, plasma TAG, total cholesterol, and HDL cholesterol levels were not significantly different from those observed with casein, which is consistent with our results [39]. Pea protein may therefore exert a hypolipidemic effect, helping to prevent the fat mass gain associated with aging. In addition, the combination of pea and sunflower proteins also maintained these beneficial effects on fat mass.

The weight and protein content of the plantaris muscle did not show significant differences between groups, which is consistent with the results of FSR analysis and the markers of protein synthesis and degradation. These results suggest that the consumption of plant-based proteins, such as those from pea and sunflower, either alone or combined to achieve an AA profile that covers rats' needs, has effects comparable to casein on muscle protein anabolism and catabolism. These effects may help limit the decline in lean mass in aged rats fed plant proteins. Previous studies corroborate these observations. In a study by Berrazaga et al., diets based on pasta made from various legume flours (faba bean, lentil, split

pea) and wheat showed no significant differences in plantaris muscle protein content or absolute synthesis rate (ASR) compared to a casein-based diet in old rats after 6 weeks [31]. Furthermore, Salles et al. reported that after 12 weeks of diet, FSR levels and markers of muscle protein synthesis and degradation were not different between groups of old rats fed pea vs casein proteins [27]. These results confirm that legume proteins, particularly pea protein and especially when mixed with cereal proteins, can have comparable effects to casein on muscle protein metabolism in old rats. A study in young rats found that the protein isolate from rapeseed (another oilseed plant) induced a comparable FSR to milk proteins [40]. In addition, in lambs, adding extruded flaxseed (another oilseed) to the diet was found to increase longissimus dorsi muscle protein content in lambs compared to a standard soybean meal-based diet [41]. However, no studies to date have specifically investigated the effects of feeding sunflower protein on body muscle protein. Interestingly, a study in old rats found that soy protein consumption led to a higher ASR than casein consumption, although protein synthesis was not maximized compared to whey [42]. These findings suggest that certain plant-based proteins, such as flax, rapeseed, and soy, could serve as effective substitutes to casein for promoting muscle protein synthesis. The absence of significant differences in effects on muscle protein synthesis between sunflower and casein protein is therefore not surprising. Note, however, that the anabolic response of skeletal muscle in aged rats is lower after consuming casein protein compared to whey protein [42]. Here, study, the anabolic effect of pea and sunflower plant-based proteins was similar to that of casein, leading us to post that they may have a lower anabolic effect than whey.

The role of IAAs, particularly leucine, in muscle protein synthesis is well-established. Leucine is a key AA that stimulates muscle protein synthesis via activation of the mTOR pathway in muscle cells [33]. A recent study in elderly individuals showed that consuming an omnivorous meal containing beef resulted in better postprandial availability of IAAs and a 47% higher muscle protein synthesis rate compared to an isoproteic and isocaloric vegan meal [10]. However, the lower anabolic capacity of plant proteins can be compensated by increasing their quantity or by adjusting their leucine content. For example, the ingestion of 60 g of wheat protein hydrolysate resulted in comparable muscle protein synthesis rates to casein or whey in elderly individuals [43]. Enriching proteins with leucine is also a promising strategy to enhance anabolic capacity in elderly individuals, as demonstrated by the improved muscle protein synthesis with 5 g of leucine supplementation per meal, independently of total protein intake [44]. Here, although the casein diet had the highest leucine content, the other diets

based on pea and/or sunflower proteins provided adequate levels leucine to meet the rats' needs. This leucine content could explain why these proteins have comparable effects to casein on FSR, plantaris muscle protein content, and muscle mass in old rats. However, as the measurements were taken under fasting conditions, the absence of significant between-group differences in muscle mass suggests that plant-based proteins are effective in supporting muscle protein synthesis and/or limiting degradation, even if this effect does not rely on leucine during the postprandial period. The phosphorylation state of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) is a marker of muscle protein synthesis independently of the mTOR pathway [45]. In this study, eEF2 phosphorylation state was not significantly different between the groups. This result is consistent with the FSR values observed under post-absorptive conditions and with the muscle weights, which were not different between diets. Therefore, the different diets appear to be equally effective in supporting protein synthesis in the plantaris muscle and limiting protein degradation during the post-absorptive period. We can hypothesize that the ingestion of pea and sunflower proteins, either alone or combined, has a similar muscle protein anabolic capacity to casein in the postprandial period, leading to comparable plantaris muscle protein content and muscle mass. It would have been useful to perform muscle protein synthesis measurements under postprandial conditions to complement these findings and confirm this hypothesis.

One of the objectives of this study was to assess the impact of a high ALA intake and a concomitant reduction in LA (linoleic acid) in an iso-lipidic and iso-proteic diet on several physiological parameters, including protein digestibility, protein and lipid metabolism, and body and muscle composition in old rats.

A diet enriched with omega-3 fatty acids such as ALA could influence nitrogen metabolism by reducing low-grade inflammation [16] and improving the utilization of amino acids for protein synthesis [15]. However, our findings indicate that increasing ALA in the diet did not have a significant effect on apparent or true nitrogen digestibility, nor on other protein quality indicators such as NB, BV, and NPU. Nitrogen excretion in urine and feces was similar between the ALA-rich Mw3 group and the LA-rich Mix group. These results suggest that altering the lipid profile, specifically the ALA-to-LA ratio, does not affect protein digestibility in a diet that is balanced in both protein and lipid content. This observation aligns with Saleh et al. who found no difference in protein digestibility in chickens when soybean oil (rich in PUFAs) was replaced by poultry fat [46]. Furthermore, in the study by Hăbeanu et al on growing pigs, a reduction in the n-6/n-3 ratio from 22.5 to 2.56 by partially replacing soybean

meal with flaxseed and walnut meal in the animal diet had no effect on nitrogen digestibility but led to an increase in BV. However, these effects may have resulted from the consumption of flaxseed and walnut proteins rather than the associated ALA content [47].

Our analysis of lipid and nitrogen metabolism found no significant differences in plasma parameters such as hepatic enzyme activity (ASAT, ALAT), glucose, or blood lipids (total cholesterol, TAG) across all groups. This indicates that neither plant proteins (sunflower and pea) nor ALA intake had a notable effect compared to casein. Although some studies have highlighted the hypolipidemic effects of many plant proteins, including those from sunflower seeds, our results, in line with previous work, suggest these effects may be more pronounced in subjects with lipid abnormalities such as hyperlipidemia [38,48]. The metabolic effects of ALA remain controversial and appear to depend on ALA/LA ratio. For instance, one study found that a high-ALA diet (with an n-6/n-3 ratio of 0.3) reduced serum cholesterol levels in young rats from the first days of the diet up to day 50, compared to a high-LA diet (with an n-6/n-3 ratio of 193.3) [49]. Here, however, no hypolipidemic effect was observed with an n-6/n-3 ratio of 2.7 in the ALA-rich diet compared to a low-ALA diet with a ratio of 14.2. This could explain the absence of lipid-related effects, and underscores a need for higher ALA levels in order to observe potential benefits. Nonetheless, even diets with elevated ALA levels do not always show positive effects on lipid metabolism [46]. For example, a study involving a 6g/day ALA supplementation over 4 weeks showed no significant change in total cholesterol, low- LDL cholesterol, or HDL in either young or older subjects [50].

As for changes in body composition, specifically lean mass and fat mass, our results showed no significant differences after 8 weeks between the group fed ALA-rich sunflower and pea protein and the group with low ALA intake. This finding is consistent with a clinical study showing no significant association between a 1.4g/day ALA intake and lean mass in older women [51]. However, differences in the FA composition of diets appeared to have a slight impact on fat mass in the rats. Specifically, the ALA-poor sunflower and pea diet led to a reduction in fat mass compared to the Sun diet, while the ALA-rich sunflower and pea diet did not show any significant difference. This suggests that a higher n-6/n-3 ratio may promote fat mass loss in old rats. However, the literature on this issue reports mixed findings. For instance, chia seeds, which are rich in ALA with an n-6/n-3 ratio of 0.295, were shown to reduce visceral fat and epididymal adipocyte hypertrophy in a high-sucrose diet without affecting overall body weight in adult rats [52]. This phenomenon may be attributed to the capacity of PUFAs to stimulate lipolysis and FA oxidation, promoting greater lipid utilization rather than storage

[36]. The limited effect of ALA on fat mass reduction observed in our study may be due to the higher n-6/n-3 ratio compared to that used in Oliva et al.'s study.

Our findings also demonstrate that ALA intake altered the composition of intramuscular lipids, significantly increasing omega-3 PUFA levels in the TAG, DAG, MAG, and FFA fractions within the Mw3-group plantaris muscle. These results confirm that the FA profile of intramuscular lipids reflects the dietary lipid profile, as previously reported in chickens and pigs [46,47]. However, differences in ALA and LA intake did not result in a difference in total quantity of intramuscular lipids, suggesting that ALA modifies the quality rather than the quantity of these lipids.

Finally, regarding protein metabolism, although omega-3 PUFAs, particularly those from marine sources, have shown potential to stimulate protein synthesis and preserve muscle mass in older individuals [53], our results did not show any significant effect of ALA on FSR, markers of anabolism/catabolism, or the weight and protein content of the plantaris muscle. A study conducted on growing pigs demonstrated that replacing part of the soybean meal with ALA-rich flaxseed and walnut meal reducing the n-6/n-3 ratio from 22.54 to 2.56 went on to improve dry matter content, crude protein content, and nitrogen in the semitendinosus muscle, but not in the longissimus dorsi [47]. This suggests that the effects of ALA may vary between muscles. Differences may have been observed if other muscles had been analyzed, even though there were no significant differences in muscle weight between diets. Furthermore, it is important to note that we measured FSR and muscle protein content in post-absorptive conditions rather than postprandial conditions. However, omega-3 PUFA consumption enhances muscle anabolic signaling activity and increases insulin and AA-mediated muscle protein synthesis to above post-absorptive baseline values in older individuals [15]. Therefore, the anabolic effects of omega-3 PUFA are more pronounced under postprandial conditions, which may explain why no differences were observed between the ALA-rich and ALA-poor groups in our study. Moreover, the beneficial effects highlighted in the literature primarily concern EPA and DHA, rather than ALA [15]. The similar results for muscle protein metabolism between the Mix and Mw3 groups were therefore somewhat expected.

In conclusion, for the first time, this study provides data on the digestibility and quality of sunflower protein concentrates in old rats. Casein emerged as a more efficient protein source than plant-based proteins like pea and sunflower which showed lower digestibility.

Despite this difference, protein utilization was not significantly different between all the protein sources studied, leading to similar effects on muscle protein metabolism. This suggests that sunflower protein concentrates may have an anabolic effect comparable to pea and casein proteins in old rats. However, humans have different AA requirements, particularly higher lysine needs, which could mean that the anabolic effect observed in rats might be weaker in humans. Combining sunflower protein with pea protein could potentially address the lysine deficiency and offer a more balanced AA profile. While these findings raise promising perspectives for using sunflower protein in older individuals, human studies are needed to confirm these results before any definitive recommendations can be made. Finally, increasing the ALA/LA ratio in the diets of old rats did not significantly affect the parameters studied, such as protein digestibility, plasma biochemical markers, and muscle protein metabolism. However, it did shift the fatty acid profile towards an increase in omega-3 fatty acid content in intramuscular lipids. This suggests that while ALA intake may improve the quality of muscle lipids, it does not necessarily have a substantial impact on overall protein metabolism or lipid parameters.

Acknowledgments

This article did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We thank the ANRT for funding Lina Toutirais's PhD grant.

Conflicts of interest

The author declares no conflict of interest.

Author Contributions

LT: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – Original Draft, Writing – Review and Editing, Visualization; **JS:** Conceptualization, Methodology, Investigation; **CG:** Investigation; **MLC:** Investigation; **IC:** Investigation; **CB:** Investigation; **HA:** Investigation; **MG:** Investigation; **OLB:** Investigation; **VP:** Investigation; **JPR:** Investigation; **CV:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Validation, Writing – Review and Editing; **SW:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Investigation, Supervision, Validation, Writing – Review and Editing.

References

1. Singh R, Langyan S, Sangwan S, Rohtagi B, Khandelwal A, Shrivastava M. Protein for human consumption from oilseed cakes: a review. *Frontiers in Sustainable Food Systems* [Internet]. 2022 [cité 4 juill 2022];6. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2022.856401>
2. Arrutia F, Binner E, Williams P, Waldron KW. Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements. *Trends in Food Science & Technology*. 1 juin 2020;100:88-102.
3. Canibe N, Pedrosa MM, Robredo LM, Bach Knudsen KE. Chemical composition, digestibility and protein quality of 12 sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivars. *J Sci Food Agric*. oct 1999;79(13):1775-82.
4. Gonzalez-Vega JC, Stein HH. Amino acid digestibility in canola, cottonseed, and sunflower products fed to finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 1 déc 2012;90(12):4391-400.
5. Nørgaard JV, Fernández JA, Jørgensen H. Ileal digestibility of sunflower meal, pea, rapeseed cake, and lupine in pigs. *Journal of Animal Science*. 1 déc 2012;90(suppl_4):203-5.
6. Almeida FN, Htoo JK, Thomson J, Stein HH. Digestibility by growing pigs of amino acids in heat-damaged sunflower meal and cottonseed meal1. *Journal of Animal Science*. 1 févr 2014;92(2):585-93.
7. Tessier R, Calvez J, Khodorova N, Quinsac A, Kapel R, Tomé D, et al. Real ileal digestibility of sunflower protein and amino acids in humans. *Proceedings of the Nutrition Society*. janv 2020;79(OCE2):E387.
8. Moore DR, Churchward-Venne TA, Witard O, Breen L, Burd NA, Tipton KD, et al. Protein Ingestion to Stimulate Myofibrillar Protein Synthesis Requires Greater Relative Protein Intakes in Healthy Older Versus Younger Men. *The Journals of Gerontology: Series A*. 1 janv 2015;70(1):57-62.
9. ANSES. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. 2007. <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Sy-Proteines.pdf>
10. Pinckaers PJ, Domic J, Petrick HL, Holwerda AM, Trommelen J, Hendriks FK, et al. Higher muscle protein synthesis rates following ingestion of an omnivorous meal compared with an isocaloric and isonitrogenous vegan meal in healthy, older adults. *The Journal of Nutrition* [Internet]. 15 nov 2023 [cité 7 déc 2023]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022316623727235>
11. Huang RY, Yang KC, Chang HH, Lee LT, Lu CW, Huang KC. The Association between Total Protein and Vegetable Protein Intake and Low Muscle Mass among the Community-Dwelling Elderly Population in Northern Taiwan. *Nutrients*. juin 2016;8(6):373.
12. Ouyang Y, Huang F, Zhang X, Li L, Zhang B, Wang Z, et al. Association of Dietary Protein Intake with Muscle Mass in Elderly Chinese: A Cross-Sectional Study. *Nutrients*. janv 2022;14(23):5130.
13. Kao CC, Yang ZY, Chen WL. The association between dietary fiber intake and sarcopenia. *Journal of Functional Foods*. 1 mars 2023;102:105437.
14. Sun Y, Zheng Q, Sun J, Wang L, Li Y. Phytonutrients as Potential Dietary Supplements to Ameliorate Sarcopenia via the Involvement of Autophagic Pathway. *Food Reviews International*. 2023;0(0):1-41.

15. Smith GI, Atherton P, Reeds DN, Mohammed BS, Rankin D, Rennie MJ, et al. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1 févr 2011;93(2):402-12.
16. Cornish SM, Chilibeck PD. Alpha-linolenic acid supplementation and resistance training in older adults. *Appl Physiol Nutr Metab*. févr 2009;34(1):49-59.
17. Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, et al. Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *The Journals of Gerontology: Series A*. 1 nov 2009;64A(11):1183-9.
18. Pöri P, Lille M, Edelmann M, Aisala H, Santangelo D, Coda R, et al. Technological and sensory properties of plant-based meat analogues containing fermented sunflower protein concentrate. *Future Foods*. 1 déc 2023;8:100244.
19. Sosulski F, Fleming SE. Chemical, functional, and nutritional properties of sunflower protein products. *J Amer Oil Chem Soc*. 1 févr 1977;54(2):A100-4.
20. FAO/WHO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation [Internet]. World Health Organization; 2007 [cité 12 août 2024]. Disponible sur: <https://iris.who.int/handle/10665/43411>
21. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1 mai 1957;226(1):497-509.
22. Castro-Gómez MP, Rodriguez-Alcalá LM, Calvo MV, Romero J, Mendiola JA, Ibañez E, et al. Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*. 1 nov 2014;97(11):6719-28.
23. Proll J, Petzke KJ, Ezeagu IE, Metges CC. Low Nutritional Quality of Unconventional tropical crop seeds in rats. *The Journal of Nutrition*. 1 nov 1998;128(11):2014-22.
24. Sarwar G, Peace RW, Botting HG, Brulé D. Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. *Plant Food Hum Nutr*. 1 mars 1989;39(1):23-32.
25. Hu JL, Nie SP, Li C, Xie MY. *In vitro* effects of a novel polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. on intestinal function. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 mars 2013;54:264-9.
26. Ding M, Huang Z, Huang Z, Zhao Z, Zhao D, Shan K, et al. Proteins from different sources in a high-fat food matrix influence lipid hydrolysis through bolus coalescence and interactions with bile salts. *Food Hydrocolloids*. 3 avr 2023;108748.
27. Salles J, Guillet C, Le Bacquer O, Malnero-Fernandez C, Giraudet C, Patrac V, et al. Pea proteins have anabolic effects comparable to milk proteins on whole body protein retention and muscle protein metabolism in old rats. *Nutrients*. déc 2021;13(12):4234.
28. Sá AGA, Moreno YMF, Carciofi BAM. Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 12 nov 2020;60(20):3367-86.
29. Gilani GS, Sepehr E. Protein Digestibility and Quality in Products Containing Antinutritional Factors Are Adversely Affected by Old Age in Rats. *The Journal of Nutrition*. 1 janv 2003;133(1):220-5.

30. Tessier R, Khodorova N, Calvez J, Kapel R, Quinsac A, Piedcoq J, et al. 15N and 2H intrinsic labeling demonstrate that real digestibility in rats of proteins and amino acids from sunflower protein isolate is almost as high as that of goat whey. *The Journal of Nutrition*. 1 mars 2020;150(3):450-7.
31. Berrazaga I, Salles J, Laleg K, Guillet C, Patrac V, Giraudet C, et al. Anabolic properties of mixed wheat-legume pasta products in old rats: impact on whole-body protein retention and skeletal muscle protein synthesis. *Nutrients*. juin 2020;12(6):1596.
32. National Research Council. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995* [Internet]. National Academies Press (US); 1995 [cité 10 sept 2024]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231925/>
33. Smith K, Reynolds N, Downie S, Patel A, Rennie MJ. Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein. *Am J Physiol*. juill 1998;275(1):E73-78.
34. Sosulski F. Food uses of sunflower proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1979;56(3Part3):438.
35. Prentice AM, Jebb SA. Beyond body mass index. *Obesity Reviews*. 2001;2(3):141-7.
36. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: a critical point in metabolic homeostasis. *Nutrients*. nov 2015;7(11):9453-74.
37. Tardif N, Salles J, Guillet C, Tordjman J, Reggio S, Landrier JF, et al. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation. *Aging Cell*. 2014;13(6):1001-11.
38. Taha FS, Yamamah GA, Mohamed GF, Mohamed SS, Wagdy SM. *Biological Activities of Sunflower Protein Hydrolysate*. 2014;
39. Spielmann J, Stangl GI, Eder K. Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2008;92(6):683-93.
40. Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, Blachier F, Tomé D, Bos C. Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 25 juill 2011;8(1):52.
41. Atti N, Methlouthi N, Saidi C, Mahouachi M. Effects of extruded linseed on muscle physicochemical characteristics and fatty acid composition of lambs. *Journal of Applied Animal Research*. 1 déc 2013;41(4):404-9.
42. Jarzaguët M, Polakof S, David J, Migné C, Joubrel G, Efstathiou T, et al. A meal with mixed soy/whey proteins is as efficient as a whey meal in counteracting the age-related muscle anabolic resistance only if the protein content and leucine levels are increased. *Food Funct*. 13 déc 2018;9(12):6526-34.
43. Gorissen SH, Horstman AM, Franssen R, Crombag JJ, Langer H, Bierau J, et al. Ingestion of wheat protein increases *in vivo* muscle protein synthesis rates in healthy older men in a randomized trial. *The Journal of Nutrition*. 1 sept 2016;146(9):1651-9.

44. Murphy CH, Saddler NI, Devries MC, McGlory C, Baker SK, Phillips SM. Leucine supplementation enhances integrative myofibrillar protein synthesis in free-living older men consuming lower- and higher-protein diets: a parallel-group crossover study¹. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1 déc 2016;104(6):1594-606.
45. Cao Y, Liu S, Liu K, Abbasi IHR, Cai C, Yao J. Molecular mechanisms relating to amino acid regulation of protein synthesis. *Nutrition Research Reviews*. déc 2019;32(2):183-91.
46. Saleh AA, Alharthi AS, Alhotan RA, Atta MS, Abdel-Moneim AME. Soybean oil replacement by poultry fat in broiler diets: performance, nutrient digestibility, plasma lipid profile and muscle fatty acids content. *Animals*. sept 2021;11(9):2609.
47. Hăbeanu M, Lefter NA, Gheorghe A, Untea A, Ropotă M, Grigore DM, et al. Evaluation of performance, nitrogen metabolism and tissue composition in barrows fed an n-3 PUFA-rich diet. *Animals*. mai 2019;9(5):234.
48. Sautier C, Dieng K, Flament C, Doucet C, Suquet JP, Lemonnier D. Effects of whey protein, casein, soya-bean and sunflower proteins on the serum, tissue and faecal steroids in rats. *Br. J. Nutr.* 1982;313.
49. Ihara M, Umekawa H, Takahashi T, Furuichi Y. Comparative effects of short- and long-term feeding of safflower oil and perilla oil on lipid metabolism in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 1 oct 1998;121(2):223-31.
50. Patenaude A, Rodriguez-Leyva D, Edel AL, Dibrov E, Dupasquier CMC, Austria JA, et al. Bioavailability of α -linolenic acid from flaxseed diets as a function of the age of the subject. *Eur J Clin Nutr*. sept 2009;63(9):1123-9.
51. Isanejad M, Tajik B, McArdle A, Tuppurainen M, Sirola J, Kröger H, et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid and alpha-linolenic acid are associated with physical capacity measure but not muscle mass in older women 65–72 years. *Eur J Nutr*. 1 juin 2022;61(4):1813-21.
52. Oliva ME, Ferreira MR, Chicco A, Lombardo YB. Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1 oct 2013;89(5):279-89.
53. Lee JH, Jeon JH, Lee MJ. Docosahexaenoic acid, a potential treatment for sarcopenia, modulates the ubiquitin–proteasome and the autophagy–lysosome systems. *Nutrients*. sept 2020;12(9):2597.

A retenir de l'article n°3

.....

Cette étude a évalué la qualité des protéines d'un concentrat de tournesol et d'un mélange tournesol-pois, ainsi que leur capacité à maintenir la masse musculaire chez des rats âgés. Les résultats montrent que, bien que la caséine présente une digestibilité supérieure à celle des protéines végétales, cette différence ne se traduit pas par une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote. Les protéines de tournesol et de pois, seules ou combinées, ont des effets similaires à ceux de la caséine sur le métabolisme protéique musculaire après 8 semaines de régime. Par ailleurs, l'ALA n'a pas affecté la digestibilité et le métabolisme des protéines, mais a modifié le profil des lipides intramusculaires, améliorant la proportion d'oméga-3. Ces résultats montrent que, malgré une digestibilité inférieure, les protéines de tournesol peuvent contribuer au maintien de la masse musculaire chez les rats âgés, avec un potentiel comparable à celui de la caséine et des protéines de pois. Cependant, chez l'Homme, les besoins en AAI diffèrent à ceux des rats, en particulier avec des besoins plus élevés en lysine. Cela pourrait signifier que l'effet anabolisant observé chez les rats pourrait être réduit chez l'Homme. La combinaison de protéines de tournesol et de pois pourrait remédier à la déficience en lysine, offrant un profil AAI équilibré. Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation des protéines de concentrat de tournesol chez les personnes âgées, mais des études cliniques sont nécessaires avant de formuler des recommandations définitives.

DISCUSSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES



DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans un contexte de transition vers une alimentation plus durable, la *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), recommande une alimentation majoritairement végétale, riche en protéines végétales, non seulement pour leurs avantages écologiques, mais aussi pour leurs bénéfices en termes de santé (FAO). Cependant, en Europe, la consommation de protéines animales reste majoritaire, représentant environ 60 % de l'apport protéique total (FAO Database 2024). Ce déséquilibre souligne la nécessité d'un changement progressif des habitudes alimentaires vers une alimentation plus végétale. Toutefois, la transition actuelle vers une végétalisation de l'alimentation nécessite l'exploration de nouvelles sources protéiques capables de répondre à la demande croissante. Parmi les sources intéressantes, les oléagineux se distinguent par leur richesse en protéines, en lipides, dont des AGPI, et en fibres. Après extraction de l'huile, les tourteaux obtenus, notamment ceux issus du tournesol, du colza et du soja, conservent une forte teneur en protéines (27-45%), en fibres (6%-25%), en minéraux (6-7%) et une quantité variable de lipides résiduels selon la méthode d'extraction employée (Arrutia *et al.* 2020 ; Terres Univia). Ces tourteaux peuvent ensuite être transformés en divers ingrédients protéiques : des farines obtenues par broyage et tamisage, conservant une teneur en protéines similaire aux tourteaux, tandis que des concentrats protéiques, obtenus par classification aéroulrique ou voie humide, atteignent une concentration en protéines de 35 à 80% (Meganaharshini *et al.* 2023). Enfin, les isolats protéiques, produits par voie humide en précipitant les protéines à leur point isoélectrique (pI) contiennent plus de 80% de protéines (Chéreau *et al.* 2016 ; Carré 2021). Ces procédés permettent d'obtenir des matrices plus ou moins riches en protéines, et donc plus ou moins concentrées en d'autres nutriments, selon le degré de transformation appliqué.

Les protéines des oléagineux présentent souvent une déficience en lysine, à l'exception du soja qui est déficient en AA soufrés, et du colza qui a un profil en AA équilibré. Cela justifie l'association des protéines oléagineuses avec d'autres sources protéiques au profil en AA complémentaire, telles que les légumineuses. De ce fait, la complémentation avec le pois permet d'équilibrer le profil en AA et de répondre aux besoins humains en AAI (Arrutia *et al.* 2020 ; Day *et al.* 2022). Toutefois, cette complémentation doit prendre en compte la variabilité induite par des facteurs génétiques, environnementaux et agronomiques, qui rendent difficile l'obtention de valeurs précises concernant la composition chimique des produits. De ce fait,

certaines ingrédients dérivés du colza, bien que généralement déficient en lysine, présentent un profil en AA répondant aux besoins en AAI humains, et n'ont donc pas la nécessité d'être complétement (Chmielewska *et al.* 2021).

Outre la teneur en protéines et le profil en AA, la digestibilité des protéines est un paramètre crucial pour définir leur valeur nutritionnelle. La digestibilité peut être affectée par divers facteurs, tels que la structure des protéines, leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que les interactions avec d'autres composants de la matrice (lipides, fibres, amidon, facteurs antinutritionnels (FAN)) (Kaur *et al.* 2022). Les matrices complexes des ingrédients oléagineux, dans lesquelles les protéines sont en présence de ces autres composants, peuvent ainsi impacter la digestibilité des protéines. Par conséquent, la caractérisation approfondie de ces matrices, ainsi qu'une meilleure compréhension des interactions entre les nutriments sont essentielles pour optimiser leur digestibilité. Jusqu'à présent, la majorité des études se sont concentrées sur l'impact des nutriments sur la digestibilité de l'amidon (Ye *et al.* 2018 ; Chao *et al.* 2024) ou sur les interactions entre les protéines et les lipides, mais dans le cadre d'émulsions dans le but optimiser les formulations industrielles (Macierzanka *et al.* 2009 ; Sarkar *et al.* 2009 ; Guevara-Zambrano *et al.* 2022). Ainsi, l'un des objectifs de nos travaux était d'approfondir la compréhension de l'influence de la composition de la matrice alimentaire, ainsi que des interactions entre les protéines et les lipides, sur la digestion *in vitro* de ces macronutriments, à travers des ingrédients issus du tournesol, du colza et du pois, sous des formes non émulsionnées.

Il est nécessaire d'évaluer la valeur nutritionnelle de ces protéines issues des oléagineux avant de les recommander pour l'alimentation humaine. Le deuxième objectif de cette thèse visait donc à analyser la qualité nutritionnelle des protéines de colza et de tournesol, en comparant leur profil en AA et leur digestibilité à ceux du pois. Cette évaluation a été réalisée *in vitro*, en simulant la digestion chez un individu adulte sain, ainsi qu'*in vivo*, chez des rats âgés, afin de mieux comprendre l'impact du vieillissement sur la digestion des protéines. Dans l'étude chez le rat, la caséine a été utilisée comme protéine animale de référence et le bilan azoté, la valeur biologique et l'utilisation nette des protéines ont été mesurés. À ce jour, aucune étude n'a spécifiquement évalué la digestibilité de ces protéines issues des oléagineux chez des individus âgés, bien que cette population présente des besoins nutritionnels spécifiques. En effet, le vieillissement est souvent associé à une perte de masse et de fonction musculaire. Cette pathologie, appelée sarcopénie, peut en partie être prévenue par des interventions nutritionnelles, telles qu'une augmentation de l'apport en protéines de

bonne qualité nutritionnelle afin de stimuler efficacement la synthèse protéique musculaire en période post-prandiale. De plus, des effets prometteurs sur la synthèse musculaire, la masse musculaire, la force et les capacités fonctionnelles ont été observés par la consommation d'AGPI oméga-3 (Smith *et al.* 2011 ; Huang *et al.* 2020 ; Cornish *et al.* 2022 ; Isanejad *et al.* 2022). Ainsi, le dernier volet de notre travail consistait à évaluer l'effet de la consommation de ces protéines, enrichies ou non en AGPI-oméga 3, sur le métabolisme protéique musculaire chez les rats âgés.

1. Etude de l'influence de la composition de la matrice alimentaire sur la digestion des protéines et des lipides *in vitro*.

Le premier objectif de cette thèse était d'évaluer l'influence de la composition de la matrice alimentaire sur la digestibilité des protéines et des lipides. Pour cela, nous avons travaillé avec des farines et des concentrats de pois, de tournesol et de colza. Ces sources végétales présentent des compositions variées en termes de teneurs en glucides (fibres et amidon), lipides et protéines. L'objectif sous-jacent était de situer cette étude dans un cadre représentatif des situations alimentaires réelles, dans lequel les protéines sont généralement consommées en présence d'autres nutriments, afin d'analyser les différentes interactions lors du processus de digestion.

Les essais de digestion *in vitro* ont été réalisés en utilisant des matrices alimentaires plus ou moins riches en protéines, en suivant le protocole standardisé INFOGEST, qui permet de simuler la digestion humaine (Minekus *et al.* 2014 ; Brodkorb *et al.* 2019).

Les résultats ont révélé que la digestibilité des protéines végétales était relativement faible dans la phase gastrique, avec des taux variant de 10,7% à 16,0%, en accord avec les données de la littérature montrant que la pepsine hydrolyse entre 10 et 20% des protéines (Smith et Morton 2011). La faible solubilité des protéines de pois, de tournesol et de colza à un pH de 3, constitue un facteur déterminant de leur faible digestion gastrique (González-Pérez et Vereijken 2007 ; Wanasundara 2011 ; Day *et al.* 2022). En effet, la faible solubilité indique une agrégation des protéines à pH gastrique, ce qui diminue l'accessibilité des sites de clivage aux enzymes digestives. En outre, l'ajout d'huile de colza n'a pas eu d'influence significative sur la protéolyse durant la phase gastrique. Une explication possible réside dans le comportement des lipides et des protéines à pH gastrique. Le pH acide favorise l'agrégation des protéines,

mais également la coalescence des gouttelettes lipidiques. De plus, dans notre étude les lipides ajoutés sont sous forme d'huile, un liquide qui, en absence d'émulsifiants flotterait à la surface du contenu aqueux en raison de leur faible densité (van Aken 2010). Ces formes agrégées au pH gastrique limiteraient ainsi les interactions directes avec les protéines et les enzymes digestives. De ce fait, l'ajout d'ingrédient protéique n'a pas non plus entraîné de différence significative sur la lipolyse de l'huile pendant la phase gastrique, à l'exception des farines de pois et de colza. Ces ingrédients, qui contiennent respectivement 18 mg et 38 mg de PL par ingestat, ont accéléré la lipolyse gastrique, suggérant que la présence de PL favorise l'action des lipases en stabilisant les gouttelettes lipidiques et en prolongeant la surface de contact pour l'hydrolyse enzymatique (Ahn et Imm 2023).

La digestion des protéines s'est révélée plus efficace dans la phase intestinale, avec des écarts significatifs entre les protéines de tournesol, de colza et de pois. La digestibilité des protéines de colza, comparée à celles du tournesol et du pois, s'est avérée plus élevée, ce qui était prévisible compte tenu des différences dans la composition de leurs matrices respectives. En effet, la farine de tournesol est riche en fibres et acide phytique tandis que le pois est riche en amidon. Il est bien documenté dans la littérature que les fibres et l'amidon augmentent la viscosité du milieu digestif et que l'acide phytique forme des complexes insolubles avec les protéines. Ces phénomènes limitent l'accessibilité des enzymes digestives (Kadam *et al.* 2021 ; Kaur *et al.* 2022). Toutefois, un aspect inattendu de cette étude est l'augmentation de la protéolyse des protéines de colza en fin de phase intestinale ; un phénomène qui a été inhibé par l'ajout d'huile de colza. Ce résultat suggère que les protéines de colza pourraient être partiellement piégées dans un réseau lipidique au sein de la matrice, limitant initialement l'accès des protéases. Au fur et à mesure que la lipolyse intestinale progresse, ces protéines seraient progressivement libérées, améliorant leur accessibilité aux protéases, et entraînant finalement une meilleure digestibilité. Ce phénomène a été observé dans une autre étude portant sur les protéines de soja présentes dans les cellules isolées de cotylédon (Zahir *et al.* 2018). Dans cette étude, l'inhibition de la lipase pancréatique a réduit la protéolyse, démontrant que l'hydrolyse des lipides par la lipase permet de libérer une partie des protéines et entraîner leur hydrolyse (Zahir *et al.* 2018). Notre étude révèle aussi que l'ajout d'huile de colza, en présence ou non d'orlistat (un inhibiteur de lipases), inhibe l'augmentation de la protéolyse à la fin de la digestion. Cela suggère qu'en présence d'huile, la lipolyse n'affecte pas la digestion des protéines. Une explication possible est que l'ajout de

l'huile favorise le piégeage des protéines, retardant ainsi leur libération et, par conséquent, leur hydrolyse par les protéases.

Des différences significatives de digestibilité protéique (45% contre 64%) ont été observées entre les deux concentrats de tournesol provenant de deux fournisseurs différents. La cause la plus probable de ces écarts réside dans les procédés de transformation distincts appliqués aux deux concentrats. L'un d'eux a subi une extraction des lipides à l'éthanol et un traitement thermique lors du séchage, des étapes connues pour altérer la conformation native des protéines. La littérature indique que ces traitements peuvent entraîner l'agrégation des protéines, ce qui peut diminuer leur solubilité et réduire l'accès des enzymes digestives aux sites de clivage (Santé-Lhoutellier *et al.* 2008 ; Duque-Estrada *et al.* 2019 ; Carré 2021). En conséquence, la sensibilité des protéines aux protéases est réduite, ce qui expliquerait la différence marquée de digestibilité observée dans cette étude.

L'ajout d'huile de colza n'a pas eu les mêmes effets sur la protéolyse des différents ingrédients protéiques. Dans les deux concentrats de protéines de tournesol, l'ajout de lipides a amélioré la protéolyse, probablement en augmentant l'exposition des groupes hydrophobes et le déploiement des protéines par leur adsorption à la surface des gouttelettes lipidiques (Zhou *et al.* 2019). Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Ding *et coll.*, 2022, qui ont démontré que la digestibilité des protéines est améliorée lorsque celles-ci sont émulsifiées (Ding *et al.* 2022). Cependant, il est important de souligner que toutes les protéines ne répondent pas de la même manière à la présence de lipides. Leurs interactions varient en fonction de leur composition en AA, en particulier de leur teneur en AA hydrophobes, de leur structure tridimensionnelle et du degré d'exposition de leurs groupes hydrophobes (Ding *et al.* 2022). Ainsi, dans notre étude, l'ajout de lipides n'a pas eu d'impact significatif sur la protéolyse du concentrat de pois. Ces résultats sont en accord avec Guevara-Zambrano *et coll.*, 2022, qui ont montré que la présence de lipides sous forme d'émulsion n'avait pas d'effet notable sur la digestion des protéines d'isolat de pois en comparaison à une solution protéique (Guevara-Zambrano *et al.* 2022). Ces résultats pourraient suggérer que les protéines de pois ont une interaction limitée avec les lipides. Étant donné que les teneurs en AA hydrophobes sont similaires entre les différentes protéines de tournesol et de pois étudiées, les interactions limitées entre le concentrat de pois et les lipides semblent davantage liées à la structure tridimensionnelle des protéines. Contrairement aux concentrats de tournesol, le concentrat de pois n'a pas été soumis à un traitement thermique, ce qui suggère que les groupes hydrophobes ne sont pas exposés et limitent les interactions avec les lipides.

À l'inverse de l'effet des lipides sur la protéolyse, la présence de certains ingrédients protéiques a entraîné une diminution significative de la lipolyse. De manière générale, la lipolyse était diminuée lorsque les ingrédients étaient composés d'une majorité de particules de grosse taille ($>250\mu\text{m}$). L'hypothèse est que ces dernières gênent l'accès des lipases limitant leur adsorption à la surface des gouttelettes lipidiques. D'autres études ont également observé que les interactions lipidiques et protéiques pouvaient affecter négativement la vitesse ou le taux de lipolyse (Calvo-Lerma *et al.* 2018 ; Guevara-Zambrano *et al.* 2022). Ces recherches suggèrent que les protéines peuvent former un réseau réticulé emprisonnant les gouttelettes lipidiques, ou s'ancrer de manière irréversible à l'interface huile-eau, ce qui limite la capacité des enzymes à interagir avec les lipides. Ces mécanismes pourraient également expliquer la diminution de la lipolyse observée avec les protéines de la farine de colza, de tournesol et du concentrat de tournesol B dans notre étude.

Cette étude met en lumière l'impact des interactions entre les macronutriments sur la digestibilité des protéines et des lipides. Globalement, la digestion des protéines et des lipides étaient limitées pendant la phase gastrique, principalement en raison de la résistance des protéines végétales à la pepsinolyse et de la séparation physique de l'huile avec les enzymes présentes dans la phase aqueuse de l'estomac. En revanche, la phase intestinale a été caractérisée par une digestion plus efficace, mais probablement modulée par la présence de fibres et d'amidon, par le piégeage des protéines par les lipides et par la capacité des matrices à stabiliser les émulsions. Pour approfondir la compréhension des interactions complexes entre protéines et lipides au cours de la digestion, il serait pertinent d'utiliser la microscopie confocale afin de visualiser les protéines et les lipides via des colorants spécifiques, tels que du Nile Red pour les lipides et du Fast Green pour les protéines. Cela permettrait d'observer la dispersion des nutriments au sein des matrices alimentaires et de suivre leur libération lors de la digestion (Wang *et al.* 2021 ; Ding *et al.* 2022). De cette manière, Ding *et al.*, 2022, ont démontré que, dans un régime à base de caséine, les gouttelettes d'huile étaient plus finement dispersées et que les protéines s'adsorbaient à leur surface, en comparaison aux régimes à base de protéine de porc, poulet et soja (Figure 28) (Ding *et al.* 2022).

De plus, la seule composition chimique des matrices ne suffit pas à prédire leur comportement lors des phases de digestion. D'autres facteurs, tels que la structure des protéines (hélices α , feuillet β , état natif), leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobicité de surface) et leurs propriétés rhéologiques (viscosité, capacité d'émulsification) (Ding *et al.* 2022), ont également été corrélés à leur digestibilité. Ainsi, pour compléter nos résultats et

mieux comprendre l'impact de la matrice alimentaire sur la digestion des protéines et des lipides, il aurait été pertinent de mesurer ces paramètres.

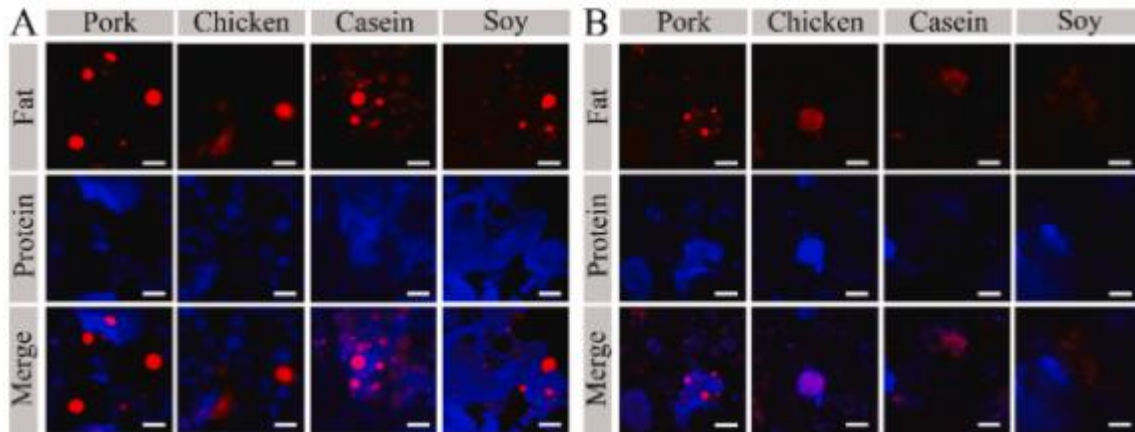


Figure 28. Images de microscopie à balayage laser confocal, de différents régimes après la digestion gastrique (A), et après la digestion intestinale (B) (Ding *et al.* 2022).

2. Etude de la qualité nutritionnelle des protéines oléagineuses

Le deuxième objectif de ce travail était d'évaluer la qualité nutritionnelle de plusieurs ingrédients protéiques oléagineux, à la fois *in vitro*, en mimant la digestion d'un individu adulte sain, et *in vivo* chez le rat âgé, dans le but d'explorer l'effet du vieillissement. Pour ce faire, nous avons comparé ces sources protéiques à des protéines dont la qualité nutritionnelle est bien établie : la protéine de pois dans l'étude *in vitro* et *in vivo* en tant que référence végétale, et la caséine comme référence animale dans l'étude *in vivo*.

La digestibilité protéique *in vitro* de la farine de tournesol était proche de celle de la farine de pois, tandis que la digestibilité de la farine de colza s'est révélée être significativement supérieure à celles deux autres farines. Ces résultats révèlent une bonne digestibilité des protéines de colza et de tournesol, en comparaison avec la digestibilité de protéine de pois, la référence protéique dans notre étude. Cependant, il est important de noter la variabilité observée parmi les concentrats de tournesol : l'un présentait une digestibilité comparable à celle du concentrat de pois, tandis que l'autre avait une digestibilité significativement inférieure. De ce fait, la digestibilité d'un seul des deux concentrats de tournesol était équivalente par rapport aux protéines de pois. Peu d'études antérieures ont évalué la digestibilité *in vitro* des protéines de tournesol et de colza (Alexandrino *et al.* 2017 ; Zhang *et al.* 2017 ; Li *et al.* 2023 ; Huang *et al.* 2024). Les valeurs obtenues dans notre étude étaient

globalement inférieures à celles rapportées dans la littérature. Par exemple, la digestibilité de la farine de tournesol a été rapportée à 83,1%, dans l'étude d' Alexandrino *et coll*, 2017, contre 57,9% dans notre étude (Alexandrino *et al.* 2017). Ces différences de digestibilité observées peuvent être attribuées à la variation des protocoles de digestion *in vitro* utilisés. Notre étude, suivant protocole INFOGEST, se base sur l'activité enzymatique pour déterminer les concentrations en enzymes, tandis que le protocole d'Alexandrino *et coll*, 2017, utilise des quantités d'enzymes sans mesurer leur activité. Le pH intestinal varie également entre les deux protocoles, 7 dans celui d'INFOGEST et 5,7 dans l'autre étude, ce qui peut affecter en particulier l'efficacité des enzymes. De plus, Alexandrino *et coll*, 2017 ne tenaient pas compte du blanc enzymatique dans leurs calculs de digestibilité. Enfin, ces chercheurs utilisaient la méthode Kjeldahl pour mesurer l'azote, qui est plus précise que la méthode OPA choisie pour notre étude, bien que cela n'ait pas un impact sur les ratios finaux de digestibilité. En tenant compte de ces différences méthodologiques, il est difficile de déterminer de manière absolue quel résultat (83% ou de 58%) est le plus proche de la réalité physiologique. Cependant, étant donné que le protocole INFOGEST est standardisé, avec une attention particulière à l'activité enzymatique, au pH physiologique, et que nous avons tenu compte de l'azote des enzymes dans le calcul de la digestibilité, il est probable que nos résultats (58%) soient plus fidèles à la digestibilité réelle des protéines. Ces écarts soulignent l'importance de la standardisation des méthodes d'évaluation et indiquent qu'une comparaison directe avec d'autres études doit tenir compte des protocoles expérimentaux.

En comparaison avec d'autres sources protéiques évaluées selon la méthode de digestion statique *in vitro* INFOGEST, la protéolyse du concentrat de pois était inférieure à celle de l'isolat de protéine de lactosérum et du concentrat de gluten de blé (Melchior *et al.* 2023). Cela suggère que les digestibilités des protéines de tournesol et de colza, étant similaires ou inférieures à celle du concentrat de pois dans notre étude, pourraient également être inférieure à la digestibilité de ces deux sources protéiques animales et céréalières. De plus, une autre étude utilisant également le protocole INFOGEST, mais appliquant une équation différente pour mesurer le degré d'hydrolyse, a révélé que la digestibilité d'un concentrat de pois était statistiquement similaire à celle de concentrats protéiques de lactosérum, de maïs, de levure et de ténébrion, mais inférieure à celle d'un concentrat de pommes de terre (Ariëns *et al.* 2021). Cette observation suggère que la digestibilité de la farine de colza et de l'un des deux concentrats de tournesol, étant équivalente à celle du concentrat de pois dans notre étude, pourrait également être comparable à ces sources protéiques. Ces résultats renforcent

l'idée que, en comparaison avec les données de la littérature et en prenant le concentrat de pois comme référence de digestibilité, les protéines de tournesol et de colza pourraient constituer des sources protéiques de bonne qualité nutritionnelle, présentant une digestibilité comparable à celle d'autres sources protéiques végétales et animales.

En intégrant les valeurs de digestibilité *in vitro* et les profils en AA de chaque ingrédient protéique, nous avons calculé les scores IV-PDCAAS (FAO/WHO/UNU 2007). La farine de colza a obtenu un score de 93,3%, traduisant à la fois une bonne digestibilité et un profil équilibré en AAI, surpassant les autres ingrédients protéiques étudiés. Cependant, il est intéressant de noter que la digestibilité iléale réelle des protéines colza mesuré *in vivo* chez l'Homme s'est avérée inférieure à celle d'autres sources protéiques (Bos *et al.* 2007 ; Tessier *et al.* 2023). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette divergence entre les résultats *in vitro* et *in vivo* chez l'Homme :

- Différences de formulation et de préparation du repas : Les études *in vivo* ont impliqué l'ingestion de matrices complexes, comme un produit solide cuit contenant un concentrat protéique de colza (Tessier *et al.* 2023) ou un repas liquide contenant un isolat protéique de colza (Bos *et al.* 2007), tandis que notre étude *in vitro* utilisait une farine de colza crue solubilisée. La cuisson et la structure du repas peuvent affecter la digestibilité en modifiant la disponibilité des protéines et leur interaction avec d'autres composants alimentaires.
- Variabilité interindividuelle : Contrairement aux essais *in vitro* où les conditions sont standardisées et homogènes, la digestion humaine est soumise à une forte variabilité individuelle due à des différences physiologiques (composition du microbiote intestinal, sécrétion enzymatique, transit digestif, etc.), ce qui peut influencer l'efficacité de la digestion et l'absorption des protéines.
- Cinétique de digestion différente : *In vivo*, la libération et l'absorption des AA dépendent du temps de vidange gastrique et de la vitesse de digestion enzymatique, qui varie selon les individus et la composition du repas. En revanche, les méthodes *in vitro* simulent souvent une digestion plus rapide et complète, ce qui peut surestimer la digestibilité réelle des protéines.

À l'inverse, tous les ingrédients de tournesol se sont révélés déficients en lysine, ce qui a eu comme conséquence de réduire leur IV-PDCAAS en dessous de celui du pois. Ces résultats ne sont pas surprenants, car la lysine est l'AAI limitant dans les protéines issues de graines

oléagineuses, à l'exception du soja (Arrutia *et al.* 2020 ; Day *et al.* 2022). Il en découle que les protéines de tournesol nécessitent une complémentation en lysine (via le pois par exemple) pour atteindre un profil en AAI, répondant aux besoins nutritionnels humains (FAO/WHO/UNU 2007).

Nous avons observé une corrélation modérée entre nos résultats d'IV-PDCAAS et les valeurs de PDCAAS *in vivo* provenant de la littérature, en appliquant un coefficient de proportionnalité de $0,68 + 27$ (Ertl *et al.* 2016 ; Petrusán *et al.* 2016). Cette observation valide en partie l'utilisation du protocole INFOGEST pour l'évaluation de la qualité protéique *in vitro*, en particulier pour les protéines issues des oléagineux. Cependant, il convient de noter que la digestibilité fécale *in vivo*, utilisée pour calculer le PDCAAS, intègre également la fermentation bactérienne au niveau du côlon. Ce phénomène a tendance surestimer la digestibilité et, par conséquent, le PDCAAS obtenu *in vivo*. Cette différence pourrait expliquer pourquoi la droite de corrélation entre les valeurs de PDCAAS *in vitro* et *in vivo* n'avait pas un coefficient de proportionnalité de 1. Cela signifie que les valeurs *in vitro* doivent être ajustées pour correspondre aux résultats observés *in vivo*. Cette observation est cohérente avec d'autres études ayant noté l'existence de biais entre les données de digestibilité *in vitro* et *in vivo*, malgré une corrélation statistiquement significatif (Santos-Sánchez *et al.* 2024).

Les protéines oléagineuses ont donc un potentiel nutritionnel chez l'individu adulte en bonne santé, en comparaison avec la digestibilité et l'IV-PDCAAS de la protéine de pois. Cependant, le vieillissement peut avoir un effet sur l'efficacité de la digestion gastro-intestinale, provoquant une diminution de l'efficacité de la digestion et de l'absorption des nutriments (Rémond *et al.* 2015). Ainsi, nous pouvons nous demander quel est l'impact du vieillissement sur la digestibilité et l'utilisation des protéines oléagineuses.

Pour explorer cette question, nous avons évalué la qualité nutritionnelle d'un concentrat de tournesol, seul ou complétement avec de la protéine de pois, chez des rats âgés de 22 mois, en les comparant à la caséine et au concentrat de pois. Cette évaluation s'est basée sur plusieurs indicateurs de la qualité des protéines alimentaires : le bilan azoté, la digestibilité azotée apparente (DAA) et vraie (DAV), la valeur biologique (VB) et l'utilisation protéique nette (UPN).

Comme attendu, la digestibilité de la caséine était supérieure à celles des protéines végétales, notamment en raison de l'absence de FAN et de composés non-protéiques tels que les fibres, l'amidon et les lipides. Toutefois, la DAA des protéines de tournesol n'était pas

significativement différente de celle de la caséine, corroborant des études antérieures qui ont mis en évidence la bonne digestibilité des protéines de tournesol (Canibe *et al.* 1999 ; Tessier *et al.* 2020b). Ces données indiquent que les protéines de tournesol sont bien digérées, même dans une situation de vieillissement.

Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes concernant l'efficacité d'utilisation des protéines, mesurée via la VB et l'UPN, suggérant que la rétention d'azote était similaire entre les protéines végétales et la caséine chez le rat âgé. Cela indique que les protéines de tournesol et de pois peuvent répondre aux besoins en AA des rats âgés, en accord avec leur profil en AAI. Néanmoins, il est important de souligner que les besoins en AAI des rats et des humains diffèrent. L'Homme nécessite un apport plus élevé en AAI par rapport à un rat âgé de 530 g, à l'exception de l'isoleucine et des AA soufrés (National Research Council 1995, FAO/WHO/ONU 2013). Le concentrat de tournesol, bien qu'ayant induit des résultats encourageant chez les rats, demeure déficient en lysine par rapport aux besoins en AAI définis par la FAO pour l'alimentation humaine. La complémentation avec des protéines de pois permet de compenser cette déficience et d'obtenir un mélange protéique au profil équilibré en AAI.

La qualité nutritionnelle des protéines de colza était supérieure à celle des protéines de pois, en raison de leur digestibilité élevée et de leur profil équilibré en AA. Bien que la digestibilité *in vitro* et *in vivo* des protéines de tournesol soit similaire à celle des pois et de la caséine, ces protéines nécessitent d'être complétement en lysine pour maximiser leur potentiel nutritionnel. Chez le rat âgé, la VB et l'UPN des protéines de tournesol et de pois étaient comparables à celles de la caséine, ce qui soutient l'idée que les protéines végétales, lorsqu'elles sont bien équilibrées, peuvent offrir une alternative viable aux protéines animales.

De plus, récemment, un modèle de digestion statique *in vitro* spécifiquement adapté à la population âgée, a été développé et validé par le consortium international EAT4AGE (Menard *et al.* 2023). Ce modèle se distingue principalement du modèle INFOGEST pour jeunes adultes par un pH et une durée d'exposition plus élevée au cours de la phase gastrique, couplé à une activité enzymatique gastrique et intestinale et une concentration en sels biliaires plus faibles. Une perspective de ce travail serait d'appliquer ce protocole pour évaluer la digestibilité *in vitro* de nos ingrédients protéiques dans un contexte de vieillissement. Cela nous permettrait de comparer les résultats obtenus chez les rats âgés avec une digestion *in vitro* simulant le système digestif d'un humain âgé. De plus, cette approche permettrait d'évaluer l'impact des

conditions digestives spécifiques aux personnes âgées sur la digestibilité des protéines oléagineuses, en comparant nos résultats actuels, obtenus à partir de modèles simulant la digestion d'individus adultes en bonne santé, avec ceux issus de simulations digestives représentant les personnes âgées. La digestibilité de certaines protéines peut en effet être influencée par le phénomène du vieillissement. Par exemple, il a été observé que la digestibilité des protéines de pois, de riz et de lactosérum diminue dans des conditions digestives simulant le vieillissement, tandis que celle du blé reste inchangée (Melchior *et al.* 2023). En somme, cette démarche permettrait non seulement de mieux comprendre les différences dans la digestibilité des protéines avec l'âge, mais aussi d'affiner les recommandations nutritionnelles pour optimiser l'utilisation des protéines oléagineuses dans l'alimentation des personnes âgées.

3. Etude de l'effet de la consommation de protéines de tournesol sur le métabolisme protéique musculaire du rat âgé

Le vieillissement s'accompagne de nombreux changements physiologiques, notamment une diminution progressive de la masse musculaire, en particulier au niveau des muscles squelettiques, et une augmentation de la masse grasse (Prentice et Jebb 2001). Ce phénomène est influencé par divers facteurs, tels que l'alimentation, l'activité physique et les modifications hormonales. La mise en place d'interventions nutritionnelles, comprenant un apport adéquat en protéines de bonne qualité nutritionnelle et en AG oméga-3, semble pouvoir ralentir ou prévenir ces modifications métaboliques. Toutefois, bien que les protéines végétales soient de plus en plus étudiées, l'effet de la consommation de protéines de tournesol sur le métabolisme protéique musculaire dans le cadre du vieillissement n'avait pas été exploré jusqu'à présent.

Dans nos travaux, les protéines de tournesol se sont avérées répondre aux besoins des rats, bien que leur teneur en leucine soit inférieure à celle de la caséine. Concernant la DAA, la VB et l'UPN des protéines de tournesol, nos résultats n'ont pas révélé de différences significatives par rapport à la caséine ou aux protéines de pois. Cela s'est traduit par une efficacité similaire des protéines de tournesol, de pois et de caséine sur le métabolisme protéique musculaire. En conséquence, la consommation des protéines de tournesol, de pois, ou une combinaison des deux, n'a entraîné aucune différence significative dans la composition de la masse maigre, le poids des muscles, les teneurs en protéines musculaires, ainsi que les

marqueurs de la synthèse et de la dégradation des protéines musculaires, par rapport à la caséine. Dans la littérature, les protéines animales sont souvent considérées comme de puissants stimulateurs de la synthèse protéique musculaire, en raison de leur teneur élevée leucine, de leur bonne digestibilité et de la biodisponibilité postprandiale des AAI (Connolly *et al.* 2023). Par exemple, une disponibilité plus élevée en AAI et un taux de synthèse protéique musculaire supérieur de 47% ont été observés chez des personnes âgées ayant ingéré un repas omnivore contenant du bœuf, par rapport à un repas végétalien iso-protéique et iso-calorique (Pinckaers *et al.* 2023). En prenant en compte ces données, nos résultats pourraient paraître surprenants. Toutefois, ils confirment des études antérieures montrant que certaines protéines végétales peuvent avoir des effets similaires aux protéines animales sur le métabolisme musculaire du rat âgé. Berrazaga *et al.* 2020, et Salles *et al.* 2021, ont en effet montré que le métabolisme protéique peut être soutenu de façon comparable après consommation de caséine et de certaines protéines végétales, telles que les protéines de pois ou de mélanges blé-légumineuses, à condition que les besoins en AAI soient couverts (Berrazaga *et al.* 2020 ; Salles *et al.* 2021). Une étude a révélé que la faible capacité anabolique des protéines végétales peut être compensée par une augmentation de la quantité de protéines ingérées pour couvrir les besoins en AAI. Par exemple, une ingestion plus importante d'un hydrolysate de protéines de blé a permis d'obtenir des taux de synthèse protéique musculaire comparables à ceux observés avec la caséine ou le lactosérum (Gorissen *et al.* 2016). Ainsi, il n'est pas surprenant que les différents régimes de notre étude composés de protéines de tournesol ou de pois, répondant aux besoins en AAI des rats, induisent une réponse anabolique comparable à la caséine. En outre, les protéines végétales, comme celles issues du tournesol, sont naturellement associées à des phyto-nutriments et des fibres. Dans les graines de tournesol, l'acide chlorogénique est le principal polyphénol présent. Bien que ces composés puissent diminuer la digestibilité des protéines (Kaur *et al.* 2022 ; Huang *et al.* 2024), ils semblent également pouvoir produire des effets positifs sur le métabolisme protéique musculaire. En effet, plusieurs phytonutriments, en particulier les polyphénols possédant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Thomas *et al.* 2023) peuvent contribuer à maintenir la masse musculaire (Sun *et al.* 2023). Ces effets sont attribués à la réduction de la dégradation des protéines musculaires en inactivant le facteur nucléaire kappa-B (NF-κB) et en modulant les voies de la protéine kinase activée par les mitogènes (Margină *et al.* 2020 ; Wiedmer *et al.* 2021). En outre, la consommation de fibres alimentaires favorise la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC) (Kao *et al.* 2023), qui jouent un

rôle important dans la préservation de la masse musculaire squelettique. Les AGCC peuvent réduire l'inflammation et activer PGC1 α , un régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale qui favorise un phénotype oxydatif des fibres musculaires et contribue ainsi à préserver la qualité musculaire (Sandri *et al.* 2006 ; Frampton *et al.* 2020 ; Kao *et al.* 2023). Ainsi, la présence de phyto-nutriments et de fibres dans les concentrats de tournesol et de pois pourrait également expliquer leur capacité anabolique comparable à celle de la caséine.

Dans l'étude de Berrazaga *et al.* 2020, la synthèse protéique musculaire induite par la caséine et un mélange blé-légumineuses chez des rats s'est relevée être inférieure à celle induite par des protéines solubles de lait. De même, Jarzaquet *et al.* 2018, ont montré que la réponse anabolique suite à la consommation de lactosérum est supérieure à celle de la caséine (Jarzaquet *et al.* 2018). La teneur élevée en leucine ainsi que l'assimilation rapides de ces protéines pourraient expliquer leur capacité à entraîner une meilleure synthèse protéique musculaire chez le rat âgé (Walrand *et al.* 2016 ; Boirie et Guillet 2018). Par ailleurs, il a été observé que les protéines de soja entraînaient une vidange gastrique relativement lente (Moughan *et al.* 1991), suivie d'une digestion intestinale rapide, provoquant une libération plus précoce des AA dans le sang (Bos *et al.* 2003). Cette cinétique place les protéines de soja comme des protéines intermédiaires, situées entre la caséine et le lactosérum. Par conséquent, bien que l'effet anabolique des protéines végétales de pois et de tournesol soit similaire à celui de la caséine dans notre étude, il est probable que ces protéines aient un effet anabolique moindre comparativement au lactosérum. Ainsi, il serait pertinent d'explorer dans de futures études la comparaison entre les effets des protéines de tournesol et du lactosérum sur le métabolisme protéique musculaire. Cela souligne également l'importance de bien choisir la source protéique de référence pour évaluer les effets des protéines végétales.

En comparaison à d'autres oléagineux, les résultats observés avec les protéines de tournesol sont cohérents avec ceux des protéines de colza et de lin, bien que ces études aient été réalisées sur des populations animales plus jeunes ou d'espèces différentes. Par exemple, Boutry *et al.* 2011 ont montré chez des rats jeunes que la synthèse protéique induite par l'isolat de protéines de colza était similaire à celle induite par des protéines de lait (Boutry *et al.* 2011). De même, Atti *et al.* 2013, ont observé une amélioration de la qualité musculaire chez des agneaux recevant un régime à base de graines de lin extrudées, avec une augmentation du contenu protéique du muscle *longissimus dorsi*, par rapport à un régime à base de tourteau de soja (Atti *et al.* 2013). Ces données confirment le potentiel des protéines oléagineuses à soutenir le métabolisme musculaire, bien que ces résultats ne concernent pas

spécifiquement des modèles animaux vieillissants. Il n'est donc pas surprenant qu'aucune différence significative n'ait été observée entre les protéines de tournesol et la caséine, en accord avec la littérature sur d'autres protéines d'oléagineux.

Par ailleurs, notre étude a révélé qu'un régime riche en ALA, avec un rapport n-6/n-3 de 2,7 n'entraînait pas de différence significative sur les paramètres étudiés du métabolisme protéique musculaire par rapport à un régime caractérisé par un rapport n-6/n-3 de 14,2. Une étude précédente a relevé une amélioration de la teneur en protéines dans les muscles chez des porcs en croissance après consommation d'un régime riche en ALA avec un rapport n-6/n-3 similaire à notre étude. Néanmoins, la majorité des bénéfices rapportés dans la littérature concernent les AG oméga-3 à longue chaîne (EPA et DHA) (Smith *et al.* 2011 ; Lee *et al.* 2020). En effet, l'EPA et le DHA sont caractérisés par des effets anti-inflammatoires supérieurs à ceux de l'ALA, sauf si ce dernier est consommé en grande quantités (Cornish et Chilibeck 2009). Or, la diminution de l'inflammation permet de réduire le processus catabolique lié au vieillissement, en inhibant le facteur de transcription NF- κ B, lequel joue un rôle dans la dégradation des protéines (Lee *et al.* 2020), en réduisant l'expression du protéasome (Doussat *et al.* 2024). De plus, il a été démontré que l'EPA et le DHA agissent sur le processus de synthèse des protéines musculaires en activant la voie de signalisation mTOR/AKT en période post-prandiale (Smith *et al.* 2011). Cependant, en raison de la conversion limitée de l'ALA en EPA et DHA chez l'humain, estimée à 1% pour le DHA et entre 8 et 12% pour l'EPA (Doussat *et al.* 2024), les effets de l'ALA sont moindres comparés à ceux de l'EPA et du DHA. Ainsi, du fait de leur action anti-inflammatoire efficace et de capacité à activer la voie mTOR/AKT, l'EPA et le DHA exercent des effets supérieurs sur le métabolisme musculaire par rapport à l'ALA, dont la conversion en EPA et DHA reste limitée.

Un point important souligné par nos résultats est l'accumulation de lipides intramusculaires, sous forme de DAG et d'AGL, chez les rats nourris avec le régime à base de protéines de tournesol. Cette accumulation de lipides pourrait indiquer une altération du métabolisme lipidique, probablement liée à une diminution de la capacité d'oxydation des AG dans les tissus périphériques. Cette altération pourrait aussi expliquer l'augmentation de la masse grasse observée chez les rats du groupe tournesol (Tardif *et al.* 2014 ; Saponaro *et al.* 2015). En revanche, un taux de masse grasse plus faible a été observée chez les rats nourris avec des protéines de pois, en comparaison avec les rats nourris avec des protéines de tournesol, confirmant les effets hypolipidémiques déjà documentés pour ces protéines (Spielmann *et al.* 2008). De plus, contrairement à une étude suggérant que les ingrédients

protéiques végétaux riches en ALA peuvent moduler favorablement la composition corporelle (Oliva *et al.* 2013), notre étude n'a pas mis en évidence d'effet significatif de l'enrichissement en ALA sur la masse maigre ou sur la masse grasse des rats âgés. L'absence d'effets significatifs observés dans notre étude pourrait s'expliquer par un rapport LA/ALA plus élevé que dans les travaux précédents.

Ainsi, ces résultats renforcent l'idée que les protéines de tournesol pourraient être intégrées dans l'alimentation humaine en tant que sources protéiques de qualité, notamment dans le cadre de régimes visant à soutenir le métabolisme musculaire. Cependant, l'accumulation de lipides intramusculaires observée chez les rats nourris à l'aide de protéines de tournesol soulève des interrogations quant à leur impact potentiel sur les métabolismes lipidiques et énergétiques et l'augmentation de la masse grasse. Ces résultats justifient des études complémentaires afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et d'optimiser les régimes à base de protéines de tournesol chez des personnes âgées. Ainsi, il est essentiel d'élargir ces recherches à des études cliniques afin d'évaluer leur efficacité dans la prévention des altérations métaboliques liées au vieillissement, et pour déterminer comment optimiser leur utilisation dans des régimes alimentaires adaptés à cette population.

4. Conclusion

Cette thèse porte sur l'étude des protéines oléagineuses, et plus particulièrement des protéines de colza et de tournesol, sous trois angles : (1) l'influence de la composition de la matrice alimentaire sur la digestion *in vitro* des protéines et des lipides, (2) l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines oléagineuses, (3) l'effet de la consommation de protéines de tournesol sur le métabolisme protéique musculaire chez le rat âgé. L'objectif était d'approfondir les connaissances des propriétés nutritionnelles de ces protéines, comparées aux protéines de pois et à la caséine, en vue de leur utilisation dans l'alimentation humaine.

Dans la première partie, nous avons mis en évidence que la digestion des protéines et des lipides est un processus complexe, dynamique et interdépendant, fortement influencé par la composition de la matrice alimentaire. Les interactions entre les nutriments influencent la vitesse et l'efficacité de la digestion, mettant en évidence l'importance de prendre en considération non seulement la composition des nutriments, mais aussi leur organisation au sein de la matrice alimentaire. Cet aspect est essentiel pour concevoir des formulations

alimentaires optimisées, favorisant une digestibilité, et donc une assimilation, optimale à la fois des protéines et des lipides.

La deuxième partie de la thèse s'est concentrée sur l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines de tournesol et de colza. La digestibilité *in vitro* et le score IV-PDCAAS des protéines de colza étaient supérieurs à ceux des protéines de pois. Les protéines de tournesol, bien que leur digestibilité ne soit pas significativement différente à celle des pois et de la caséine, nécessitent une complémentation en lysine, un AAI limitant dans cette source, pour améliorer leur qualité nutritionnelle. Ces résultats révèlent que les protéines de tournesol et de colza pourraient constituer des alternatives viables aux protéines animales dans le cadre d'une alimentation équilibrée.

Dans la troisième partie, nous avons examiné l'impact de la consommation de protéines d'un concentrat de tournesol sur le métabolisme protéique musculaire chez le rat âgé. L'étude a révélé que la synthèse et la dégradation des protéines musculaires étaient comparables après la consommation de protéines de tournesol, seules ou en combinaison avec des protéines de pois, à celles induites par la consommation de la caséine. Bien que la perte de masse musculaire avec l'âge ait été observée dans tous les groupes de rats, cette perte n'a pas été augmentée par l'apport en protéines de tournesol, indiquant leur capacité à soutenir le métabolisme musculaire. Cependant, nos résultats suggèrent également que la consommation du concentrat de tournesol seul peut perturber le métabolisme lipidique. Ce point mérite une attention avant de considérer des recommandations nutritionnelles spécifiques chez les personnes âgées.

Ainsi, nos travaux soulignent l'intérêt d'associer des lipides, notamment des AGPI, avec des ingrédients protéiques afin d'améliorer la digestibilité des protéines, tout en mettant en avant le potentiel des protéines de tournesol et de colza comme alternatives aux sources protéiques animales et végétales. Dans cette optique, une approche innovante consisterait à enrichir les formulations protéiques alimentaires avec des AGPI, non seulement pour apporter les bénéfices sur la santé des AGPI, mais aussi pour optimiser la digestibilité des protéines. L'intégration de concentrats de tournesol et de colza dans des aliments tels que des gâteaux ou des pâtes, permettrait de diversifier les sources protéiques tout en garantissant une bonne digestibilité et assimilation protéiques. Ces formulations alimentaires seraient particulièrement pertinentes dans le cadre de la prévention des pathologies impliquant une

perte musculaire, telles que la sarcopénie. Cependant, des études cliniques seront essentielles pour confirmer leur efficacité, en particulier chez les personnes âgées.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABIZANDA P., J.L. NAVARRO, M.I. GARCIA-TOMAS, E. LOPEZ-JIMENEZ, E. MARTINEZ-SANCHEZ et G. PATERNA, 2012 « Validity and usefulness of hand-held dynamometry for measuring muscle strength in community-dwelling older persons », *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 54, 1 : 21-27.
- AHN N. et J.-Y. IMM, 2023 « Effect of phospholipid matrix on emulsion stability, microstructure, proteolysis, and *in vitro* digestibility in model infant formula emulsion », *Food Research International*, 163 : 112218.
- AJOMIWE N., M. BOLAND, S. PHONGTHAI, M. BAGIYAL, J. SINGH et L. KAUR, 2024 « Protein Nutrition: Understanding Structure, Digestibility, and Bioavailability for Optimal Health », *Foods*, 13, 11 : 1771.
- VAN AKEN G.A., 2010 « Relating Food Emulsion Structure and Composition to the Way It Is Processed in the Gastrointestinal Tract and Physiological Responses: What Are the Opportunities? », *Food Biophysics*, 5, 4 : 258-283.
- VAN AKEN G.A., E. BOMHOF, F.D. ZOET, M. VERBEEK et A. OOSTERVELD, 2011 « Differences in *in vitro* gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate », *Food Hydrocolloids*, 25, 4 : 781-788.
- ALEXANDRINO T.D., R.A. FERRARI, L.M. DE OLIVEIRA, R. DE CASSIA S.C. ORMENESE et M.T.B. PACHECO, 2017 « Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions », *LWT*, 84 : 426-432.
- ALMEIDA F.N., J.K. HTOO, J. THOMSON et H.H. STEIN, 2014 « Digestibility by growing pigs of amino acids in heat-damaged sunflower meal and cottonseed meal¹ », *Journal of Animal Science*, 92, 2 : 585-593.
- ANDERSEN J.L., 2003 « Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle », *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 13, 1 : 40-47.
- ANSES, 2007 « Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations », *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. (<https://www.anses.fr/fr/content/apport-en-proteines-consommation-qualite-besoins-et-recommandations-1>), consulté le 30 août 2024.
- ANSES, 2022 « Les acides gras oméga 3 », *Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail*. (<https://www.anses.fr/fr/content/les-acides-gras-om%C3%A9ga-3>), consulté le 30 août 2024.
- ARIËNS R.M.C., S. BASTIAAN-NET, D.B.P.M. VAN DE BERG-SOMHORST, K. EL BACHRIOUI, A. BOUDEWIJN, R.T.M. VAN DEN DOOL, G.A.H. DE JONG, H.J. WICHERS et J.J. MES, 2021 « Comparing nutritional and digestibility aspects of sustainable proteins using the INFOGEST digestion protocol », *Journal of Functional Foods*, 87 : 104748.
- ARRUTIA F., E. BINNER, P. WILLIAMS et K.W. WALDRON, 2020 « Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements », *Trends in Food Science & Technology*, 100 : 88-102.
- ATHERTON P.J. et K. SMITH, 2012 « Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise », *The Journal of Physiology*, 590, Pt 5 : 1049-1057.

- ATTI N., N. METHLOUTHI, C. SAIDI et M. MAHOUACHI, 2013 « Effects of extruded linseed on muscle physicochemical characteristics and fatty acid composition of lambs », *Journal of Applied Animal Research*, 41, 4 : 404-409.
- AUBERTIN-LEHEUDRE M. et H. ADLERCREUTZ, 2009 « Relationship between animal protein intake and muscle mass index in healthy women », *British Journal of Nutrition*, 102, 12 : 1803-1810.
- BAI M., G. QIN, Z. SUN et G. LONG, 2016 « Relationship between Molecular Structure Characteristics of Feed Proteins and Protein In vitro Digestibility and Solubility », *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29, 8 : 1159-1165.
- BANDYOPADHYAY S., S. KASHYAP, J. CALVEZ, S. DEVI, D. AZZOUT-MARNICHE, D. TOME, A.V. KURPAD et C. GAUDICHON, 2022 « Evaluation of Protein Quality in Humans and Insights on Stable Isotope Approaches to Measure Digestibility – A Review », *Advances in Nutrition*, 13, 4 : 1131-1143.
- BARCLAY R.D., N.A. BURD, C. TYLER, N.A. TILLIN et R.W. MACKENZIE, 2019 « The Role of the IGF-1 Signaling Cascade in Muscle Protein Synthesis and Anabolic Resistance in Aging Skeletal Muscle », *Frontiers in Nutrition*, 6.
- BARTKIENE E., G. JUODEIKIENE et D. VIDMANTIENE, 2012 « Nutritional quality of fermented defatted soya and flaxseed flours and their effect on texture and sensory characteristics of wheat sourdough bread », *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63, 6 : 722-729.
- BASILE E.J., M.V. LAUNICO et A.J. SHEER, 2024 « Physiology, Nutrient Absorption ». in *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.
- BATSIS J.A., T.A. MACKENZIE, L.K. BARRE, F. LOPEZ-JIMENEZ et S.J. BARTELS, 2014 « Sarcopenia, sarcopenic obesity and mortality in older adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey III », *European Journal of Clinical Nutrition*, 68, 9 : 1001-1007.
- BEAUBIER S., S. ALBE-SLABI, L. BEAU, O. GALET et R. KAPEL, 2025 « Etude de la digestibilité *in vitro* de concentrés de protéines d'oléagineux comparés à des isolats pour des applications alimentaires », *Food Chemistry*, 464 : 141737.
- BEAUDART C., J.Y. REGINSTER, J. PETERMANS, S. GILLAIN, A. QUABRON, M. LOCQUET, J. SLOMIAN, F. BUCKINX et O. BRUYERE, 2015 « Quality of life and physical components linked to sarcopenia: The SarcoPhAge study », *Experimental Gerontology*, 69 : 103-110.
- BERRAZAGA I., J. SALLES, K. LALEG, C. GUILLET, V. PATRAC, C. GIRAUDET, O. LE BACQUER, M. GUEUGNEAU, P. DENIS, C. POUYET, A. PION, P. SANCHEZ, Y. BOIRIE, V. MICARD et S. WALRAND, 2020 « Anabolic Properties of Mixed Wheat-Legume Pasta Products in Old Rats: Impact on Whole-Body Protein Retention and Skeletal Muscle Protein Synthesis », *Nutrients*, 12, 6 : 1596.
- BERRY S.E., E.A. TYDEMAN, H.B. LEWIS, R. PHALORA, J. ROSBOROUGH, D.R. PICOUT et P.R. ELLIS, 2008 « Manipulation of lipid bioaccessibility of almond seeds influences postprandial lipemia in healthy human subjects¹ », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 4 : 922-929.
- BHASIN S., W.E. TAYLOR, R. SINGH, J. ARTAZA, I. SINHA-HIKIM, R. JASUJA, H. CHOI et N.F. GONZALEZ-CADAVID, 2003 « The Mechanisms of Androgen Effects on Body Composition: Mesenchymal Pluripotent Cell as the Target of Androgen Action », *The Journals of Gerontology: Series A*, 58, 12 : M1103-M1110.
- BIAN A., Y. MA, X. ZHOU, Y. GUO, W. WANG, Y. ZHANG et X. WANG, 2020 « Association between sarcopenia and levels of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the elderly », *BMC Musculoskeletal Disorders*, 21, 1 : 214.

- BIAN A.-L., H.-Y. HU, Y.-D. RONG, J. WANG, J.-X. WANG et X.-Z. ZHOU, 2017 « A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF- α », *European Journal of Medical Research*, 22, 1 : 25.
- BODINE S.C., E. LATRES, S. BAUMHUETER, V.K. LAI, L. NUNEZ, B.A. CLARKE, W.T. POUUEYMIROU, F.J. PANARO, E. NA, K. DHARMARAJAN, Z.Q. PAN, D.M. VALENZUELA, T.M. DECHIARA, T.N. STITT, G.D. YANCOPOULOS et D.J. GLASS, 2001 « Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy », *Science (New York, N.Y.)*, 294, 5547 : 1704-1708.
- BOIRIE Y., M. DANGIN, P. GACHON, M.-P. VASSON, J.-L. MAUBOIS et B. BEAUFRERE, 1997 « Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 26 : 14930-14935.
- BOIRIE Y. et C. GUILLET, 2018 « Fast digestive proteins and sarcopenia of aging », *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 21, 1 : 37.
- BOIRIE Y., C. GUILLET, A. ZANGARELLI, C. GRYSOY et S. WELRAND, 2005 « Altérations du métabolisme protéique au cours du vieillissement », *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 19, 3 : 138-142.
- BOLAND M., 2016 « Human digestion – a processing perspective », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 7 : 2275-2283.
- BONSEGNA S., S. BETTINI, R. PAGANO, A. ZACHEO, V. VERGARO, G. GIOVINAZZO, G. CAMINATI, S. LEPORATTI, L. VALLI et A. SANTINO, 2011 « Plant Oil Bodies: Novel Carriers to Deliver Lipophilic Molecules », *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163, 6 : 792-802.
- BORNHORST G.M. et R. PAUL SINGH, 2014 « Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process », *Annual Review of Food Science and Technology*, 5 : 111-132.
- BØRSHEIM E., Q.-U.T. BUI, S. TISSIER, H. KOBAYASHI, A.A. FERRANDO et R.R. WOLFE, 2008 « Effect of amino acid supplementation on muscle mass, strength and physical function in elderly », *Clinical Nutrition*, 27, 2 : 189-195.
- BOS C., G. AIRINEI, F. MARIOTTI, R. BENAMOZIG, S. BEROT, J. EVRARD, E. FENART, D. TOME et C. GAUDICHON, 2007 « The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans », *The Journal of Nutrition*, 137, 3 : 594-600.
- BOS C., C. GAUDICHON, M.E. PUEYO, C. MORENS, D. TOME, C.C. METGES, K.J. PETZKE, J. EVERWAND et R. BENAMOZIG, 2003 « Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans », *The Journal of Nutrition*, 133, 5 : 1308-1315.
- BOUTRY C., H. FOUILLET, F. MARIOTTI, F. BLACHIER, D. TOME et C. BOS, 2011 « Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats », *Nutrition & Metabolism*, 8, 1 : 52.
- BOYE J., R. WIJESINHA-BETTONI et B. BURLINGAME, 2012 « Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method », *British Journal of Nutrition*, 108, S2 : S183-S211.
- BRODKORB A., L. EGGER, M. ALMINGER, P. ALVITO, R. ASSUNÇÃO, S. BALLANCE, T. BOHN, C. BOURLIEU-LACANAL, R. BOUTROU, F. CARRIERE, A. CLEMENTE, M. CORREDIG, D. DUPONT, C. DUFOUR, C. EDWARDS, M. GOLDING, S. KARAKAYA, B. KIRKHUS, S. LE FEUNTEUN, U. LESMES, A. MACIERZANKA, A.R. MACKIE, C. MARTINS, S. MARZE, D.J. MCCLEMENTS, O. MENARD, M. MINEKUS, R. PORTMANN, C.N. SANTOS, I. SOUCHON, R.P. SINGH, G.E. VEGARUD, M.S.J. WICKHAM, W. WEITSCHIES et I. RECIO, 2019 « INFOGEST

- static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion », *Nature Protocols*, 14, 4 : 991-1014.
- BRYAN D.D.S.L. et H.L. CLASSEN, 2020 « In Vitro Methods of Assessing Protein Quality for Poultry », *Animals*, 10, 4 : 551.
- CALVO-LERMA J., V. FORNES-FERRER, A. HEREDIA et A. ANDRES, 2018 « In Vitro Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components », *Journal of Food Science*, 83, 10 : 2629-2637.
- CANIBE N., M.M. PEDROSA, L.M. ROBREDO et K.E. BACH KNUDSEN, 1999 « Chemical composition, digestibility and protein quality of 12 sunflower (*Helianthus annuus* L) cultivars », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 13 : 1775-1782.
- CAO Y., S. LIU, K. LIU, I.H.R. ABBASI, C. CAI et J. YAO, 2019 « Molecular mechanisms relating to amino acid regulation of protein synthesis », *Nutrition Research Reviews*, 32, 2 : 183-191.
- CAPEL F., A. PINEL et S. WALRAND, 2019 « Accumulation of intramuscular toxic lipids, a link between fat mass accumulation and sarcopenia », *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 26 : np.
- CAPUANO E. et A.E.M. JANSSEN, 2021 « Food Matrix and Macronutrient Digestion », *Annual Review of Food Science and Technology*, 12, Volume 12, 2021 : 193-212.
- CAPUANO E., T. OLIVIERO, V. FOGLIANO et N. PELLEGRINI, 2018a « Role of the food matrix and digestion on calculation of the actual energy content of food », *Nutrition Reviews*, 76, 4 : 274-289.
- CAPUANO E., N. PELLEGRINI, E. NTONE et C.V. NIKIFORIDIS, 2018b « In vitro lipid digestion in raw and roasted hazelnut particles and oil bodies », *Food & Function*, 9, 4 : 2508-2516.
- CARBONARO M., P. MASELLI et A. NUCARA, 2012 « Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study », *Amino Acids*, 43, 2 : 911-921.
- CARRE P., 2021 « Reinventing the oilseeds processing to extract oil while preserving the protein », *OCL*, 28 : 13.
- CARRIERE F., 2013 « La lipolyse gastro-intestinale chez l'homme », *Lipid Nutri +*.
- CASTETS P., S. LIN, N. RION, S. DI FULVIO, K. ROMANINO, M. GURIDI, S. FRANK, L.A. TINTIGNAC, M. SINNREICH et M.A. RÜEGG, 2013 « Sustained Activation of mTORC1 in Skeletal Muscle Inhibits Constitutive and Starvation-Induced Autophagy and Causes a Severe, Late-Onset Myopathy », *Cell Metabolism*, 17, 5 : 731-744.
- CHANG K., J.A. ALBRIGHT, E.J. TESTA, A.B. BALBONI, A.H. DANIELS et E. COHEN, 2023 « Sarcopenia Is Associated with an Increased Risk of Postoperative Complications Following Total Hip Arthroplasty for Osteoarthritis », *Biology*, 12, 2 : 295.
- CHAO C., S. LIANG, Z. ZHANG, M.J. GIDLEY, Y. LIU et S. WANG, 2024 « New Insight into the Effects of Endogenous Protein and Lipids on the Enzymatic Digestion of Starch in Sorghum Flour », *Foods*, 13, 5 : 663.
- CHEN M., L. GUO, J. NSOR-ATINDANA, H.D. GOFF, W. ZHANG, J. MAO et F. ZHONG, 2020 « The effect of viscous soluble dietary fiber on nutrient digestion and metabolic responses I : In vitro digestion process », *Food Hydrocolloids*, 107 : 105971.

- CHEN Q., J. ZHANG, Y. ZHANG et Q. WANG, 2022 « Effect of fatty acid saturation degree on the rheological properties of pea protein and its high-moisture extruded product quality », *Food Chemistry*, 390 : 133139.
- CHEREAU D., P. VIDECOQ, C. RUFFIEUX, L. PICHON, J.-C. MOTTE, S. BELAID, J. VENTUREIRA et M. LOPEZ, 2016 « Combination of existing and alternative technologies to promote oilseeds and pulses proteins in food applications », *OCL*, 23, 4 : D406.
- CHMIELEWSKA A., M. KOZLOWSKA, D. RACHWAL, P. WNUKOWSKI, R. AMAROWICZ, E. NEBESNY et J. ROSICKA-KACZMAREK, 2021 « Canola/rapeseed protein – nutritional value, functionality and food application: a review », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61, 22 : 3836-3856.
- CHURILOV I., L. CHURILOV, R.J. MACISAAC et E.I. EKINCI, 2018 « Systematic review and meta-analysis of prevalence of sarcopenia in post acute inpatient rehabilitation », *Osteoporosis International*, 29, 4 : 805-812.
- COFRADES S. et F. JIMENEZ-COLMENERO, 1998 « Protein molecular interactions involved in the formation of frankfurters: Effect of fat level and heating rate », *Meat Science*, 49, 4 : 411-423.
- COGGAN A.R., R.J. SPINA, D.S. KING, M.A. ROGERS, M.A. ROGERS, M. BROWN, P.M. NEMETH et J.O. HOLLOSZY, 1992 « Histochemical and Enzymatic Comparison of the Gastrocnemius Muscle of Young and Elderly Men and Women », *Journal of Gerontology*, 47, 3 : B71-B76.
- COLES L.T., P.J. MOUGHAN, A. AWATI, A.J. DARRAGH et M.L. ZOU, 2010 « Predicted Apparent Digestion of Energy-Yielding Nutrients Differs between the Upper and Lower Digestive Tracts in Rats and Humans, », *The Journal of Nutrition*, 140, 3 : 469-476.
- CONNOLLY G., J.L. HUDSON, R.E. BERGIA, E.M. DAVIS, A.S. HARTMAN, W. ZHU, C.C. CARROLL et W.W. CAMPBELL, 2023 « Effects of Consuming Ounce-Equivalent Portions of Animal- vs. Plant-Based Protein Foods, as Defined by the Dietary Guidelines for Americans on Essential Amino Acids Bioavailability in Young and Older Adults: Two Cross-Over Randomized Controlled Trials », *Nutrients*, 15, 13 : 2870.
- CORNISH S.M. et P.D. CHILIBECK, 2009 « Alpha-linolenic acid supplementation and resistance training in older adults », *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34, 1 : 49-59.
- CORNISH S.M., D.M. CORDINGLEY, K.A. SHAW, S.C. FORBES, T. LEONHARDT, A. BRISTOL, D.G. CANDOW et P.D. CHILIBECK, 2022 « Effects of Omega-3 Supplementation Alone and Combined with Resistance Exercise on Skeletal Muscle in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis », *Nutrients*, 14, 11 : 2221.
- CORNISH S.M., S.B. MYRIE, E.M. BUGERA, J.E. CHASE, D. TURCZYN et M. PINDER, 2018 « Omega-3 supplementation with resistance training does not improve body composition or lower biomarkers of inflammation more so than resistance training alone in older men », *Nutrition Research*, 60 : 87-95.
- CRUZ-JENTOFT A.J., G. BAHAT, J. BAUER, Y. BOIRIE, O. BRUYERE, T. CEDERHOLM, C. COOPER, F. LANDI, Y. ROLLAND, A.A. SAYER, S.M. SCHNEIDER, C.C. SIEBER, E. TOPINKOVA, M. VANDEWOUDE, M. VISSER et M. ZAMBONI, 2019 « Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis », *Age and Ageing*, 48, 1 : 16-31.
- CRUZ-JENTOFT A.J. et B. MONTERO-ERRASQUIN, 2018 « Sarcopenia ». in R. Roller-Wirnsberger, K. Singler, et M. C. Polidori (dir.): *Learning Geriatric Medicine*. Practical Issues in Geriatrics. 99-105. Cham, Springer International Publishing.
- CRUZ-JENTOFT A.J. et A.A. SAYER, 2019 « Sarcopenia », *The Lancet*, 393, 10191 : 2636-2646.

- CUSTODERO C., R.T. MANKOWSKI, S.A. LEE, Z. CHEN, S. WU, T.M. MANINI, J. HINCAPIE ECHEVERRI, C. SABBA, D.P. BEAVERS, J.A. CAULEY, M.A. ESPELAND, R.A. FIELDING, S.B. KRITCHEVSKY, C.K. LIU, M.M. MCDERMOTT, M.E. MILLER, R.P. TRACY, A.B. NEWMAN, W.T. AMBROSIUS, M. PAHOR et S.D. ANTON, 2018 « Evidence-based nutritional and pharmacological interventions targeting chronic low-grade inflammation in middle-age and older adults: A systematic review and meta-analysis », *Ageing Research Reviews*, 46 : 42-59.
- CUTHBERTSON D., K. SMITH, J. BABRAJ, G. LEESE, T. WADDELL, P. ATHERTON, H. WACKERHAGE, P.M. TAYLOR et M.J. RENNIE, 2005 « Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle », *The FASEB Journal*, 19, 3 : 1-22.
- DALLE S., L. ROSSMEISLOVA et K. KOPPO, 2017 « The Role of Inflammation in Age-Related Sarcopenia », *Frontiers in Physiology*, 8.
- DAMODARAN S., 2007 « Amino Acids, Peptides, and Proteins ». in *Fennema's Food Chemistry*. 229-342. CRC Press.
- DANGIN M., Y. BOIRIE, C. GARCIA-RODENAS, P. GACHON, J. FAUQUANT, P. CALLIER, O. BALLEVRE et B. BEAUFRERE, 2001 « The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention », *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280, 2 : E340-348.
- DANGIN M., Y. BOIRIE, C. GUILLET et B. BEAUFRERE, 2002 « Influence of the Protein Digestion Rate on Protein Turnover in Young and Elderly Subjects », *The Journal of Nutrition*, 132, 10 : 3228S-3233S.
- DANGIN M., C. GUILLET, C. GARCIA-RODENAS, P. GACHON, C. BOUTELOUP-DEMANGE, K. REIFFERS-MAGNANI, J. FAUQUANT, O. BALLEVRE et B. BEAUFRERE, 2003 « The Rate of Protein Digestion affects Protein Gain Differently during Aging in Humans », *The Journal of Physiology*, 549, 2 : 635-644.
- DAO T., A.E. GREEN, Y.A. KIM, S.-J. BAE, K.-T. HA, K. GARIANI, M. LEE, K.J. MENZIES et D. RYU, 2020 « Sarcopenia and Muscle Aging: A Brief Overview », *Endocrinology and Metabolism*, 35, 4 : 716-732.
- DAY L., J.A. CAKEBREAD et S.M. LOVEDAY, 2022 « Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties », *Trends in Food Science & Technology*, 119 : 428-442.
- DAY L., M. GOLDING, M. XU, J. KEOGH, P. CLIFTON et T.J. WOOSTER, 2014 « Tailoring the digestion of structured emulsions using mixed monoglyceride–caseinate interfaces », *Food Hydrocolloids*, 36 : 151-161.
- DE BOEVER P., W. VERSTRAETE et B. DEPLANCKE, 2000 « Fermentation by Gut Microbiota Cultured in a Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem Is Improved by Supplementing a Soygerm Powder », *The Journal of Nutrition*, 130, 10 : 2599-2606.
- DEANE C.S., I.A. ELY, D.J. WILKINSON, K. SMITH, B.E. PHILLIPS et P.J. ATHERTON, 2021 « Dietary protein, exercise, ageing and physical inactivity: interactive influences on skeletal muscle proteostasis », *Proceedings of the Nutrition Society*, 80, 2 : 106-117.
- DELARUE J. et M. BEYLOT, 2007 « Les traceurs isotopiques stables en nutrition humaine : que peut-on faire avec ? », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 6 : 324-335.
- DESCHENES M.R., 2004 « Effects of Aging on Muscle Fibre Type and Size », *Sports Medicine*, 34, 12 : 809-824.

- DILLON E.L., M. SHEFFIELD-MOORE, D. PADDON-JONES, C. GILKISON, A.P. SANFORD, S.L. CASPERSON, J. JIANG, D.L. CHINKES et R.J. URBAN, 2009 « Amino Acid Supplementation Increases Lean Body Mass, Basal Muscle Protein Synthesis, and Insulin-Like Growth Factor-I Expression in Older Women », *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94, 5 : 1630-1637.
- DING M., Z. HUANG, Z. HUANG, Z. ZHAO, D. ZHAO, K. SHAN, W. KE, M. ZHANG, G. ZHOU et C. LI, 2023 « Proteins from different sources in a high-fat food matrix influence lipid hydrolysis through bolus coalescence and interactions with bile salts », *Food Hydrocolloids* : 108748.
- DING M., Z. HUANG, Z. JIN, C. ZHOU, J. WU, D. ZHAO, K. SHAN, W. KE, M. ZHANG, Y. NIAN et C. LI, 2022 « The effect of fat content in food matrix on the structure, rheological properties and digestive properties of protein », *Food Hydrocolloids*, 126 : 107464.
- DIRKS A.J., T. HOFER, E. MARZETTI, M. PAHOR et C. LEEUWENBURGH, 2006 « Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle », *Ageing Research Reviews*, 5, 2 : 179-195.
- DOUSSAT C., T. BRIOCHE, F. CASAS, F. CAPEL et C. FEILLET-COUDRAY, 2024 « Dietary omega 3 fatty acids and skeletal muscle metabolism: a review of clinical and preclinical studies », *OCL*, 31 : 13.
- DUODU C.P., D. ADJEI-BOATENG, R.E. EDZIYIE, N.W. AGBO, G. OWUSU-BOATENG, B.K. LARSEN et P.V. SKOV, 2018 « Processing techniques of selected oilseed by-products of potential use in animal feed: Effects on proximate nutrient composition, amino acid profile and antinutrients », *Animal Nutrition*, 4, 4 : 442-451.
- DUODU K.G., J.R.N. TAYLOR, P.S. BELTON et B.R. HAMAKER, 2003 « Factors affecting sorghum protein digestibility », *Journal of Cereal Science*, 38, 2 : 117-131.
- DUPONT D., M. ALRIC, S. BLANQUET-DIOT, G. BORNHORST, C. CUEVA, A. DEGLAIRE, S. DENIS, M. FERRUA, R. HAVENAAR, J. LELIEVELD, A.R. MACKIE, M. MARZORATI, O. MENARD, M. MINEKUS, B. MIRALLES, I. RECIO et P. VAN DEN ABEELE, 2019 « Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 10 : 1546-1562.
- DUQUE-ESTRADA P., C.C. BERTON-CARABIN, M. NIEUWKOOP, B.L. DEKKERS, A.E.M. JANSSEN et A.J. VAN DER GOOT, 2019 « Protein Oxidation and In Vitro Gastric Digestion of Processed Soy-Based Matrices », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 34 : 9591-9600.
- ERICKSON R.H. et Y.S. KIM, 1990 « Digestion and Absorption of Dietary Protein », *Annual Review of Medicine*, 41, 1 : 133-139.
- ERTL P., W. KNAUS et W. ZOLLITSCH, 2016 « An approach to including protein quality when assessing the net contribution of livestock to human food supply », *animal*, 10, 11 : 1883-1889.
- ESPINAL-RUIZ M., F. PARADA-ALFONSO, L.-P. RESTREPO-SANCHEZ, C.-E. NARVAEZ-CUENCA et D.J. MCCLEMENTS, 2014 « Impact of dietary fibers [methyl cellulose, chitosan, and pectin] on digestion of lipids under simulated gastrointestinal conditions », *Food & Function*, 5, 12 : 3083-3095.
- ESTEVE-SAILLARD M., 2016 « Tendence de marché en France sur la présence des protéines végétales dans les produits alimentaires », *OCL*, 23, 4 : D403.
- ESTEVEZ M. et C. LUNA, 2017 « Dietary protein oxidation: A silent threat to human health? », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 17 : 3781-3793.
- EVANS W.J. et J. LEXELL, 1995 « Human Aging, Muscle Mass, and Fiber Type Composition », *The Journals of Gerontology: Series A*, 50A, Special_Issue : 11-16.

- FAO, « Dietary guidelines and sustainability », *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. site internet (<http://www.fao.org/nutrition/education/dietary-guidelines/background/sustainable-dietary-guidelines/en/>), consulté le 29 octobre 2024.
- FAO, 2013 *Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO Expert Consultation [on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition]*, 31 March - 2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO DATABASE, 2024 « FAOSTAT », site internet (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>), consulté le 20 août 2024.
- FAO/WHO/UNU, 2007 *Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*. World Health Organization.
- FARAG M.D.E.-D.H., 1999 « Effect of radiation and other processing methods on protein quality of sunflower meal », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 12 : 1565-1570.
- FATIMA S., A. REHMAN, K. SHAH, M. KAMRAN, S. MASHAL, S. RUSTAM, M. SABIR, A. NAYAB et M. MUZAMMAL, 2020 « COMPOSITION AND FUNCTION OF SALIVA: A REVIEW », *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 9 : 1552-1567.
- FEKETE M., Z. SZARVAS, V. FAZEKAS-PONGOR, A. FEHER, T. CSIPO, J. FORRAI, N. DOSA, A. PETERFI, A. LEHOCZKI, S. TARANTINI et J.T. VARGA, 2023 « Nutrition Strategies Promoting Healthy Aging: From Improvement of Cardiovascular and Brain Health to Prevention of Age-Associated Diseases », *Nutrients*, 15, 1 : 47.
- FERNANDEZ-CELEMIN L., N. PASKO, V. BLOMART et J.-P. THISSEN, 2002 « Inhibition of muscle insulin-like growth factor I expression by tumor necrosis factor- α », *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283, 6 : E1279-E1290.
- FERRI E., E. MARZETTI, R. CALVANI, A. PICCA, M. CESARI et B. AROSIO, 2020 « Role of Age-Related Mitochondrial Dysfunction in Sarcopenia », *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 15 : 5236.
- FIELDING R.A., B. VELLAS, W.J. EVANS, S. BHASIN, J.E. MORLEY, A.B. NEWMAN, G. ABELLAN VAN KAN, S. ANDRIEU, J. BAUER, D. BREUILLE, T. CEDERHOLM, J. CHANDLER, C. DE MEYNARD, L. DONINI, T. HARRIS, A. KANNT, F. KEIME GUIBERT, G. ONDER, D. PAPANICOLAOU, Y. ROLLAND, D. ROOKS, C. SIEBER, E. SOUHAMI, S. VERLAAN et M. ZAMBONI, 2011 « Sarcopenia: An Undiagnosed Condition in Older Adults. Current Consensus Definition: Prevalence, Etiology, and Consequences. International Working Group on Sarcopenia », *Journal of the American Medical Directors Association*, 12, 4 : 249-256.
- FINN P.F. et J.F. DICE, 2006 « Proteolytic and lipolytic responses to starvation », *Nutrition*, 22, 7 : 830-844.
- FLEDDERMANN M., A. FECHNER, A. RÖBLER, M. BÄHR, A. PASTOR, F. LIEBERT et G. JAHREIS, 2013 « Nutritional evaluation of rapeseed protein compared to soy protein for quality, plasma amino acids, and nitrogen balance – A randomized cross-over intervention study in humans », *Clinical Nutrition*, 32, 4 : 519-526.
- FRAMPTON J., K.G. MURPHY, G. FROST et E.S. CHAMBERS, 2020 « Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function », *Nature Metabolism*, 2, 9 : 840-848.
- FRONTERA W.R. et J. OCHALA, 2015 « Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function », *Calcified Tissue International*, 96, 3 : 183-195.

- FRY C.S., M.J. DRUMMOND, E.L. GLYNN, J.M. DICKINSON, D.M. GUNDERMANN, K.L. TIMMERMAN, D.K. WALKER, S. DHANANI, E. VOLPI et B.B. RASMUSSEN, 2011 « Aging impairs contraction-induced human skeletal muscle mTORC1 signaling and protein synthesis », *Skeletal Muscle*, 1, 1 : 11.
- GALLIER S., D. ACTON, M. GARG et H. SINGH, 2017 « Natural and processed milk and oil body emulsions: Bioavailability, bioaccessibility and functionality », *Food Structure*, 13 : 13-23.
- GALLIER S. et H. SINGH, 2012 « Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion », *Food & Function*, 3, 5 : 547-555.
- GANAPATHY V., 2012 « Protein Digestion and Absorption ». in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 1595-1623. Elsevier.
- GAUDICHON C., 2013 *Chapitre 19 Les modèles humains. Structure des aliments et effets nutritionnels*. Editions Quae.
- GHOSH S., R. LERTWATTANARAK, N. LEFORT, M. MOLINA-CARRION, J. JOYA-GALEANA, B.P. BOWEN, J. de J. GARDUNO-GARCIA, M. ABDUL-GHANI, A. RICHARDSON, R.A. DEFRONZO, L. MANDARINO, H. VAN REMMEN et N. MUSI, 2011 « Reduction in Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria From Elderly Subjects With Normal and Impaired Glucose Tolerance », *Diabetes*, 60, 8 : 2051-2060.
- GILANI G.S., C.W. XIAO et K.A. COCKELL, 2012 « Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality », *British Journal of Nutrition*, 108, S2 : S315-S332.
- GONZALEZ-PEREZ S. et J.M. VEREIJKEN, 2007 « Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties », *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 12 : 2173-2191.
- GONZALEZ-VEGA J.C. et H.H. STEIN, 2012 « Amino acid digestibility in canola, cottonseed, and sunflower products fed to finishing pigs », *Journal of Animal Science*, 90, 12 : 4391-4400.
- GORISSEN S.H., A.M. HORSTMAN, R. FRANSSSEN, J.J. CROMBAG, H. LANGER, J. BIERAU, F. RESPONDEK et L.J. VAN LOON, 2016 « Ingestion of Wheat Protein Increases In Vivo Muscle Protein Synthesis Rates in Healthy Older Men in a Randomized Trial123 », *The Journal of Nutrition*, 146, 9 : 1651-1659.
- GOUSPILLOU G., N. SGARIOTO, S. KAPCHINSKY, F. PURVES-SMITH, B. NORRIS, C.H. PION, S. BARBAT-ARTIGAS, F. LEMIEUX, T. TAIVASSALO, J.A. MORAIS, M. AUBERTIN-LEHEUDRE et R.T. HEPPEL, 2014 « Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans », *The FASEB Journal*, 28, 4 : 1621-1633.
- GROEN B.B.L., A.M. HORSTMAN, H.M. HAMER, M. de HAAN, J. van KRANENBURG, J. BIERAU, M. POEZE, W.K.W.H. WODZIG, B.B. RASMUSSEN et L.J.C. van LOON, 2015 « Post-Prandial Protein Handling: You Are What You Just Ate », *PLOS ONE*, 10, 11 : e0141582.
- GRUNDY M.M.-L., C.H. EDWARDS, A.R. MACKIE, M.J. GIDLEY, P.J. BUTTERWORTH et P.R. ELLIS, 2016a « Re-evaluation of the mechanisms of dietary fibre and implications for macronutrient bioaccessibility, digestion and postprandial metabolism », *British Journal of Nutrition*, 116, 5 : 816-833.
- GRUNDY M.M.-L., K. LAPSLEY et P.R. ELLIS, 2016b « A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds », *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 9 : 1937-1946.

- GUEGUEN J., S. WALRAND et O. BOURGEOIS, 2016 « Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 51, 4 : 177-185.
- GUEVARA-ZAMBRANO J.M., S.H.E. VERKEMPINCK, L. HERNANDEZ-RUIZ, M.R. INFANTES-GARCIA, M.E. HENDRICKX, A.M. VAN LOEY et T. GRAUWET, 2022 « Digestion kinetics of lipids and proteins in plant-based shakes: Impact of processing conditions and resulting structural properties », *Food Chemistry*, 382 : 132306.
- GUILLET C., M. PROD'HOMME, M. BALAGE, P. GACHON, C. GIRAUDET, L. MORIN, J. GRIZARD et Y. BOIRIE, 2004 « Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans », *The FASEB Journal*, 18, 13 : 1586-1587.
- GUO Q., A. YE, N. BELLISSIMO, H. SINGH et D. ROUSSEAU, 2017 « Modulating fat digestion through food structure design », *Progress in Lipid Research*, 68 : 109-118.
- GUO Q., A. YE, M. LAD, D. DALGLEISH et H. SINGH, 2014 « Effect of gel structure on the gastric digestion of whey protein emulsion gels », *Soft Matter*, 10, 8 : 1214-1223.
- HAHM S.-W., H. SON, W. KIM, Y.-K. OH et Y.-S. SON, 2013 « Effects of Gamma Irradiation on Nutrient Composition, Anti-nutritional Factors, In vitro Digestibility and Ruminant Degradation of Whole Cotton Seed », *Journal of Animal Science and Technology*, 55, 2 : 123-130.
- HALLDORSOTTIR S., J. CARMODY, C.N. BOOZER, C.A. LEDUC et R.L. LEIBEL, 2009 « Reproducibility and accuracy of body composition assessments in mice by dual energy x-ray absorptiometry and time domain nuclear magnetic resonance », *International journal of body composition research*, 7, 4 : 147-154.
- HERREMAN L., P. NOMMENSEN, B. PENNINGNS et M.C. LAUS, 2020 « Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score », *Food Science & Nutrition*, 8, 10 : 5379-5391.
- HERTZLER S.R., J.C. LIEBLEIN-BOFF, M. WEILER et C. ALLGEIER, 2020 « Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function », *Nutrients*, 12, 12 : 3704.
- HOPPELER H., 2016 « Molecular networks in skeletal muscle plasticity » S. L. Lindstedt et H. H. Hoppeler (dir.), *Journal of Experimental Biology*, 219, 2 : 205-213.
- HU J.-L., S.-P. NIE, C. LI et M.-Y. XIE, 2013 « In vitro effects of a novel polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. on intestinal function », *International Journal of Biological Macromolecules*, 54 : 264-269.
- HUANG R.-Y., K.-C. YANG, H.-H. CHANG, L.-T. LEE, C.-W. LU et K.-C. HUANG, 2016 « The Association between Total Protein and Vegetable Protein Intake and Low Muscle Mass among the Community-Dwelling Elderly Population in Northern Taiwan », *Nutrients*, 8, 6 : 373.
- HUANG X., Y. LI, C. CUI et D. SUN-WATERHOUSE, 2024 « Structural, functional properties, and in vitro digestibility of sunflower protein concentrate as affected by extraction method: Isoelectric precipitation vs ultrafiltration », *Food Chemistry*, 439 : 138090.
- HUANG Y.-H., W.-C. CHIU, Y.-P. HSU, Y.-L. LO et Y.-H. WANG, 2020 « Effects of Omega-3 Fatty Acids on Muscle Mass, Muscle Strength and Muscle Performance among the Elderly: A Meta-Analysis », *Nutrients*, 12, 12 : 3739.
- HUR S.J., B.O. LIM, E.A. DECKER et D.J. MCCLEMENTS, 2011 « In vitro human digestion models for food applications », *Food Chemistry*, 125, 1 : 1-12.

- ISANEJAD M., J. MURSU, J. SIROLA, H. KRÖGER, T. RIKKONEN, M. TUPPURAINEN et A.T. ERKKILÄ, 2015 « Association of protein intake with the change of lean mass among elderly women: The Osteoporosis Risk Factor and Prevention – Fracture Prevention Study (OSTPRE-FPS) », *Journal of Nutritional Science*, 4 : e41.
- ISANEJAD M., B. TAJIK, A. MCARDLE, M. TUPPURAINEN, J. SIROLA, H. KRÖGER, T. RIKKONEN et A. ERKKILÄ, 2022 « Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid and alpha-linolenic acid are associated with physical capacity measure but not muscle mass in older women 65–72 years », *European Journal of Nutrition*, 61, 4 : 1813-1821.
- ISMAIL B.P., L. SENARATNE-LENAGALA, A. STUBE et A. BRACKENRIDGE, 2020 « Protein demand: review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production », *Animal Frontiers*, 10, 4 : 53-63.
- JACKMAN R.W. et S.C. KANDARIAN, 2004 « The molecular basis of skeletal muscle atrophy », *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287, 4 : C834-843.
- JANNAS-VELA S., A. ESPINOSA, A.A. CANDIA, M. FLORES-OPAZO, L. PEÑAILILLO et R. VALENZUELA, 2023 « The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Lipid Mediators on Skeletal Muscle Regeneration: A Narrative Review », *Nutrients*, 15, 4 : 871.
- JARZAGUET M., S. POLAKOF, J. DAVID, C. MIGNE, G. JOUBREL, T. EFSTATHIOU, D. REMOND, L. MOSONI et D. DARDEVET, 2018 « A meal with mixed soy/whey proteins is as efficient as a whey meal in counteracting the age-related muscle anabolic resistance only if the protein content and leucine levels are increased », *Food & Function*, 9, 12 : 6526-6534.
- JIMENEZ-MUNOZ L., M. TORP NIELSEN, L. ROMAN et M. CORREDIG, 2023 « Variation of *in vitro* digestibility of pea protein powder dispersions from commercially available sources », *Food Chemistry*, 401 : 134178.
- JIMENEZ-MUNOZ L.M., G.M. TAVARES et M. CORREDIG, 2021 « Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality », *Trends in Food Science & Technology*, 113 : 139-150.
- JOANISSE S., J. MCKENDRY, C. LIM, E.A. NUNES, T. STOKES, J.C. MCLEOD et S.M. PHILLIPS, 2021 « Understanding the effects of nutrition and post-exercise nutrition on skeletal muscle protein turnover: Insights from stable isotope studies », *Clinical Nutrition Open Science*, 36 : 56-77.
- JONES S.W., R.J. HILL, P.A. KRASNEY, B. O'CONNOR, N. PEIRCE et P.L. GREENHAFF, 2004 « Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass », *The FASEB Journal*, 18, 9 : 1025-1027.
- JONES T.E., K.W. STEPHENSON, J.G. KING, K.R. KNIGHT, T.L. MARSHALL et W.B. SCOTT, 2009 « Sarcopenia - Mechanisms and Treatments », *Journal of Geriatric Physical Therapy*, 32, 2 : 39-45.
- JOYE I., 2019 « Protein Digestibility of Cereal Products », *Foods*, 8, 6 : 199.
- KADAM D.M., M. KUMAR et A. KASARA, 2021 « Application of high energy electromagnetic radiations in elimination of anti-nutritional factors from oilseeds », *LWT*, 151 : 112085.
- KAO C.-C., Z.-Y. YANG et W.-L. CHEN, 2023 « The association between dietary fiber intake and sarcopenia », *Journal of Functional Foods*, 102 : 105437.
- KATSANOS C.S., H. KOBAYASHI, M. SHEFFIELD-MOORE, A. AARSLAND et R.R. WOLFE, 2006 « A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by

- essential amino acids in the elderly », *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291, 2 : E381-E387.
- KAUR L., B. MAO, A.S. BENIWAL, ABHILASHA, R. KAUR, F.M. CHIAN et J. SINGH, 2022 « Alternative proteins vs animal proteins: The influence of structure and processing on their gastro-small intestinal digestion », *Trends in Food Science & Technology*, 122 : 275-286.
- KELLER K., 2019 « Sarcopenia », *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 169, 7-8 : 157-172.
- KIMBALL S.R., 2014 « Integration of signals generated by nutrients, hormones, and exercise in skeletal muscle1234 », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 1 : 237S-242S.
- KORCZAK R. et J.L. SLAVIN, 2020 « Definitions, regulations, and new frontiers for dietary fiber and whole grains », *Nutrition Reviews*, 78, Supplement_1 : 6-12.
- KOTECKA-MAJCHRZAK K., A. SUMARA, E. FORMAL et M. MONTOWSKA, 2020 « Oilseed proteins – Properties and application as a food ingredient », *Trends in Food Science & Technology*, 106 : 160-170.
- KUMAR V., A. SELBY, D. RANKIN, R. PATEL, P. ATHERTON, W. HILDEBRANDT, J. WILLIAMS, K. SMITH, O. SEYNNES, N. HISCOCK et M.J. RENNIE, 2009 « Age-related differences in the dose–response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men », *The Journal of Physiology*, 587, 1 : 211-217.
- KUNZ P., C. FEINLE-BISSET, H. FAAS, P. BOESIGER, M. FRIED, A. STEINGÖTTER et W. SCHWIZER, 2005 « Effect of ingestion order of the fat component of a solid meal on intragastric fat distribution and gastric emptying assessed by MRI », *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 21, 4 : 383-390.
- LANDI F., R. LIPEROTI, D. FUSCO, S. MASTROPAOLO, D. QUATTROCIOCCHI, A. PROIA, A. RUSSO, R. BERNABEI et G. ONDER, 2012 « Prevalence and Risk Factors of Sarcopenia Among Nursing Home Older Residents », *The Journals of Gerontology: Series A*, 67A, 1 : 48-55.
- LE FEUNTEUN S., S. VERKEMPINCK, J. FLOURY, A. JANSSEN, A. KONDOYAN, S. MARZE, P.-S. MIRADE, A. PLUSCHKE, J. SICARD, G. VAN AKEN et T. GRAUWET, 2021 « Mathematical modelling of food hydrolysis during *in vitro* digestion: From single nutrient to complex foods in static and dynamic conditions », *Trends in Food Science & Technology*, 116 : 870-883.
- LECKER S.H., A.L. GOLDBERG et W.E. MITCH, 2006 « Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States », *Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 7 : 1807.
- LEE J.H., J.H. JEON et M.J. LEE, 2020 « Docosahexaenoic Acid, a Potential Treatment for Sarcopenia, Modulates the Ubiquitin–Proteasome and the Autophagy–Lysosome Systems », *Nutrients*, 12, 9 : 2597.
- LEE S., K. JO, H.I. YONG, Y.-S. CHOI et S. JUNG, 2021 « Comparison of the *in vitro* protein digestibility of *Protaetia brevitarsis* larvae and beef loin before and after defatting », *Food Chemistry*, 338 : 128073.
- LEGER B., W. DERAIVE, K. DE BOCK, P. HESPEL et A.P. RUSSELL, 2008 « Human Sarcopenia Reveals an Increase in SOCS-3 and Myostatin and a Reduced Efficiency of Akt Phosphorylation », *Rejuvenation Research*, 11, 1 : 163-175B.
- LEXELL J., K. HENRIKSSON-LARSEN, B. WINBLAD et M. SJÖSTRÖM, 1983 « Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: Effects of aging studied in whole muscle cross sections », *Muscle & Nerve*, 6, 8 : 588-595.

- LI C., D. SHI, A.K. STONE, Y. WANG, J.P.D. WANASUNDARA, T. TANAKA et M.T. NICKERSON, 2023 « Effect of solid-state fermentation on select antinutrients and protein digestibility of cold-pressed and hexane-extracted canola meals », *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 100, 7 : 529-538.
- LI C., W. YU, P. WU et X.D. CHEN, 2020 « Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract », *Trends in Food Science & Technology*, 96 : 114-126.
- LUNDIN L., M. GOLDING et T.J. WOOSTER, 2008 « Understanding food structure and function in developing food for appetite control », *Nutrition & Dietetics*, 65, s3 : S79-S85.
- LUO C., R. LIU, X. SHEN, G. ZHANG et B. LIU, 2024 « Possible sarcopenia and risk of hip fracture in older adults in China », *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 117 : 105248.
- MA M., H. ZHANG, Y. XIE, M. YANG, J. TANG, P. WANG, R. YANG et Z. GU, 2020 « Response of nutritional and functional composition, anti-nutritional factors and antioxidant activity in germinated soybean under UV-B radiation », *LWT*, 118 : 108709.
- MACIERZANKA A., A.I. SANCHO, E.N.C. MILLS, N.M. RIGBY et A.R. MACKIE, 2009 « Emulsification alters simulated gastrointestinal proteolysis of β -casein and β -lactoglobulin », *Soft Matter*, 5, 3 : 538-550.
- MACKIE A. et A. MACIERZANKA, 2010 « Colloidal aspects of protein digestion », *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 1 : 102-108.
- MAEDA N., D. DULKO, A. MACIERZANKA et C. JUNGNIKEL, 2022 « Analysis of the Factors Affecting Static In Vitro Pepsinolysis of Food Proteins », *Molecules*, 27, 4 : 1260.
- MAGNE H., 2011 « Atrophie et récupération musculaire chez le rat âgé immobilisé : rôle de la nutrition ». phdthesis, Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I.
- MAHLER H.-C., W. FRIESS, U. GRAUSCHOPF et S. KIESE, 2009 « Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 9 : 2909-2934.
- MANDALARI G., R.M. FAULKS, G.T. RICH, V. LO TURCO, D.R. PICOUT, R.B. LO CURTO, G. BISIGNANO, P. DUGO, G. DUGO, K.W. WALDRON, P.R. ELLIS et M.S.J. WICKHAM, 2008 « Release of Protein, Lipid, and Vitamin E from Almond Seeds during Digestion », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9 : 3409-3416.
- MANDALARI G., A.M. MACKIE, N.M. RIGBY, M.S.J. WICKHAM et E.N.C. MILLS, 2009 « Physiological phosphatidylcholine protects bovine β -lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis », *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, S1 : S131-S139.
- MARAMBE H.K., P.J. SHAND et J.P.D. WANASUNDARA, 2013 « In vitro digestibility of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein: effect of seed mucilage, oil and thermal processing », *International Journal of Food Science & Technology*, 48, 3 : 628-635.
- MARGINA D., A. UNGURIANU, C. PURDEL, G.M. NIȚULESCU, D. TSOUKALAS, E. SARANDI, M. THANASOULA, T.I. BURYKINA, F. TEKOS, A. BUHA, D. NIKITOVIC, D. KOURETAS et A.M. TSATSAKIS, 2020 « Analysis of the intricate effects of polyunsaturated fatty acids and polyphenols on inflammatory pathways in health and disease », *Food and Chemical Toxicology*, 143 : 111558.
- MARIOTTI F., D. TOME et P.P. MIRAND, 2008 « Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 2 : 177-184.

- MARKOFSKI M.M., J.M. DICKINSON, M.J. DRUMMOND, C.S. FRY, S. FUJITA, D.M. GUNDERMANN, E.L. GLYNN, K. JENNINGS, D. PADDON-JONES, P.T. REIDY, M. SHEFFIELD-MOORE, K.L. TIMMERMAN, B.B. RASMUSSEN et E. VOLPI, 2015 « Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women », *Experimental Gerontology*, 65 : 1-7.
- MARTEL G.F., S.M. ROTH, F.M. IVEY, J.T. LEMMER, B.L. TRACY, D.E. HURLBUT, E.J. METTER, B.F. HURLEY et M.A. ROGERS, 2006 « Age and sex affect human muscle fibre adaptations to heavy-resistance strength training », *Experimental Physiology*, 91, 2 : 457-464.
- MARTINEZ-VELASCO A., J. ALVAREZ-RAMIREZ, E. RODRIGUEZ-HUEZO, M. MERAZ-RODRIGUEZ, E.J. VERNON-CARTER et C. LOBATO-CALLEROS, 2018 « Effect of the preparation method and storage time on the *in vitro* protein digestibility of maize tortillas », *Journal of Cereal Science*, 84 : 7-12.
- MARZE S., 2022 « Méthodes *in vitro* pour l'étude de la digestion des aliments », *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 57, 2 : 139-147.
- MAT D.J.L., T. CATTENOZ, I. SOUCHON, C. MICHON et S. LE FEUNTEUN, 2018 « Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: *In vitro* gastric digestions in static and dynamic pH conditions », *Food Chemistry*, 239 : 268-275.
- MAT D.J.L., S. LE FEUNTEUN, C. MICHON et I. SOUCHON, 2016 « *In vitro* digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids », *Food Research International*, 88 : 226-233.
- MATHAI J.K., Y. LIU et H.H. STEIN, 2017 « Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS) », *British Journal of Nutrition*, 117, 4 : 490-499.
- MATTILA P.H., J.-M. PIHLAVA, J. HELLSTRÖM, M. NURMI, M. EUROLA, S. MÄKINEN, T. JALAVA et A. PIHLANTO, 2018 « Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products », *Food Quality and Safety*, 2, 4 : 213-219.
- MCGLORY C., S.H.M. GORISSEN, M. KAMAL, R. BAHNIWAL, A.J. HECTOR, S.K. BAKER, A. CHABOWSKI et S.M. PHILLIPS, 2019 « Omega-3 fatty acid supplementation attenuates skeletal muscle disuse atrophy during two weeks of unilateral leg immobilization in healthy young women », *The FASEB Journal*, 33, 3 : 4586-4597.
- MEGANAHARSHINI M., V. SUDHAKAR, N. DHIVYA BHARATHI et S. DEEPAK, 2023 « Review on recent trends in the application of protein concentrates and isolates – A food industry perspective », *Food and Humanity*, 1 : 308-325.
- MELCHIOR S., M. MORETTON, M. ALONGI, S. CALLIGARIS, M. CRISTINA NICOLI et M. ANESE, 2023 « Comparison of protein *in vitro* digestibility under adult and elderly conditions: The case study of wheat, pea, rice, and whey proteins », *Food Research International*, 163 : 112147.
- MENARD O., U. LESMES, C. S. SHANI-LEVI, A.A. CALAHORRA, A. LAVOISIER, M. MORZEL, A. RIEDER, G. FERON, S. NEBBIA, L. MASHIAH, A. ANDRES, G. BORNHORST, F. CARRIERE, L. EGGER, S. GWALA, A. HEREDIA, B. KIRKHUS, A. MACIERZANKA, R. PORTMAN, I. RECIO, V. SANTE-LHOUTELLIER, C. TOURNIER, A. SARKAR, A. BRODKORB, A. MACKIE et D. DUPONT, 2023 « Static *in vitro* digestion model adapted to the general older adult population: an INFOGEST international consensus », *Food & Function*, 14, 10 : 4569-4582.
- MENARD O., D. PICQUE et D. DUPONT, 2015 « The DIDGI® System ». *in* K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, et H. Wichers (dir.): *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH), Springer.

- MINEKUS M., 2015 « The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM) ». in K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, et H. Wichers (dir.): *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH), Springer.
- MINEKUS M., M. ALMINGER, P. ALVITO, S. BALLANCE, T. BOHN, C. BOURLIEU, F. CARRIERE, R. BOUTROU, M. CORREDIG, D. DUPONT, C. DUFOUR, L. EGGER, M. GOLDING, S. KARAKAYA, B. KIRKHUS, S.L. FEUNTEUN, U. LESMES, A. MACIERZANKA, A. MACKIE, S. MARZE, D. J. MCCLEMENTS, O. MENARD, I. RECIO, C. N. SANTOS, R. P. SINGH, G. E. VEGARUD, M.S. J. WICKHAM, W. WEITSCHIES et A. BRODKORB, 2014 « A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus », *Food & Function*, 5, 6 : 1113-1124.
- MITCH W.E. et A.L. GOLDBERG, 1996 « Mechanisms of Muscle Wasting — The Role of the Ubiquitin–Proteasome Pathway », *New England Journal of Medicine*, 335, 25 : 1897-1905.
- MOORE D.R., T.A. CHURCHWARD-VENNE, O. WITARD, L. BREEN, N.A. BURD, K.D. TIPTON et S.M. PHILLIPS, 2015 « Protein Ingestion to Stimulate Myofibrillar Protein Synthesis Requires Greater Relative Protein Intakes in Healthy Older Versus Younger Men », *The Journals of Gerontology: Series A*, 70, 1 : 57-62.
- MORLEY J.E., S.D. ANKER et S. VON HAEHLING, 2014 « Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia: facts, numbers, and epidemiology—update 2014 », *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 5, 4 : 253-259.
- MOUGHAN P.J., 2023 « Use of Isotope-Labeled Body or Dietary Proteins to Determine Dietary Amino Acid Digestibility », *The Journal of Nutrition*, 153, 7 : 1858-1865.
- MOUGHAN P.J., P.D. CRANWELL et W.C. SMITH, 1991 « An Evaluation With Piglets of Bovine Milk, Hydrolyzed Bovine Milk, and Isolated Soybean Proteins Included in Infant Milk Formulas. II. Stomach-Emptying Rate and the Postprandial Change in Gastric pH and Milk-Clotting Enzyme Activity », *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 12, 2 : 253-259.
- MOURE A., J. SINEIRO, H. DOMINGUEZ et J.C. PARAJO, 2006 « Functionality of oilseed protein products: A review », *Food Research International*, 39, 9 : 945-963.
- MULET-CABERO A.-I., L. EGGER, R. PORTMANN, O. MENARD, S. MARZE, M. MINEKUS, S.L. FEUNTEUN, A. SARKAR, M. M.-L. GRUNDY, F. CARRIERE, M. GOLDING, D. DUPONT, I. RECIO, A. BRODKORB et A. MACKIE, 2020 « A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus », *Food & Function*, 11, 2 : 1702-1720.
- MULET-CABERO A.-I., N.M. RIGBY, A. BRODKORB et A.R. MACKIE, 2017 « Dairy food structures influence the rates of nutrient digestion through different *in vitro* gastric behaviour », *Food Hydrocolloids*, 67 : 63-73.
- MURPHY C.H., N.I. SADDLER, M.C. DEVRIES, C. MCGLORY, S.K. BAKER et S.M. PHILLIPS, 2016 « Leucine supplementation enhances integrative myofibrillar protein synthesis in free-living older men consuming lower- and higher-protein diets: a parallel-group crossover study1 », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 104, 6 : 1594-1606.
- MURTON A.J., D. CONSTANTIN et P.L. GREENHAFF, 2008 « The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1782, 12 : 730-743.
- NARICI M.V. et N. MAFFULLI, 2010 « Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance », *British Medical Bulletin*, 95, 1 : 139-159.

- NASIMI N., Z. SOHRABI, E.A. NUNES, E. SADEGHI, S. JAMSHIDI, Z. GHOLAMI, M. AKBARZADEH, S. FAGHIH, M. AKHLAGHI et S.M. PHILLIPS, 2023 « Whey Protein Supplementation with or without Vitamin D on Sarcopenia-Related Measures: A Systematic Review and Meta-Analysis », *Advances in Nutrition*, 14, 4 : 762-773.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995 « Nutrient Requirements of the Laboratory Rat ». in *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995*. National Academies Press (US).
- NATIONS F. and A.O. of the U., 1991 *Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA 4-8 December 1989*. Food & Agriculture Org.
- NATIONS UNIES, s. d. « Population | Nations Unies », *United Nations*. site internet (<https://www.un.org/fr/global-issues/population>), consulté le 20 août 2024.
- NIKBAKHT NASRABADI M., S.A.H. GOLI, A. SEDAGHAT DOOST, B. ROMAN, K. DEWETTINCK, C.V. STEVENS et P. VAN DER MEEREN, 2019 « Plant based Pickering stabilization of emulsions using soluble flaxseed protein and mucilage nano-assemblies », *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 563 : 170-182.
- NILWIK R., T. SNIJDERS, M. LEENDERS, B.B.L. GROEN, J. VAN KRANENBURG, L.B. VERDIJK et L.J.C. VAN LOON, 2013 « The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size », *Experimental Gerontology*, 48, 5 : 492-498.
- NISHIKAWA H., S. FUKUNISHI, A. ASAI, K. YOKOHAMA, S. NISHIGUCHI et K. HIGUCHI, 2021 « Pathophysiology and mechanisms of primary sarcopenia (Review) », *International Journal of Molecular Medicine*, 48, 2 : 1-8.
- NØRGAARD J.V., J.A. FERNANDEZ et H. JØRGENSEN, 2012 « Ileal digestibility of sunflower meal, pea, rapeseed cake, and lupine in pigs », *Journal of Animal Science*, 90, suppl_4 : 203-205.
- NOSWORTHY M.G., J. NEUFELD, P. FROHLICH, G. YOUNG, L. MALCOLMSON et J.D. HOUSE, 2017 « Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses », *Food Science & Nutrition*, 5, 4 : 896-903.
- OLIVA M.E., M.R. FERREIRA, A. CHICCO et Y.B. LOMBARDO, 2013 « Dietary Salba (*Salvia hispanica* L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats », *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89, 5 : 279-289.
- OMS, WHO, s. d. « World Health Organization (WHO) », site internet (<https://www.who.int>), consulté le 19 septembre 2024.
- OPAZO-NAVARRETE M., D. TAGLE FREIRE, R.M. BOOM et A.E.M. JANSSEN, 2019 « The Influence of Starch and Fibre on In Vitro Protein Digestibility of Dry Fractionated Quinoa Seed (Riobamba Variety) », *Food Biophysics*, 14, 1 : 49-59.
- OSBORNE T.B., L.B. MENDEL, E.L. FERRY et A.J. WAKEMAN, 1914 « NUTRITIVE PROPERTIES OF PROTEINS OF THE MAIZE KERNEL », *Journal of Biological Chemistry*, 18, 1 : 1-16.
- OUYANG Y., F. HUANG, X. ZHANG, L. LI, B. ZHANG, Z. WANG et H. WANG, 2022 « Association of Dietary Protein Intake with Muscle Mass in Elderly Chinese: A Cross-Sectional Study », *Nutrients*, 14, 23 : 5130.
- PAPADOPOULOU S.K., G. VOULGARIDOU, F.S. KONDYLI, M. DRAKAKI, K. SIANIDOU, R. ANDRIANOPOULOU, N. RODOPIAOS et A. PRITSA, 2022 « Nutritional and Nutrition-Related Biomarkers as Prognostic Factors of Sarcopenia, and Their Role in Disease Progression », *Diseases*, 10, 3 : 42.

- PAZ-YEPEZ C., I. PEINADO, A. HEREDIA et A. ANDRES, 2019 « Influence of particle size and intestinal conditions on in vitro lipid and protein digestibility of walnuts and peanuts », *Food Research International*, 119 : 951-959.
- PERAM M.R., S.M. LOVEDAY, A. YE et H. SINGH, 2013 « In vitro gastric digestion of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin », *Journal of Dairy Science*, 96, 1 : 63-74.
- PETRUSAN J.-I., H. RAWEL et G. HUSCHEK, 2016 « Protein-rich vegetal sources and trends in human nutrition: A review », *Current Topics in Peptide and Protein Research*, János-István Petrusán, Harshadrai Rawel and Gerd Huschek, 2016, Protein-rich vegetal sources and trends in human nutrition: A review, *Current Topics in Peptide&Protein Research*, Vol. 17, 1 –19 : 1-19.
- PINCKAERS P.J., J. DOMIC, H.L. PETRICK, A.M. HOLWERDA, J. TROMMELEN, F.K. HENDRIKS, L.H. HOUBEN, J.P. GOESSENS, J.M. VAN KRANENBURG, J.M. SENDEN, L.C. DE GROOT, L.B. VERDIJK, T. SNIJDERS et L.J. VAN LOON, 2023 « Higher Muscle Protein Synthesis Rates Following Ingestion of an Omnivorous Meal Compared with an Isocaloric and Isonitrogenous Vegan Meal in Healthy, Older Adults », *The Journal of Nutrition*.
- PRENTICE A.M. et S.A. JEBB, 2001 « Beyond body mass index », *Obesity Reviews*, 2, 3 : 141-147.
- PRITCHETT K. et G.B. MULDER, 2003 « The Rotarod », *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 42, 6 : 49-49.
- PROMEYRAT A., J.D. DAUDIN et P. GATELLIER, 2013 « Kinetics of protein physicochemical changes induced by heating in meat using mimetic models: (1) Relative effects of heat and oxidants », *Food Chemistry*, 138, 1 : 581-589.
- RAUE U., D. SLIVKA, B. JEMIOLO, C. HOLLON et S. TRAPPE, 2007 « Proteolytic Gene Expression Differs At Rest and After Resistance Exercise Between Young and Old Women », *The Journals of Gerontology: Series A*, 62, 12 : 1407-1412.
- REEDS P.J., 2000 « Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans », *The Journal of Nutrition*, 130, 7 : 1835S-1840S.
- REINDERS I., X. SONG, M. VISSER, G. EIRIKSDOTTIR, V. GUDNASON, S. SIGURDSSON, T. ASPELUND, K. SIGGEIRSDOTTIR, I.A. BROUWER, T.B. HARRIS et R.A. MURPHY, 2015 « Plasma Phospholipid PUFAs Are Associated with Greater Muscle and Knee Extension Strength but Not with Changes in Muscle Parameters in Older Adults^{1, 2, 3} », *The Journal of Nutrition*, 145, 1 : 105-112.
- REMOND D., D.R. SHAHAR, D. GILLE, P. PINTO, J. KACHAL, M.-A. PEYRON, C.N.D. SANTOS, B. WALTHER, A. BORDONI, D. DUPONT, L. TOMAS-COBOS et G. VERGERES, 2015 « Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition », *Oncotarget*, 6, 16 : 13858.
- RIEU I., H. MAGNE, I. SAVARY-AUZÉLOUX, J. AVEROUS, C. BOS, M.A. PEYRON, L. COMBARET et D. DARDEVET, 2009 « Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats », *The Journal of Physiology*, 587, 22 : 5483-5492.
- RIVERA DEL RIO A., R.M. BOOM et A.E.M. JANSSEN, 2022 « Effect of Fractionation and Processing Conditions on the Digestibility of Plant Proteins as Food Ingredients », *Foods*, 11, 6 : 870.
- ROGERS K., 2010 *The Digestive System*. Britannica Educational Publishing.
- ROSENBERG I.H., 1989 « Summary comments », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 50, 5 : 1231-1233.

- ROSSATO L.T., F.M.S. DE BRANCO, C.M. AZEREDO, A.E.M. RINALDI et E.P. DE OLIVEIRA, 2020 « Association between omega-3 fatty acids intake and muscle strength in older adults: A study from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2002 », *Clinical Nutrition*, 39, 11 : 3434-3441.
- ROUX P.P., D. SHAHBAZIAN, H. VU, M.K. HOLZ, M.S. COHEN, J. TAUNTON, N. SONENBERG et J. BLENIS, 2007 « RAS/ERK Signaling Promotes Site-specific Ribosomal Protein S6 Phosphorylation via RSK and Stimulates Cap-dependent Translation * », *Journal of Biological Chemistry*, 282, 19 : 14056-14064.
- RYGIEL K.A., J.P. GRADY et D.M. TURNBULL, 2014 « Respiratory chain deficiency in aged spinal motor neurons », *Neurobiology of Aging*, 35, 10 : 2230-2238.
- SA A.G.A., Y.M.F. MORENO et B.A.M. CARCIOFI, 2020a « Food processing for the improvement of plant proteins digestibility », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 20 : 3367-3386.
- SA A.G.A., Y.M.F. MORENO et B.A.M. CARCIOFI, 2020b « Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet », *Trends in Food Science & Technology*, 97 : 170-184.
- SA A.G.A., D.C. da SILVA, M.T.B. PACHECO, Y.M.F. MORENO et B.A.M. CARCIOFI, 2021 « Oilseed by-products as plant-based protein sources: Amino acid profile and digestibility », *Future Foods*, 3 : 100023.
- SA A.G.A., Z. WAN, A.B. JHA, K.K. GALI, T.D. WARKENTIN et J.D. HOUSE, 2024 « Influence of different amino acid scoring patterns on the protein quality of field peas », *Journal of Food Composition and Analysis*, 127 : 105938.
- SALLES J., C. GUILLET, O. LE BACQUER, C. MALNERO-FERNANDEZ, C. GIRAUDET, V. PATRAC, A. BERRY, P. DENIS, C. POUYET, M. GUEUGNEAU, Y. BOIRIE, H. JACOBS et S. WALRAND, 2021 « Pea Proteins Have Anabolic Effects Comparable to Milk Proteins on Whole Body Protein Retention and Muscle Protein Metabolism in Old Rats », *Nutrients*, 13, 12 : 4234.
- SAMS L., S. AMARA, P. MANSUELLE, R. PUPPO, R. LEBRUN, J. PAUME, J. GIALLO et F. CARRIERE, 2018 « Characterization of pepsin from rabbit gastric extract, its action on β -casein and the effects of lipids on proteolysis », *Food & Function*, 9, 11 : 5975-5988.
- SAMTIYA M., R.E. ALUKO et T. DHEWA, 2020 « Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview », *Food Production, Processing and Nutrition*, 2, 1 : 6.
- SAN JUAN L.D. et M.J. VILLAMIDE, 2001 « Nutritional Evaluation of Sunflower Products for Poultry as Affected by the Oil Extraction Process », *Poultry Science*, 80, 4 : 431-437.
- SANDRI M., J. LIN, C. HANDSCHIN, W. YANG, Z.P. ARANY, S.H. LECKER, A.L. GOLDBERG et B.M. SPIEGELMAN, 2006 « PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 44 : 16260-16265.
- SANT'ANA R. de C.O., F.Q. MENDES, C.V. PIRES et M.G. de A. OLIVEIRA, 2011 « Influence of lipid extraction from different protein sources on in vitro digestibility », *Ciência e Agrotecnologia*, 35 : 758-764.
- SANTE-LHOUTELLIER V., T. ASTRUC, P. MARINOVA, E. GREVE et P. GATELLIER, 2008 « Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and in Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4 : 1488-1494.
- SANTOS-SANCHEZ G., B. MIRALLES, A. BRODKORB, D. DUPONT, L. EGGER et I. RECIO, 2024 « Current advances for in vitro protein digestibility », *Frontiers in Nutrition*, 11.

- SAPONARO C., M. GAGGINI, F. CARLI et A. GASTALDELLI, 2015 « The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis », *Nutrients*, 7, 11 : 9453-9474.
- SARKAR A., K.K.T. GOH, R.P. SINGH et H. SINGH, 2009 « Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an *in vitro* gastric model », *Food Hydrocolloids*, 23, 6 : 1563-1569.
- SARKAR N., D. CHAKRABORTY, R. DUTTA, P. AGRAHARI, D. SUNDARAM, A. SINGH et S. JACOB, 2021 « A comprehensive review on oilseed cakes and their potential as a feedstock for integrated biorefinery », *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 4, 3 : 376.
- SCHAAP L.A., S.M.F. PLUIJM, D.J.H. DEEG, T.B. HARRIS, S.B. KRITCHEVSKY, A.B. NEWMAN, L.H. COLBERT, M. PAHOR, S.M. RUBIN, F.A. TYLAVSKY, M. VISSER, et FOR THE HEALTH ABC STUDY, 2009 « Higher Inflammatory Marker Levels in Older Persons: Associations With 5-Year Change in Muscle Mass and Muscle Strength », *The Journals of Gerontology: Series A*, 64A, 11 : 1183-1189.
- SCOTT K.P., S.W. GRATZ, P.O. SHERIDAN, H.J. FLINT et S.H. DUNCAN, 2013 « The influence of diet on the gut microbiota », *Pharmacological Research*, 69, 1 : 52-60.
- SENSOY I., 2021 « A review on the food digestion in the digestive tract and the used *in vitro* models », *Current Research in Food Science*, 4 : 308-319.
- SHAGHAGHIAN S., D.J. MCCLEMENTS, M. KHALESİ, M. GARCIA-VAQUERO et A. MIRZAPOUR-KOUHDASHT, 2022 « Digestibility and bioavailability of plant-based proteins intended for use in meat analogues: A review », *Trends in Food Science & Technology*, 129 : 646-656.
- SHEFER G., D.P. VAN DE MARK, J.B. RICHARDSON et Z. YABLONKA-REUVENI, 2006 « Satellite-cell pool size does matter: Defining the myogenic potency of aging skeletal muscle », *Developmental Biology*, 294, 1 : 50-66.
- SHEN Y., Q. SHI, K. NONG, S. LI, J. YUE, J. HUANG, B. DONG, M. BEAUCHAMP et Q. HAO, 2023 « Exercise for sarcopenia in older people: A systematic review and network meta-analysis », *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 14, 3 : 1199-1211.
- SINGH R., S. LANGYAN, S. SANGWAN, B. ROHTAGI, A. KHANDELWAL et M. SHRIVASTAVA, 2022 « Protein for Human Consumption From Oilseed Cakes: A Review », *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6.
- SKUGOR A., N.P. KJOS, A.Y.M. SUNDARAM, L.T. MYDLAND, R. ÅNESTAD, A.-H. TAUSON et M. ØVERLAND, 2019 « Effects of long-term feeding of rapeseed meal on skeletal muscle transcriptome, production efficiency and meat quality traits in Norwegian Landrace growing-finishing pigs », *PLOS ONE*, 14, 8 : e0220441.
- SMITH G.I., P. ATHERTON, D.N. REEDS, B.S. MOHAMMED, D. RANKIN, M.J. RENNIE et B. MITTENDORFER, 2011 « Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 2 : 402-412.
- SMITH K., N. REYNOLDS, S. DOWNIE, A. PATEL et M.J. RENNIE, 1998 « Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein », *The American Journal of Physiology*, 275, 1 : E73-78.
- SMITH M.E. et D.G. MORTON, 2011 *The Digestive System: Systems of the Body Series*. Elsevier Health Sciences.
- SON J.M. et C. LEE, 2021 « Aging: All roads lead to mitochondria », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 116 : 160-168.

- SONI K., M. SAMTIYA, V. KRISHNAN et T. DHEWA, 2022 « Antinutritional Factors: Nutrient Bioavailability and Health Beneficial Effects ». in R. S. V. et S. Praveen (dir.): *Conceptualizing Plant-Based Nutrition: Bioresources, Nutrients Repertoire and Bioavailability*. 157-179. Singapore, Springer Nature.
- SOUSA R., R. PORTMANN, S. DUBOIS, I. RECIO et L. EGGER, 2020 « Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model », *Food Research International*, 130 : 108996.
- SPIELMANN J., G.I. STANGL et K. EDER, 2008 « Dietary pea protein stimulates bile acid excretion and lowers hepatic cholesterol concentration in rats », *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 6 : 683-693.
- STEINGOETTER A., T. RADOVIC, S. BUETIKOFER, J. CURCIC, D. MENNE, M. FRIED, W. SCHWIZER et T.J. WOOSTER, 2015 « Imaging gastric structuring of lipid emulsions and its effect on gastrointestinal function: a randomized trial in healthy subjects234 », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101, 4 : 714-724.
- STOKES T., A.J. HECTOR, R.W. MORTON, C. MCGLORY et S.M. PHILLIPS, 2018 « Recent Perspectives Regarding the Role of Dietary Protein for the Promotion of Muscle Hypertrophy with Resistance Exercise Training », *Nutrients*, 10, 2 : 180.
- STOLL B., J. HENRY, P.J. REEDS, H. YU, F. JAHOR et D.G. BURRIN, 1998 « Catabolism Dominates the First-Pass Intestinal Metabolism of Dietary Essential Amino Acids in Milk Protein-Fed Piglets », *The Journal of Nutrition*, 128, 3 : 606-614.
- SUN N., R.J. YOULE et T. FINKEL, 2016 « The Mitochondrial Basis of Aging », *Molecular Cell*, 61, 5 : 654-666.
- SUN Y., Q. ZHENG, J. SUN, L. WANG et Y. LI, 2023 « Phytonutrients as Potential Dietary Supplements to Ameliorate Sarcopenia via the Involvement of Autophagic Pathway », *Food Reviews International*, 0, 0 : 1-41.
- TAAFFE D.R., T.R. HENWOOD, M.A. NALLS, D.G. WALKER, T.F. LANG et T.B. HARRIS, 2008 « Alterations in Muscle Attenuation following Detraining and Retraining in Resistance-Trained Older Adults », *Gerontology*, 55, 2 : 217-223.
- TAHA F.S. et S.S. MOHAMED, 2004 « Effect of different denaturing methods on lipid–protein complex formation », *LWT - Food Science and Technology*, 37, 1 : 99-104.
- TARDIF N., J. SALLES, C. GUILLET, J. TORDJMAN, S. REGGIO, J.-F. LANDRIER, C. GIRAUDET, V. PATRAC, J. BERTRAND-MICHEL, C. MIGNE, M.-L. COLLIN, J.-M. CHARDIGNY, Y. BOIRIE et S. WALRAND, 2014 « Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation », *Aging Cell*, 13, 6 : 1001-1011.
- TERRES UNIVIA, « Tourteaux oléagineux » (<https://www.terresunivia.fr/cultures-et-utilisations/utilisations/alimentation-animale/tourteaux-oleagineux>), consulté le 13 août 2024.
- TESSIER R., J. CALVEZ, G. AIRINEI, N. KHODOROVA, S. DAUGUET, O. GALET, M. CHAPELAIS, D. TOME, R. BENAMOUGIG et C. GAUDICHON, 2023 « Digestive and metabolic bioavailability in healthy humans of 15N-labeled rapeseed and flaxseed protein incorporated in biscuits », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 117, 5 : 896-902.
- TESSIER R., J. CALVEZ, N. KHODOROVA, A. QUINSAC, R. KAPEL, D. TOME, G. AIRINEI, R. BENAMOUGIG et C. GAUDICHON, 2020a « Real ileal digestibility of sunflower protein and amino acids in humans », *Proceedings of the Nutrition Society*, 79, OCE2 : E387.

- TESSIER R., N. KHODOROVA, J. CALVEZ, R. KAPEL, A. QUINSAC, J. PIEDCOQ, D. TOME et C. GAUDICHON, 2020b « ^{15}N and ^2H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey », *The Journal of Nutrition*, 150, 3 : 450-457.
- TEZZE C., M. SANDRI et P. TESSARI, 2023 « Anabolic Resistance in the Pathogenesis of Sarcopenia in the Elderly: Role of Nutrition and Exercise in Young and Old People », *Nutrients*, 15, 18 : 4073.
- THOMAS M.S., M. CALLE et M.L. FERNANDEZ, 2023 « Healthy plant-based diets improve dyslipidemias, insulin resistance, and inflammation in metabolic syndrome. A narrative review », *Advances in Nutrition*, 14, 1 : 44-54.
- TIAN T., F. TENG, S. ZHANG, B. QI, C. WU, Y. ZHOU, L. LI, Z. WANG et Y. LI, 2019 « A Study of Structural Change during In Vitro Digestion of Heated Soy Protein Isolates », *Foods*, 8, 12 : 594.
- TSUJITA T., H. TAKAICHI, T. TAKAKU, T. SAWAI, N. YOSHIDA et J. HIRAKI, 2007 « Inhibition of lipase activities by basic polysaccharide », *Journal of Lipid Research*, 48, 2 : 358-365.
- TURGEON S.L. et L.-E. RIOUX, 2011 « Food matrix impact on macronutrients nutritional properties », *Food Hydrocolloids*, 25, 8 : 1915-1924.
- USDA, 2024 *Oilseeds: World Markets and Trade*. (<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>)
- VERDIJK L.B., T. SNIJDERS, M. DROST, T. DELHAAS, F. KADI et L.J.C. VAN LOON, 2014 « Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age », *AGE*, 36, 2 : 545-557.
- VOLKERT D., A.M. BECK, T. CEDERHOLM, A. CRUZ-JENTOFT, L. HOOPER, E. KIESSWETTER, M. MAGGIO, A. RAYNAUD-SIMON, C. SIEBER, L. SOBOTKA, D. VAN ASSELT, R. WIRTH et S.C. BISCHOFF, 2022 « ESPEN practical guideline: Clinical nutrition and hydration in geriatrics », *Clinical Nutrition*, 41, 4 : 958-989.
- VORS C., G. PINEAU, L. GABERT, J. DRAI, C. LOUCHE-PELISSIER, C. DEFOORT, D. LAIRON, M. DESAGE, S. DANTHINE, S. LAMBERT-PORCHERON, H. VIDAL, M. LAVILLE et M.-C. MICHALSKI, 2013 « Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97, 1 : 23-36.
- WALL B.T., H.M. HAMER, A. DE LANGE, A. KISKINI, B.B.L. GROEN, J.M.G. SENDEN, A.P. GIJSEN, L.B. VERDIJK et L.J.C. VAN LOON, 2013 « Leucine co-ingestion improves post-prandial muscle protein accretion in elderly men », *Clinical Nutrition*, 32, 3 : 412-419.
- WALRAND S., C. GRYSON, J. SALLES, C. GIRAUDET, C. MIGNE, C. BONHOMME, P. LE RUYET et Y. BOIRIE, 2016 « Fast-digestive protein supplement for ten days overcomes muscle anabolic resistance in healthy elderly men », *Clinical Nutrition*, 35, 3 : 660-668.
- WANASUNDARA J.P.D., 2011 « Proteins of Brassicaceae Oilseeds and their Potential as a Plant Protein Source », *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 7 : 635-677.
- WANG X., A. YE, A. DAVE et H. SINGH, 2021 « In vitro digestion of soymilk using a human gastric simulator: Impact of structural changes on kinetics of release of proteins and lipids », *Food Hydrocolloids*, 111 : 106235.
- WHITMAN S.A., M.J. WACKER, S.R. RICHMOND et M.P. GODARD, 2005 « Contributions of the ubiquitin–proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age », *Pflügers Archiv*, 450, 6 : 437-446.

- WICKHAM M.J.S., R.M. FAULKS, J. MANN et G. MANDALARI, 2012 « The Design, Operation, and Application of a Dynamic Gastric Model », *Dissolution Technologies*, 19, 3 : 15-22.
- WIEDMER P., T. JUNG, J.P. CASTRO, L.C.D. POMATTO, P.Y. SUN, K.J.A. DAVIES et T. GRUNE, 2021 « Sarcopenia – Molecular mechanisms and open questions », *Ageing Research Reviews*, 65 : 101200.
- WINDEY K., V. DE PRETER et K. VERBEKE, 2012 « Relevance of protein fermentation to gut health », *Molecular Nutrition & Food Research*, 56, 1 : 184-196.
- WITARD O.C., S.R. JACKMAN, L. BREEN, K. SMITH, A. SELBY et K.D. TIPTON, 2014 « Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise¹²³ », *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 1 : 86-95.
- XIE W., M. HE, D. YU, Y. WU, X. WANG, S. LV, W. XIAO et Y. LI, 2021 « Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation », *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 12, 3 : 538-554.
- XIE Y., L. CAI, D. ZHAO, H. LIU, X. XU, G. ZHOU et C. LI, 2022 « Real meat and plant-based meat analogues have different *in vitro* protein digestibility properties », *Food Chemistry*, 387 : 132917.
- YARASHESKI K.E., 2003 « Review Article: Exercise, Aging, and Muscle Protein Metabolism », *The Journals of Gerontology: Series A*, 58, 10 : M918-M922.
- YAVUZ-DÜZGÜN M., B. ZEEB, J. DREHER, B. ÖZÇELİK et J. WEISS, 2020 « The Impact of Esterification Degree and Source of Pectins on Complex Coacervation as a Tool to Mask the Bitterness of Potato Protein Isolates », *Food Biophysics*, 15, 3 : 376-385.
- YE H. et W. YU, 2024 « Different influences of dietary fiber from various sources on the *in vitro* digestibility of casein as uncovered by the study of protein-dietary fiber interactions », *Food Research International*, 176 : 113845.
- YE J., X. HU, S. LUO, D.J. MCCLEMENTS, L. LIANG et C. LIU, 2018 « Effect of endogenous proteins and lipids on starch digestibility in rice flour », *Food Research International*, 106 : 404-409.
- YEUNG S.S.Y. et J. WOO, 2022 « Association of Plant Protein Intake with Change in Physical Performance in Chinese Community-Dwelling Older Adults », *Nutrients*, 14, 21 : 4534.
- ZAHIR M., V. FOGLIANO et E. CAPUANO, 2018 « Food matrix and processing modulate *in vitro* protein digestibility in soybeans », *Food & Function*, 9, 12 : 6326-6336.
- ZHANG B., G. LIU, D. YING, L. SANGUANSRI et M.A. AUGUSTIN, 2017 « Effect of extrusion conditions on the physico-chemical properties and *in vitro* protein digestibility of canola meal », *Food Research International*, 100 : 658-664.
- ZHAO J., J.J. BRAULT, A. SCHILD, P. CAO, M. SANDRI, S. SCHIAFFINO, S.H. LECKER et A.L. GOLDBERG, 2007 « FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells », *Cell Metabolism*, 6, 6 : 472-483.
- ZHAO J., G. SU, C. CHEN, X. SUN, W. SUN et M. ZHAO, 2020 « Physicochemical and Structural Characteristics of Soybean Protein Isolates Induced by Lipoxygenase-Catalyzed Linoleic Acid Oxidation during *In Vitro* Gastric Digestion », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 44 : 12384-12392.
- ZHOU H., Y. HU, Y. TAN, Z. ZHANG et D.J. MCCLEMENTS, 2021 « Digestibility and gastrointestinal fate of meat versus plant-based meat analogs: An *in vitro* comparison », *Food Chemistry*, 364 : 130439.

- ZHOU L., H. BIAN, N. ZHANG et W. QIAN, 2024 « Real-time tracking of the adsorption of bovine serum albumin on lipid layer and its effect on lipolysis by optical interferometry », *Food Chemistry*, 444 : 138581.
- ZHOU L., Y. YANG, J. WANG, S. WEI et S. LI, 2019 « Effects of low fat addition on chicken myofibrillar protein gelation properties », *Food Hydrocolloids*, 90 : 126-131.
- ZHU X., Q. WANG, Y. LENG, F. CHEN, F. WU, G. MU et X. WU, 2021 « Lecithin alleviates protein flocculation and enhances fat digestion in a model of infant formula emulsion », *Food Chemistry*, 346 : 128918.

ANNEXES



ANNEXES

Annexe 1 : Liste des figures

Figure 1. Part des différentes sources de protéines végétales dans les produits alimentaires en France (Estève-Saillard 2016).

Figure 2. Principaux phénomènes mécaniques et biochimiques intervenant lors de la digestion chez l'Homme (Adapté de Bornhorst et Paul Singh 2014 ; Boland 2016).

Figure 3. Motilité dans l'intestin grêle. (A) Segmentation. (B) Péristaltisme (Smith et Morton 2011).

Figure 4. Digestion des triglycérides par la lipase gastrique (Adapté de Smith et Morton 2011 ; Basile et al. 2024).

Figure 5. Mécanismes d'absorption des acides aminés (Adapté de Smith et Morton 2011 ; Basile et al. 2024).

Figure 6. Les différentes interactions au sein d'un chaîne polypeptidique formant la structure tertiaire des protéines.

Figure 7. Charges dominantes des acides aminés selon le pH environnant (Adapté de Damodaran 2007).

Figure 8. Principaux facteurs antinutritionnels – modes d'actions et effets néfastes sur la santé humaine (Adapté de Hahm et al. 2013 ; Mattila et al. 2018 ; Samtiya et al. 2020 ; Kadam et al. 2021)

Figure 9. Protocole statique INFOGEST (Adapté de Brodkorb et al. 2019).

Figure 10. Composition moyenne des tourteaux de soja (A) et de colza (B) (Terres Univia).

Figure 11. Aperçu des étapes de traitement avant, pendant et après le fractionnement des protéines oléagineuses. Les couleurs indiquent les différentes voies de traitement, la voie conventionnelle de fractionnement aqueux est présentée en noir et représente l'extraction alcaline suivit d'une précipitation isoélectrique (Adaptée de Rivera del Rio et al. 2022).

Figure 12. Composition moyenne du tourteau de tournesol non décortiqué (A) et décortiqué (B) (Terres Univia).

Figure 13. Schéma de production des tourteaux d'oléagineux (Terres Univia).

Figure 14. Distribution dans le corps humain de protéines de caséine ingérées (Adapté de Groen et al. 2015).

Figure 15. Distribution dans le corps humain de protéines de caséine ingérées (Adapté de Groen et al. 2015).

Figure 16. Relation entre la synthèse protéique musculaire, les acides aminés sanguins, et la signalisation intramusculaire (Atherton et Smith 2012).

Figure 17. Dégradation dépendante de l'ATP des protéines ciblées par le système ubiquitine-protéasome (Traduit de Murton et al. 2008).

Figure 18. Données normatives sur la force de préhension tout au long de la vie chez les hommes et les femmes au Royaume-Uni (Cruz-Jentoft et al. 2019).

Figure 19. Diagramme pour la recherche de cas, l'établissement d'un diagnostic et la quantification de la sévérité de la sarcopénie en pratique clinique (Adapté de Cruz-Jentoft et al. 2019).

Figure 20. Dynamomètre Jamar, validé pour mesurer la force de préhension chez l'Homme (A). Griptest pour mesurer la force de préhension chez les rongeurs (B).

Figure 21. Rotarod utilisé pour évaluer la vitesse de marche des souris ou des rats.

Figure 22. Schéma illustrant la mesure du taux de synthèse fractionnaire (FSR) par l'utilisation de traceurs isotopiques stables acides aminés (Traduit de Joanisse et al. 2021).

Figure 23. Les principales causes et caractéristiques de la sarcopénie associée au vieillissement comprenant plusieurs composantes, allant du niveau cellulaire aux effets systémiques. Ce mélange complexe de facteurs, combiné à d'autres situations associées telles que l'inactivité physique ou la dénutrition, peut conduire aux principales caractéristiques de la sarcopénie.

Figure 24. Impact de l'exercice et de l'ingestion de protéines sur la synthèse protéique : comparaison entre les jeunes (gauche) et les personnes âgées (droite) en contexte de résistance anabolique du muscle squelettique (Adapté de Tezze et al. 2023).

Figure 25. Taux de synthèse fractionnaire des protéines myofibrillaires (FSR, %/h) pendant l'état de jeûne (basal) et pendant la période postprandiale de 4 h après l'ingestion de 35g de protéines de lactosérum, 35g de caséine, 35g de protéines de blé ou 60g de protéines de blé chez des hommes âgés en bonne santé (Gorissen et al. 2016).

Figure 26. Représentation schématique de l'hydrolyse des protéines et de la titration au pH-stat à pH 5 et 7 (Traduit de Mat et al. 2018).

Figure 27. Schéma récapitulatif du travail expérimental chez le rat âgé.

Figure 28. Images de microscopie à balayage laser confocal, de différents régimes après la digestion gastrique (A), et après la digestion intestinale (B) (Ding et al. 2022).

Annexe 2 : Liste des tableaux

Tableau 1. Les effets des lipides sur la digestibilité des protéines.

Tableau 2. Teneurs en acides aminés indispensables recommandés (mg/g de protéine) par la FAO (FAO, 2013).

Tableau 3. Qualité nutritionnelle des différentes sources protéiques d'oléagineux.

Tableau 4. Facteurs antinutritionnels et leur concentration dans différentes sources protéiques d'oléagineux.

Tableau 5. Teneur en leucine dans plusieurs sources de protéines (Adapté de Arrutia et al. 2020 ; Day et al. 2022).

Annexe 3 : Valorisations scientifiques

Communications orales :

Lina Toutirais, Leslie Couédelo, Corentin Bouju, Hélène Abrous, Ikram Chamekh, Stephane Walrand, Carole Vaysse. **Interactions lipids-proteins of oilseeds: impact on *in vitro* digestibility.** *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids.* Nantes (France). 2-5 Juillet 2023

Lina Toutirais, Leslie Couédelo, Corentin Bouju, Hélène Abrous, Ikram Chamekh, Stephane Walrand, Carole Vaysse. **Interactions lipids-proteins of oilseeds: impact on *in vitro* digestibility.** *Euro Fed Lipid Congress.* Poznań (Pologne). 17-20 Septembre 2023

Lina Toutirais, Leslie Couédelo, Corentin Bouju, Hélène Abrous, Ikram Chamekh, Stephane Walrand, Carole Vaysse. **Digestibilité des protéines oléagineuses : importance de la composition de la matrice et impact des lipides.** *Webinaire Jeunes chercheurs de la Société française pour l'étude des lipides.* Virtuel. 28 Juin 2024

Communications affichées :

Lina Toutirais, Stephane Walrand, Carole Vaysse. **Interactions between lipids and proteins from oilseeds during their *in vitro* digestibility.** International Conference on food digestion. Porto (Portugal). 8-11 Avril 2024.

Revue scientifique :

Toutirais L, Walrand S, Vaysse C. Are oilseeds a new alternative protein source for human nutrition? *Food Funct.* Published online February 5, 2024. doi:10.1039/D3FO05370A

Toutirais L, Vaysse C, Gueugneau M, Walrand S. Plant proteins: are they a good alternative to animal proteins in older people? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care.* 2024;27(4):372. doi:10.1097/MCO.0000000000001026

Annexe 4 : Revue publiée dans Food & Function

Food & Function



REVIEW



Cite this: *Food Funct.*, 2024, **15**, 2366

Received 5th December 2023,
Accepted 4th February 2024

DOI: 10.1039/d3fo05370a

rsc.li/food-function

Are oilseeds a new alternative protein source for human nutrition?

Lina Toutirais,^a Stéphane Walrand^{b,c} and Carole Vaysse^c

This review focuses on the potential use, nutritional value and beneficial health effects of oilseeds as a source of food protein. The process of extracting oil from oilseeds produces a by-product that is rich in proteins and other valuable nutritional and bioactive components. This product is primarily used for animal feed. However, as the demand for proteins continues to rise, plant-based proteins have a real success in food applications. Among the different plant protein sources, oilseeds could be used as an alternative protein source for human diet. The data we have so far show that oilseeds present a protein content of up to 40% and a relatively well-balanced profile of amino acids with sulphur-containing amino acids. Nevertheless, they tend to be deficient in lysine and rich in anti-nutritional factors (ANFs), which therefore means they have lower anabolic potential than animal proteins. To enhance their nutritional value, oilseed proteins can be combined with other protein sources and subjected to processes such as dehulling, heating, soaking, germination or fermentation to reduce their ANFs and improve protein digestibility. Furthermore, due to their bioactive peptides, oilseeds can also bring health benefits, particularly in the prevention and treatment of diabetes, obesity and cardiovascular diseases. However, additional nutritional data are needed before oilseeds can be endorsed as a protein source for humans.

1. Introduction

The United Nations projects that the world's population is expected to grow from 8 billion in 2022 to 9.7 billion people in

2050. In this context, meeting the demand for animal protein will become a difficult challenge, given that production would need to more than double by 2050.¹

Given the limited environmental resources and the ecological impact of producing animal protein, the United Nations recommends rebalancing animal protein intake with plant protein intake.² Diet patterns in the developed world are currently dense in animal protein (two thirds of intake come from animal sources), but are starting to shift towards more plant

^aITERG, Department of Nutritional Health and Lipid Biochemistry, Bordeaux, France

^bUniversité Clermont Auvergne, INRAE, UNH, 63000 Clermont-Ferrand, France.

E-mail: lina.toutirais@doctorant.uca.fr; <https://linkedin.com/in/lina-toutirais>

^cClinical Nutrition Department, CHU, Clermont-Ferrand, France



Lina Toutirais

Lina Toutirais, a PhD student from France, specializes in evaluating the nutritional potential of oilseed proteins. Her research focuses on understanding the impact of lipid-protein interactions on digestibility and exploring the benefits of oilseed proteins against age-related sarcopenia.



Stéphane Walrand

Stéphane Walrand, MSc, PhD is a University Professor and Hospital Practitioner, in the University of Clermont Auvergne and Gabriel-Montpied Hospital. He is currently a co-leader of the Diet, Muscle Health and Sarcopenia research team. The team has a long research tradition on skeletal muscle, protein/energy metabolisms and dietary lipids/proteins, with specific emphasis on the cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue.

protein.³ The plant protein market, which was previously considered a niche segment for vegetarians and vegans, is now becoming a real strategic market for the agri-food industry and is expected to intensify on a global scale. According to the “Groupe d’Etude et de Promotion des Protéines Végétales”, the global plant protein market increased by +2.9 billion euros between 2013 and 2018 and is projected to reach 15 billion euros in 2025.⁴ This growth is partially driven by consumer perceptions of plant proteins as a way to meet their expectations for healthier, more natural, more environment friendly food. Indeed, 85% of French people believe plant proteins are good for health, 73% believe they are good for the environment, and 44% believe they are of better quality than animal proteins in terms of environmental footprint.⁵

There are several well-known sources of plant proteins that are already part of the human diet and foodways, such as cereals (like wheat and rice), legumes (like peas and lentils), pseudocereals (like quinoa), seeds (like sunflower or chia seeds) and nuts (walnuts, almonds, and so on).⁶ Legumes count among the plants with the highest protein content, with 20% to 40% crude protein (dry weight).⁷ Legumes are widely consumed by humans and serve as one of the main sources of protein, especially in Asia and Africa.⁸ In Europe, the main food sources of plant proteins are peas, fava beans, lentils, and chickpeas.⁹ However, global population growth is driving up the demand for dietary proteins, creating a need to search for new sources.

Oilseeds are primarily cultivated for their oil-rich seeds. The oil extraction process leaves a by-product called “meal”. These meals are rich in proteins, fiber, antioxidants, and vitamins. The global production of oilseed meal, dominated by soybean meal, which accounts for more than two-thirds of production, is projected to reach 403 million metric tons by 2029.¹⁰ Oilseed meals are mainly used as components of animal feed, but some of these meals can also serve as the raw material for the production of protein isolates and concentrates, both of which are high-protein-content ingredients.¹¹ Indeed, the protein contents ($N \times 6.25$ dry matter) of these plant matrices range between 50% and 65% for flours and 65% and 90% for concentrates, up to over 90% for isolates.¹²



Carole Vaysse

Carole Vaysse – PhD in Nutrition and Food Sciences – Head of the “Nutrition, Life Sciences” Team of Iteq (Industrial Technical Centre of the fat and oil industry), since 2010. The research performed by the team deals with the lipid and protein digestibility and their intestinal absorption and metabolic fate in organisms (animal and human studies).

However, plant proteins are generally deficient in sulfur amino acids (SAAs) and lysine compared to animal proteins that are considered the benchmark for nutritional quality. In addition, plant products also contain anti-nutritional factors (ANFs) that inhibit protease activities or bind to some nutrients, such as proteins, thus affecting their digestibility.¹³ To overcome these limitations and endorse them as a source of dietary protein, different plant protein sources that cover the amino acid (AA) needs of humans need to be combined and then subjected to physical–chemical treatment processes.^{3,14}

The nutritional value of proteins from oilseeds goes beyond their composition (in AAs and anti-nutrients) to encompass other criteria, namely the digestibility and biological value of the protein and the bioavailability of the AAs released.¹² However, the protein quality remains difficult to assess. Although several *in vivo* and *in vitro* methods are available, they all have limitations:¹³ *in vivo* tests are costly, time-consuming and raise ethical issues, while *in vitro* methods still cannot perfectly simulate the digestive system.¹⁵

This review starts with an outline of plant proteins for human nutrition and their nutritional quality. We then describe the nutritional value of oilseed proteins and compare them with animal proteins, before going on to examine the beneficial health effects of consuming oilseed proteins.

2. Search strategy

This narrative review was conducted by searching the Pubmed, Google Scholar and Science Direct databases to identify eligible publications in English up to October 2023. Scientific studies were identified by combining the following keywords: “oilseed proteins”, “nuts”, “peanut”, “walnut”, “almond”, “soybean”, “sunflower”, “rapeseed”, “sesame”, “flaxseed”, “pumpkin seeds”, “chia seeds”, “hemp”, “nutritional quality”, “antinutritional factors”, “health benefits”, “diabetes”, “obesity”, “cardiovascular diseases”, “chronic non-communicable diseases”, “growth”, and “development”. The keywords were modified according to the database. Furthermore, we reviewed the references of the included articles to identify additional relevant sources. In addition to the primary sources, we also included data and reports from reputable organizations such as the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, the World Health Organization, the French Baromètre consommateurs de Protéines, the Commission to the council and the European parliament on the Development of Plant Proteins in the European Union, and the French Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail.

3. Plant proteins for human nutrition

Proteins are essential macronutrients in the human diet and have a number of structural and other functions in all living organisms. They are composed of AAs that are linked by

peptide bonds. Nine of these AAs are referred to as “essential” AAs (EAAs), because they are not synthesized by humans and so must be provided by food.¹³ The French “Agence nationale de Sécurité Sanitaire” and the World Health Organization recommend a protein intake of 0.83 g kg⁻¹ d⁻¹ for a healthy adult.¹⁶ The nutritional reference value for protein is higher for older people, *i.e.* 1 g kg⁻¹ d⁻¹, and for pregnant and breastfeeding women, it is 1.2 g kg⁻¹ d⁻¹.¹⁶

3.1. Sourcing of plant protein

Plant proteins mainly come from cereals, legumes, and oilseeds. Pseudocereals and algae are emerging sources of protein, but both are present in relatively small quantities in the human diet.

Cereals. Cereals are plants of the *Poaceae* family that produce grains widely used in human and animal nutrition. They have a relatively low protein content (between 7% to 17% depending on the species).¹⁷ These proteins contain many EAAs, but are generally deficient in lysine¹⁸ (Table 1).^{17,19–24} World cereal production in 2020 was about 3 billion tons, 97% of which was corn, wheat, rice, barley, and sorghum.²⁵ Cereals are currently gaining global attention for use in the substitute meat industry, as the viscoelastic properties of wheat gluten make it suitable for creating meat-like textures.⁷

Legumes. Legumes belong to the *Fabaceae* family and are a vital food staple in many countries, especially in low-income communities.²⁶ Worldwide production of legumes in 2020 was over 1 billion tons.²⁵ The most common dry legumes are green peas, dry beans, chickpeas and lentils. Soybean belongs to the legume family, with the particularity of having a high lipid content and also belonging to the oilseed family.³⁰ Legumes are a valuable source of nutrition due to their high protein

contents (20%–40% by dry weight), as well as an excellent source of fiber, carbohydrates and various vitamins and minerals.⁷ In addition, legume seeds contain beneficial bioactive compounds, and can therefore be used as functional foods for the prevention of several diseases.²⁷ Legume proteins are rich in EAAs, particularly lysine. However, they are relatively poor in SAAs, *i.e.* methionine and cysteine, and also tryptophan.

Oilseeds. Oilseed species are an important group of plants that are grown for their oils. World oilseed production in 2021/2022 was estimated to be at 632 million tons, mainly in temperate zones.²⁸ America and Europe account for more than 60% of worldwide production.²⁹ Soybean is the main oilseed crop grown in the world today, followed by rapeseed, sunflower, and peanut.² Oilseeds are rich in phytochemicals, vitamins, fiber, fat, and carbohydrates, but also protein.² Thus, besides consumption in the form of oil, oilseeds serve as an important source of protein, particularly in animal feed. The protein content of oilseeds varies from an average of 15% in safflower to 45% in soybean.^{12,30} Oilseed proteins are already used in human food in the form of processed ingredients (meal, concentrate, isolate) or as a substrate (to produce flavors, texture or provide AAs and bioactive compounds).^{31,32}

3.2. Evaluation of the quality of proteins

The nutritional quality of a protein depends on its ability to supply AAs, in particular EAAs, and nitrogen. The assessment of protein quality for a specific food mobilizes physico-chemical approaches that examine various criteria, such as protein content and AA composition, digestibility, and bioavailability.³³

Before 2013, the recommended index for evaluating the quality of dietary proteins was the Protein Digestibility-

Table 1 Nutritional quality of different protein sources

Protein type	Protein	Protein content (%)	PDCAAS	DIAAS	Limiting EAA	Ref.
Animals	Cow milk	3–3.4	100	108–120	Met + Cys	Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Whey	30–80	97–100	85–107	His	Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Casein	80	100	117–131	N/A	Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Meat	22	100	>100	N/A	Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Seafood	16–21	ND	ND	ND	Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Egg	12	100	116.4	N/A	Day <i>et al.</i> ¹⁷
Cereals	Wheat	10–16	51–64	48–45	Lys	Zeng <i>et al.</i> ¹⁹ , Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Corn	7–9	42–50	38–48	Lys	Hertzler <i>et al.</i> , ²⁰ Jiménez-Munoz <i>et al.</i> ²¹
	Rice	7–9	47–54	47–52	Lys	Hertzler <i>et al.</i> , ²⁰ Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Oats	17	52–64	44–66	Lys	Hertzler <i>et al.</i> , ²⁰ Zeng <i>et al.</i> ¹⁹
Legumes	Pea	25	50–89	46–82	Met + Cys	Hertzler <i>et al.</i> , ²⁰ Nosworthy <i>et al.</i> ²²
	Pea concentrate	55	71	62	Met + Cys	Day <i>et al.</i> ¹⁷
	Fava beans	8	60	55	Met + Cys	Day <i>et al.</i> , ¹⁷ Hertzler <i>et al.</i> ²⁰
Oilseeds	Soy flour	35–40	93	89–92	Met + Cys	Day <i>et al.</i> , ¹⁷ Hertzler <i>et al.</i> ²⁰
	Soy isolate	90	86–100	84–90	N/A	Day <i>et al.</i> , ¹⁷ Zeng <i>et al.</i> ¹⁹
	Hemp	25–30	ND	54	Lys	Day <i>et al.</i> , ¹⁷ Herreman <i>et al.</i> ²³
	Hemp, meal	44	57	ND	Lys	Jiménez-Munoz <i>et al.</i> ²¹
	Rapeseed	21	92	67–70	Lys	Ertl <i>et al.</i> , ²⁴ Herreman <i>et al.</i> ²³
	Sunflower	19	54–58	46–49	Lys	Ertl <i>et al.</i> ²⁴
	Almonds	21	39	40	ND	Zeng <i>et al.</i> ¹⁹
	Walnut	15	55	ND	ND	Zeng <i>et al.</i> ¹⁹

Cys, cysteine; DIAAS, digestible indispensable amino acid score; EAA, essential amino acid; His, histidine; Lys, lysine; Met, methionine; N/A, not available; ND, not determined; PDCAAS, protein digestibility corrected amino acid score.

Corrected Amino Acid Score (PDCAAS), which corresponds to the chemical composition score (EAA content/EAA content of the reference protein) multiplied by fecal true digestibility.³⁴ Then, in 2013, the Food and Agriculture Organization introduced a new system, called the Digestible Essential Amino Acid Score (DIAAS),³⁵ which is currently the method recommended by the Food and Agriculture Organization and the U.S National Academy of Sciences. In the DIAAS index, fecal true digestibility is replaced by true ileal digestibility, which reflects the concentration of AAs that reaches the ileum at the end of the small intestine and would hence enter the colon.²⁰ This AA digestibility measure is considered to better reflect the amounts of AAs absorbed.³⁵ However, the PDCAAS is still used and accepted, as there is insufficient data on ileal AA digestibility for many sources.²² If these scores are equal to 100, then the protein contains all the EAAs and is well digested.

However, as these *in vivo* studies to evaluate protein digestibility are very expensive and time-consuming and ethically and technically difficult to set up, protein digestibility can also be measured *in vitro*. Various methodologies have been developed for assessing *in vitro* digestibility, including a standardized protocol based on an international consensus by the COST INFOGEST network³⁶ that estimates protein quality based on “*in vitro* protein digestibility” (IVPD). This is an important parameter that provides information on the ability of the protein to be digested and used by the body and to withstand digestive processes, but it fails to account for the EAA factor. IVPD is determined as digested protein divided by total protein multiplied by 100.³⁷ More recently, the *in vitro* protein digestibility-corrected amino acid score has been used to replace *in vivo* rat bioassays. This score is determined as amino acid score multiplied by IVPD.³⁷

Plant proteins are generally deficient in EAAs and typically have a lower digestibility and lower bioavailability as well as lower uptake and retention in body tissue compared to animal-source proteins^{38,39} (Table 1). In the next section, we will delve into the nutritional quality of oleaginous proteins in detail.

4. Oilseeds as a protein source

4.1. Nutritional value of oilseed protein

The protein content in oilseeds varies considerably according to species.¹⁷ Rapeseed, hemp, sunflower, sesame and almond have a protein content at 20% or higher. Soybeans have the highest protein content, at up to 35%–40%, which is equivalent to the protein content in beef (in % d.m) (Table 1).^{33,40} However, it is difficult to obtain an accurate percentage of plant-source protein contents as they are directly linked to the cultivation conditions (geography and climate) and can also vary with the assay method and nitrogen conversion factor used.²

In terms of EAA composition, oilseeds are generally deficient in lysine and high in SAAs, with the exception of soy which is deficient in cysteine (Table 1). A combination with

other sources, such as legumes, which are high in lysine, is therefore necessary to cover human AA needs. Oilseeds tend to have a low PDCAAS and DIAAS. PDCAAS ranges from 39 for almonds to over 90 for soybeans and rapeseeds. Although almonds also have the lowest DIAAS with a value of 40, and soybeans the highest, the DIAAS value for rapeseed is lower than its PDCAAS, ranging between 67 and 70. Sunflower also shows low values with a PDCAAS of 54–66 and a DIAAS of 46–67 (Table 1).³³

The nutritional value of protein is dependent on different parameters, such as structural conformation, AA profile, types of polypeptides and the presence of non-protein materials in the oilseed matrix (carbohydrates, lipids, and polyphenols), which can be modified by their production process. Oilseed proteins contain beta-sheet structures which have been negatively correlated with protein digestibility. Indeed, these hydrophobic beta-sheets form bonds between proteins and create aggregates that stabilize the native protein structure and reduce the accessibility of cleavage sites to proteases, thus decreasing protein digestibility.⁴¹ Nevertheless, food processing techniques can improve the nutritional quality of oilseed proteins, by inducing structural modification.³⁷ For example, fermentation, a biological process, with *P. acidilactici* significantly increased protein digestibility on an average by 13.5%.⁴² During fermentation, insoluble proteins undergo structural changes that make them more accessible to proteolytic enzymes.³⁷ Moreover, in oilseeds and plant-based foods in general, the cell wall is made up of non-digestible polysaccharides. The degree of cell wall integrity strongly affects protein digestibility. Applying pressure treatment and *n*-hexane extraction to oilseed feedstocks can break down the cell walls and release the proteins, thus improving the protein accessibility for the enzymes and the protein digestibility.^{7,43} However, if the temperatures and pressures applied are too high, it reduces the bioavailability of the EAAs.⁷ In addition, in the oilseed matrix, the presence of compounds such as ANFs, protease inhibitors, fiber, polyphenols and structural carbohydrates can interfere with the protein digestion process and therefore negatively affect digestibility and bioavailability.^{21,44} The following section discusses the role of ANFs, their impact on protein digestibility, and the processing methods available that can reduce or eliminate ANF content.

4.2. Anti-nutritional factors and the elimination process

ANFs are chemical compounds synthesized by various plant species as a defense mechanism to protect against diverse forms of attack (bacterial, microbial, and so on).⁴⁵ These factors can reduce the digestibility of proteins by interacting either physically with the proteins and enzymes, which inhibits the action of proteases, or chemically, which leads to the production of indigestible products⁴⁶ (Fig. 1).^{45,47–49} All oilseeds contain at least one ANF that can limit either the intake, uptake or utilization of protein³⁹ (Table 2).^{40,47–50}

In addition to reducing nutrient digestibility and bioavailability, ANFs may also become toxic when consumed above a certain amount. Fig. 1 shows the modes of action and

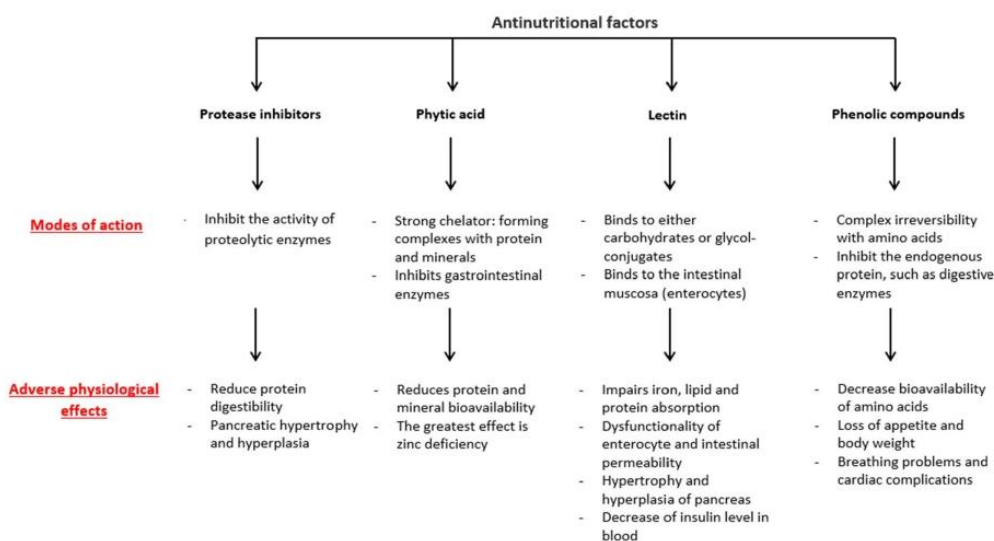


Fig. 1 Major anti-nutritional factors—modes of action and adverse effects on human health.

Table 2 Anti-nutrients and their concentrations in different oilseed sources

Source	ANF type	Amount
Soybean	Protease inhibitors	1.2 mg g ⁻¹ (ref. 47)
	Phytic acid	1.16 mg g ⁻¹ (ref. 47)
	Lectins	0.11 mg g ⁻¹ (ref. 47)
Rapeseed meal	Glucosinolates	2.08 μmol g ⁻¹ (ref. 48)
	Phytic acid	3.9% ⁴⁸
	Phenolic compounds	728 GAE mg per 100 g (ref. 48)
	Condensed tannins	119 mg per 100 g (ref. 48)
Cottonseed	Gossypol	0.17% ⁴⁹
	Phytic acid	1.26% ⁴⁹
Sunflower meal	Chlorogenic acid	27.7 mg g ⁻¹ (ref. 50)
Peanut	Phytic acid	2.63 mg g ⁻¹ (ref. 47)
	Tannins	8.9 mg g ⁻¹ (ref. 47)
	Trypsin inhibitors	5.6 mg g ⁻¹ (ref. 47)
	Lectin	0.14 mg g ⁻¹ (ref. 47)
Flaxseed	Phenolic compounds	214 GAE mg per 100 g (ref. 48)
	Phytic acid	1.9% ⁴⁸
Hemp seed	Phenolic compounds	96 GAE mg per 100 g (ref. 48)
	Condensed tannins	105 mg per 100 g (ref. 48)
	Phytic acid	3.5% ⁴⁸
Sesame	Oxalic acid	35 mg per 100 g (ref. 40)

ANFs, anti-nutritional factors.

adverse effects of the major ANFs found in oilseeds on human health.

However, these ANFs, also known as “secondary metabolites” in plants, may also have beneficial health effects, such as preventing or acting against obesity, diabetes, high blood cholesterol levels, and cancer⁵¹ (Table 3).^{52–70} Phytic acid, for

example, is found in all oilseed sources and is considered the most powerful anti-nutrient in food, but it is also a natural antioxidant that can reduce lipid peroxidation. Phytic acid may also be beneficial for diabetics, because it lowers blood glucose by reducing the rate of starch digestion.^{47,71} Similarly, the phenolic compounds in oilseeds present antioxidant activity as they are potent scavengers of reactive oxygen species. Polyphenols have antioxidant capacities that have repeatedly been proven to be useful in the prevention of cardiovascular diseases (CVD). Enzyme inhibitors, phytates or phenolic compounds are known to inhibit hydrolysis and reduce nutrient bioavailability and can also be considered beneficial as they help reduce the risk of developing obesity and type 2 diabetes.⁷²

Nevertheless, it remains necessary to reduce oilseed ANF content in order to limit their deleterious effects and increase the nutritional quality of oilseed proteins. This can be done using processing methods such as dehulling, heating, soaking, germination, and fermentation.^{14,73} Each of these treatments acts differently on the ANFs: some, like dehulling or soaking, can remove ANFs from the seeds, whereas others modify the ANFs themselves in order to eliminate their anti-nutritional properties.

Dehulling. Dehulling is a traditional method that involves removing the outer covering of the seed. It is a pre-treatment that is often carried out before the process of extracting oil from the seeds, because the presence of hull influences the proportion of nutrients in the meal (or “cake”). Unhulled meals have a lower crude protein content and a higher percentage of fiber than hulled meals.⁷⁴ Furthermore, dehulling removes ANFs found in the oilseed hull. For example, dehulling was found to decrease the content of phenolic compounds

Food & Function

Review

Table 3 Secondary metabolites of oilseeds and their beneficial health effects

Secondary metabolites	Beneficial effects	Ref.
Glucosinolate	Antioxidant Anticarcinogenic Chemoprotective	Vig <i>et al.</i> ⁵³
Lignan	Helps prevent breast, colon, prostate, and ovary cancer Relieves menopausal symptoms Helps prevent bone loss and osteoporosis Antioxidant	Moghaddasi <i>et al.</i> ⁵² Lowcock <i>et al.</i> ⁵⁴ Chang <i>et al.</i> ⁵⁵ Majdalahieh <i>et al.</i> ⁵⁶
Phenolic compounds	Anti-inflammatory Chemoprotective	Tungmunnithum <i>et al.</i> ⁵⁷
	Antioxidant Antibacterial Protects against cardiovascular disease Anti-inflammatory Relieves menopausal symptoms	Lutz <i>et al.</i> ⁵⁸ Shahidi <i>et al.</i> ⁵⁹ Smith <i>et al.</i> ⁶⁰ Pajak <i>et al.</i> ⁶¹
Isoflavone	Reduces LDL cholesterol Reduces bone loss Reduces risk of cancer Reduces arterial pressure Antioxidant Relieves menopausal symptoms Prevents osteoporosis	Alekel <i>et al.</i> ⁶² Ollberding <i>et al.</i> ⁶³ Liu <i>et al.</i> ⁶¹ Rivas <i>et al.</i> ⁶⁴ Qin <i>et al.</i> ⁶²
Phytic acid	Antioxidant Anti-cancer/cancer reduction Hypocholesterolemic Reduces glycemia	Kumar <i>et al.</i> ⁶⁵ Feizollahi <i>et al.</i> ⁶⁶
Fiber	Hypocholesterolemic Helps prevent cancer Laxative Glucose tolerance Positive weight-related benefits	Moghaddasi <i>et al.</i> ⁵² Goyal <i>et al.</i> ⁶⁷ Slavin <i>et al.</i> ⁸³
Phytosterol	Hypocholesterolemic	Nattagh-Eshivani <i>et al.</i> ⁶⁸
	Improves immune response Helps prevent cancer Reduces risk of obesity Anti-diabetic Anti-inflammatory	Fontané <i>et al.</i> ⁶⁹ Moreau <i>et al.</i> ⁷⁰

present in defatted sunflower seed meal from 4.61% to 2.99%.⁷⁵

Heat-based processes. As most ANFs, such as lectins, enzyme inhibitors and phytic acid, are heat-sensitive, processors typically apply heat treatments to deactivate these heat-sensitive ANFs. The heat-based processes most commonly used for oilseeds are roasting, cooking, microwave, infrared radiation, boiling, steaming, and extrusion. Adeyemo and Onilude⁷⁶ observed that soybean pre-treatment by roasting reduced tannin content by 75%, phytate content by 84%, and trypsin and protease inhibitor content by 98%. Cooking also reduced ANF content, but not as much as roasting. Research conducted by Folasade and Akinoso showed⁷⁷ that the oxalate content in whole white sesame cultivars was reduced by 40%

by autoclaving at 121 °C for 25 minutes. The oxalate content was decreased by 37% by cooking and 31% by roasting. Multiple studies have concluded that autoclaving stands as the most effective method for reducing ANFs.⁴⁷ Note, however, that heat treatment also results in substantial losses of vitamins and minerals and gives rise to toxic compounds.³⁷ Furthermore, a certain extent of heat-induced protein denaturation was also found to improve protein digestibility, whereas prolonged exposure to heat can lead to protein aggregation and ultimately diminish digestibility.⁷⁸

Soaking. Soaking is an easy process that has several advantages: (1) it provides the necessary moist conditions for germination and fermentation, (2) it reduces the content of water-soluble ANFs, and (3) it activates endogenous enzymes such as phytase.⁴⁷ Soaking is therefore often associated with other treatments, typically fermentation, germination and cooking. Soaking for 12 hours at room temperature reduced phytic acid content by 40% in cottonseed and by 39% in groundnut meal.⁷³ Soaking processes need to optimize pH, temperature and time in order to optimize ANF reduction.⁷⁹

Fermentation. Fermentation is a traditional method that uses benign microorganisms such as yeast, bacteria and fungi to transform raw food materials into palatable, nutritious, healthy food products.⁸⁰ Fermentation has been extended to the development of plant protein ingredients, as it offers a relatively cost-effective way to increase protein digestibility, texture and shelf life and reduce protein ANF content.⁵¹ For instance, a short-term (4-day) fermentation by yeast was able to eliminate 45% of gossypol content in groundnut meal, whereas it took a long-term (14-day) fermentation to reduce the phytic acid content by 72% in cottonseed meal and 69% in groundnut meal (69%). These reductions were attributed to microbial or enzymatic degradation of gossypol or the creation of nutrient-gossypol complexes, and to the release of endogenous phytase from yeast or seeds.⁷³ It has also been reported that fermentation can increase protein content through microorganism load and proteolytic activity during processing.^{84,85} It was also shown that the amounts of EAAs (valine, methionine, isoleucine, leucine, and lysine) were improved in fermented soybean products compared to the raw soybean.⁸⁶ Similarly, soybean meal fermentation with *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* resulted in an increase in EAAs.⁸⁵

Germination. Germination, *i.e.* the resumption of embryo growth that had been interrupted at physiological maturity, is an inexpensive technique that can improve the nutritional quality of oilseeds.⁸⁷ Germination reduces ANFs, making the germs safe for human consumption. For example, germination of soybean significantly reduced trypsin inhibitor activity by 22% after two days and by 39% after 4 days.^{88,89} Another study found that germination for 5 days increased the protein content in soybeans by inducing the reduction of enzyme proteins or a compositional change following the degradation of other constituents.⁹⁰ However, the beneficial effects of germination are dependent on environmental conditions (temperature, precipitation, humidity).⁹¹

Therefore, depending on the processing method undergone by oilseed proteins, their nutritional value can be enhanced if the content of ANFs and other matrix constituents is reduced, and if structural conformation is improved. Conversely, it may deteriorate if toxic substances and aggregates are formed, and if the proteins undergo complete denaturation. Thus, oilseeds can serve as a high-quality protein source if natural or industrial methods are carefully determined in advance and tailored to enhance their nutritional value. However, it is crucial to consider the comparison with animal proteins, which are known to have nutritional efficiency in humans.

4.3. Oilseed protein: comparison with animal protein

The proteins available for human consumption form a complex array, and their nutritional, biological and functional characteristics vary according to protein source, protein structure, food environment, and processing route. Here we detail and compare these different criteria for animal and oilseed proteins.

First, the nutritional quality of a protein source is mainly defined by its protein content, EAA composition, digestibility and bioavailability.

The protein content of meat remains relatively constant from species to species, at an average content of 22%. Seafood has a similar protein content, between 16% and 21%. Eggs offer the animal-source protein with the highest nutritional quality, but they only contain 12% protein. In terms of oilseed proteins, soy is the richest source, with a total protein content of 35%–40% (Table 1), rising to over 65% in a concentrate and over 90% in an isolate. Nuts, such as peanut or almond, can reach up to 20% protein of more.¹⁷

Table 1 lists the PDCAAS values, DIAAS, and limiting EAAs of both animal and plant proteins, including oilseeds. Animal proteins, such as meat, eggs, and certain dairy products, are considered complete protein sources as they contain all nine EAAs necessary for human bodily needs. In contrast, oilseeds are deficient in lysine or SAA for soy. Furthermore, oilseed protein has lower digestibility compared to animal-source protein. Animal-source proteins typically have a PDCAAS and DIAAS equal to or close to 100, whereas most plant proteins score below 100. Oilseed proteins have values around 50, with the exception of soy and rapeseed, reflecting an imbalance in EAAs. Like animal proteins, soy is considered a high-quality protein with a DIAAS > 75. Additionally, higher PDCAAS and DIAAS values could be achieved if oilseed proteins are combined with proteins having a complementary EAA profile. Moreover, oilseed proteins have lower digestibility than animal proteins due to the presence of ANFs and fiber on the matrix of oilseed-based food protein, along with the hydrophobic beta-sheet structures that make them resistant to digestion.⁹² Protein digestibility has been shown to negatively correlate with the density of beta-sheets in proteins. Indeed, these hydrophobic beta-sheets form bonds between proteins and create aggregates that stabilize the native protein structure and reduce the accessibility of cleavage sites to proteases, thus decreasing protein digestibility.⁴¹ Therefore, the removal of

ANFs and fiber and modification of the protein structure through processing methods would enhance the digestibility and bioavailability of oilseed proteins.

In addition to structural organization, the type of protein is also a factor in protein digestibility. Animal and plant proteins are made of different polypeptide sequences and secondary and tertiary structures. Based on their structure, proteins can be classified as globular, fibrous, or flexible. Plant proteins are mainly made of globular proteins, which can be split into four classes based on their solubility: albumins, globulins, glutelins, and prolamins. Oilseed proteins are predominantly composed of globulins and albumins. For example, chia seeds contain 52% globulin and 17.3% albumin, rapeseed contains 60% globulin and 20% albumin, and sunflower contains 40%–90% globulin and 10%–30% albumin.¹¹ The albumin fraction was identified as having low susceptibility to proteolytic activity, which negatively affects its digestibility.^{93,94} Animal proteins have a more diverse array of structures. Milk, for instance, is composed of globular proteins called whey and flexible proteins called caseins, which together form a colloidal system in milk. Muscle proteins are fibrous proteins, which can be split into three groups: sarcoplasmic, stromal, and myofibrillar. Muscle proteins have a unique structure that is not found in plant proteins. To obtain texturized vegetable protein, it is necessary to extrude globular plant proteins into a fibrous protein network.^{17,95} However, despite this processing method, plant proteins do not match the digestibility of animal proteins. Indeed, a study comparing the gastrointestinal fate of beef with a meat analogue composed of textured soy proteins revealed that the digestibility of beef proteins was superior, partly due to the difference in the type of protein present (globular soy *versus* fibrous beef proteins).⁹⁶

Lastly, certain protein fragments known as “bio-peptides” can have therapeutic potential. Based on their AA sequence, peptides released during the *in vitro* or *in vivo* digestion of animal or plant food proteins can have various biological functions.

According to Bhat *et al.*⁹⁷ animal-origin peptides (derived from casein, whey protein, cheese and eggs) possess antioxidant, hypotensive, immunomodulatory, anti-obesity and antigenotoxic bioactivities. For example, milk-derived bioactive peptides have been identified as functional ingredients against hypertensive diseases, as they act as angiotensin-converting-enzyme inhibitors. These peptides also play a regulatory role in oxidative metabolism by scavenging free radicals and inhibiting lipid peroxidation.⁹⁸ Studies have reported that peptides in oilseed meals have also shown beneficial effects such as antioxidant, antihypertensive, anti-diabetic, anti-inflammatory, and hypocholesterolemic activities.^{99,100} However, in comparison to animal-based protein, oilseeds are rich in bioactive co-nutrients such as fiber, polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and other phytochemicals that together help reduce the risk of heart disease, obesity, cancer, and type II diabetes^{6,11} (Table 3). The next section explores the major metabolic properties of oilseed proteins and bioactive peptides in more detail.

5. Beneficial health effects of oilseed protein

Secondary metabolites of oilseeds have a wide range of metabolic properties that have been associated with antioxidant, anti-diabetic, anti-hypertensive, and anticancer potential (Table 3). Here, we focus solely on the effects of oilseed proteins or peptides on some of the most concerning public health issues, including diabetes, obesity, and CVD.

5.1. Anti-diabetic effect

The consumption of oilseed proteins, hydrolysates, or bioactive peptides would have a positive effect on type 2 diabetes (T2D) by reducing blood glucose levels, enhancing insulin uptake, and inhibiting key enzymes involved in diabetes.¹⁰¹ According to a meta-analysis, long-term oral supplementation (over 6 months) of soy protein in patients with T2D had beneficial effects on blood glucose levels as well as serum LDL-C and C-reactive protein (inflammatory marker) levels.¹⁰² Similarly, longitudinal randomized clinical trials have revealed that replacing half of animal protein intake with soy proteins for 7 weeks in diabetic patients led to a reduction in total cholesterol, triglycerides (TG), LDL cholesterol and urine urea nitrogen.^{103,104} These changes could be attributed, on the one hand, to soy proteins that reduce hyperfiltration and, on the other hand, to the composition of the soy protein matrix rich in isoflavones and polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which improve lipid profiles, protect against hyperlipidemia, and renal vascular resistance. Therefore, soy proteins would have beneficial effects on diabetes and its associated complications, including renal diseases and CVD. However, the effect of intake of other oilseed proteins on diabetes has not yet been extensively studied, but their hydrolysates and biopeptides have been recognized for their positive effects. The inhibition of α -amylase and α -glucosidase activities, as well as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), are recognized to have anti-diabetic properties due to the central role of these enzymes in postprandial hyperglycemia and insulin secretion regulation. *In vitro* studies have reported that hydrolysates by alcalase of soy, flaxseed, rapeseed and walnut contain peptide sequences with α -glucosidase^{101,105} inhibitory properties, and rapeseed protein hydrolysate exhibited DPP-IV inhibitory activity.¹⁰⁵ These inhibitory activities have also been found in albumin and egg white peptides and are attributed to two AAs: proline and leucine. Proline is thought to affect peptide flexibility and enhance the binding affinity to α -amylase and α -glucosidase and protect peptides from proteolysis, while leucine is thought to be essential to enhance insulin secretion.¹⁰¹ Furthermore, the peptide LPLLR (Leu-Pro-Leu-Leu-Arg) purified from walnut protein hydrolysates improved insulin resistance in G2 hepatocytes by increasing glycogen synthesis and glucose uptake while decreasing gluconeogenesis. Peptides from flaxseed protein hydrolysates also demonstrated anti-diabetic activity by enhancing glucose uptake in L6 myoblast cells.¹⁰⁶ In a mouse model of type 2 diabetes, walnut peptides reduced

blood glucose levels by 64.82% and increased insulin secretion by 23.71%. Oilseed protein hydrolysates are thus considered to possess anti-diabetic properties *in vitro* or in animal models, but further trials are now needed with human subjects to validate these findings.

Oilseed proteins such as soy, flaxseed, rapeseed, and walnut thus possess anti-diabetic properties due to their inhibitory effects on insulin-regulating enzymes. Soy proteins are also associated with positive effects on heart and kidney diseases, making them a promising option for treating major complications in diabetic individuals, as well as in patients with hypertension.

5.2. Effect on hypertension

Oilseed proteins, especially those from soy, may help mitigate risk factors associated with hypertension. The benefits of soy protein on metabolic health have been extensively documented. A meta-analysis of randomized controlled trials revealed that soy protein consumption, when compared to carbohydrates, lowers both systolic and diastolic blood pressure in both hypertensive and normotensive subjects.¹⁰⁷ Isoflavones have demonstrated their ability to lower hypertension by interacting with oestrogen receptors, promoting endogenous nitric oxide (NO) production, thereby facilitating vasodilation, and mitigating oxidative stress and free radicals.^{107,108} Furthermore, the AA composition of soy proteins may also explain these hypotensive effects. The presence of arginine in soy proteins can regulate blood pressure by influencing NO production in the L-arginine-NO pathway. Additionally, the lower proportion of lysine compared to arginine could contribute to the hypotensive effect, as these two amino acids compete for the same transporter. While these results have not been demonstrated, we can assume similar effects might be observed with other oilseed proteins, as they also have an arginine content significantly higher than lysine.^{108,109} Finally, according to meta-analyses, soy protein consumption can improve lipid profiles by reducing the levels of TG and LDL, thus contributing to a decreased risk of hypertension.^{110,111} Plausible explanations seem to be linked, on the one hand, to the 7S globulin fraction of soy protein, which appears to inhibit hepatic Apo B synthesis, and on the other hand, to soy isoflavones that modulate oestrogen receptors and enhance lipid profiles. However, according to Moradi's¹¹⁰ systematic review and meta-analysis, the effect of isoflavones alone was significantly inferior to that of isoflavones in the presence of soy protein, suggesting that the observed effect arises from the proteins or their synergistic interaction.^{110,111}

Soy proteins have demonstrated positive effects on hypertension in humans. As for other oilseeds, their hydrolysates show significant potential. Bioactive peptides resulting from the hydrolysis of oilseed proteins have shown hypotensive effects *in vitro* and *in vivo*. Angiotensin-converting enzyme (ACE) and renin are two enzymes that regulate the system responsible for the vasoconstriction that leads to hypertension.¹¹² Defatted oilseeds are considered an excellent source for the production of a large range of renin and ACE inhibitory

peptides.^{105,113–116} For instance, alcalase hydrolysates of canola protein isolates exhibited 90.0% inhibition of ACE *in vitro* and pancreatin hydrolysates showed 63.2% inhibition of renin.¹¹³ These inhibitory properties were effective enough for these peptides to have a hypotensive effect *in vivo* when orally administered to spontaneously hypertensive rats. Pancreatin hydrolysates, which had the most effective combined *in vitro* ACE and renin inhibition effects, decreased systolic blood pressure from 2 h to 24 h after oral administration.¹¹³

The evidence thus suggests that incorporating soy protein into one's diet may help mitigate hypertensive risk factors in adults and serve as a crucial element of dietary approaches aimed at preventing CVD. Meanwhile, hydrolysates from other oilseed proteins show promise and could potentially serve as an alternative to antihypertensive medications. However, clinical trials are needed to confirm these results in humans.

5.3. Anti-obesity effect

Obesity is a growing problem worldwide, affecting more than 30% of adults in the United States,¹¹⁷ and increasing the incidence of various diseases including hypertension, atherosclerosis, and diabetes. Dietary intervention is among the proposed solutions to combat obesity. Due to their richness in fiber, PUFAs, and phytonutrients (phytoestrogens, polyphenols), which exhibit hypocholesterolemic, hypoglycemic, antioxidant, and anti-inflammatory properties, numerous studies have demonstrated that supplementing with oilseeds leads to a reduction in body weight, improved body composition, and a better lipid profile (Table 3).^{118,119}

Furthermore, proteins derived from oilseeds may also have beneficial effects against obesity, as it has been established that the consumption of protein-rich foods is more likely to induce a feeling of satiety and thermogenesis and support efforts to achieve a healthy body weight.^{120,121} A randomized, controlled study highlighted that a 6-month high-soy-protein, low-fat diet, with or without a guided physical activity program, resulted in weight loss and fat mass reduction in obese and pre-obese individuals.¹²² However, when compared to other dietary proteins, especially animal proteins, the differences in weight loss and changes in body composition were not significant.^{123–125} Thus, these results suggest that protein-rich, low-calorie diets may reduce body weight by increasing satiety, and these effects are not dependent on the protein source.

Obesity is also characterized by an energy balance disorder associated with hyperinsulinemia, insulin resistance, and abnormalities in lipid metabolism. It has been demonstrated that the consumption of soy proteins improves the energy balance in obese individuals. A study showed that a hypocaloric diet composed of soy proteins resulted in a similar reduction in body weight compared to a diet composed of casein proteins, but led to a greater reduction in plasma cholesterol and TG in obese patients.¹²⁶ Moreover, a randomized crossover trial demonstrated that the consumption of soy and hemp proteins led to lower postprandial blood glucose and

insulin concentrations.¹²⁷ Several mechanisms may explain the decrease in body mass and the improvement of lipid and glucose profiles after the consumption of soy proteins, including: (1) influencing lipogenesis by modulating the activities of hepatic lipogenic enzymes, (2) improving glucose homeostasis, lipid metabolism, and fatty acid oxidation by activating peroxisome-proliferator-activated receptors, (3) reducing adiposity by modulating the expression of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), a family of transcription factors that control several genes involved in the synthesis of fatty acids and cholesterol, and (4) mediating the action of hormones involved in the regulation of the body composition, such as insulin and leptin.^{127–129}

Finally, it has been shown that specific components of proteins, such as 7S globulin and β -conglycinin, can positively impact food intake and lipid metabolism. For example, in a randomized controlled study, β -conglycinin improved TG levels by suppressing fatty acid synthesis and activating fatty acid oxidation in the liver.¹³⁰ 7S globulin increased sterol excretion and decreased cholesterol synthesis by regulating the gene expression of CYP7A1 and HMG-CoA reductase, enzymes involved in bile acid and cholesterol synthesis in the liver.¹³¹

Regarding other oilseed proteins, few studies have focused on their effects on obesity. However, protein hydrolysates from various oilseed sources, such as cocoa seed, sesame, and chia, have shown promising results in reducing obesity in animal and *in vitro* studies.^{132–134} For instance, pepsin and pancreatin hydrolyzed chia proteins improved the plasma lipid profile, reduced inflammation, and decreased body fat and waist circumference in obese mice by modulating the expression of SREBP1 and PPAR, key regulators of adipogenesis.¹³² Thus, oilseed proteins, especially soy, appear to be of great interest in reducing obesity by promoting satiety and improving lipid and glucose profiles. However, additional studies should be dedicated to evaluating the effects of oilseed proteins other than soy on obesity in humans through comprehensive clinical trials.

6. Conclusions and perspectives

The demand for dietary plant-based proteins is growing fast and expected to continue growing due to their widespread popularity and environmental sustainability. Oilseeds are rich in proteins, lipids, bioactive compounds, and fiber, making these proteins a potentially valuable nutritional commodity, despite their lower anabolic potential compared to animal proteins.

Most oilseed proteins have an incomplete EAA profile, often deficient in lysine, and high in ANFs, resulting in lower protein digestibility and therefore lower AA bioavailability than animal proteins. To effectively incorporate oilseed proteins into the human diet, it is imperative to combine them judiciously with other protein sources to ensure compliance with all EAAs.

In this review, we have examined methods to reduce the ANF content in oilseeds and improve the nutritional value of proteins. However, it is important to note that these advancements are currently limited to small-scale, but this is now changing, as some major industrial groups are investing in setting up plants dedicated to the production of proteins from oilseeds. This reflects the strategic and therefore economic importance of developing these processes. Developing other plant protein resources is a way of breaking away from the dominance of the soya market, which is also of interest from an environmental point of view (GMOs, deforestation).

Oilseed proteins, particularly in the form of hydrolysates and peptides, demonstrate potential and promising beneficial effects against diabetes, hypertension, obesity, and CVD. However, thorough research and additional clinical data are necessary to confirm these properties in humans.

In conclusion, if oilseeds present strong potential as a new alternative source of dietary proteins, both nutritionally and in terms of health benefits, scientific progress and technological progress are essential before regular integration into our diet or recommendation for disease prevention and treatment. Confirming the beneficial effects of oilseed proteins in humans will ensure an economic advantage for industries, enabling the development of large-scale processing technologies and their industrialization with reduced financial risk.

Author contributions

L. T. performed the literature review and wrote the original draft. S. W. and C. V. revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflicts of interest

The authors have no potential conflicts of interest to report.

Acknowledgements

This review did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We thank the ANRT for funding L. T.'s PhD grant.

References

- 1 C. By-Nc-Sa, The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050.
- 2 F. Arrutia, E. Binner, P. Williams and K. W. Waldron, Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements, *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, **100**, 88–102.
- 3 J.-M. Chardigny and S. Walrand, Plant protein for food: opportunities and bottlenecks, *OCL*, 2016, **23**, D404.
- 4 L. S. A. conso, La grande ruée vers les protéines végétales.
- 5 Baromètre consommateurs de Protéines France, <https://onav.fr/barometre-consommateurs-de-proteines-france-les-francais-et-les-proteines-vegetales-en-2022/>, (accessed 29 September 2023).
- 6 A. G. A. Sá, Y. M. F. Moreno and B. A. M. Carciofi, Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet, *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, **97**, 170–184.
- 7 S. Shaghaghian, D. J. McClements, M. Khalesi, M. Garcia-Vaquero and A. Mirzapour-Kouhdasht, Digestibility and bioavailability of plant-based proteins intended for use in meat analogues: A review, *Trends Food Sci. Technol.*, 2022, **129**, 646–656.
- 8 T. Vinutha, R. R. Kumar, N. Bansal, G. Rama Prashat, S. Goswami, G. P. Mishra and C. Bharadwaj, in *Conceptualizing Plant-Based Nutrition: Bioresources, Nutrients Repertoire and Bioavailability*, ed. S. V. Ramesh and S. Praveen, Springer Nature, Singapore, 2022, pp. 107–121.
- 9 Report from the commission to the council and the European parliament on the development of plant proteins in the European Union, 2018.
- 10 OECD and Food and Agriculture Organization of the United Nations, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020–2029*, OECD, 2020.
- 11 K. Kotecka-Majchrzak, A. Sumara, E. Fornal and M. Montowska, Oilseed proteins – Properties and application as a food ingredient, *Trends Food Sci. Technol.*, 2020, **106**, 160–170.
- 12 J. Guéguen, S. Walrand and O. Bourgeois, Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine, *Cah. Nutr. Diet.*, 2016, **51**, 177–185.
- 13 J. Boye, R. Wijesinha-Bettoni and B. Burlingame, Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method, *Br. J. Nutr.*, 2012, **108**, S183–S211.
- 14 A. Moure, J. Sineiro, H. Domínguez and J. C. Parajó, Functionality of oilseed protein products: A review, *Food Res. Int.*, 2006, **39**, 945–963.
- 15 C. A. Butts, J. A. Monro and P. J. Moughan, In vitro determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans, *Br. J. Nutr.*, 2012, **108**, S282–S287.
- 16 Les protéines, <https://www.anses.fr/fr/content/les-prot%C3%A9ines>, (accessed 28 August 2023).
- 17 L. Day, J. A. Cakebread and S. M. Loveday, Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties, *Trends Food Sci. Technol.*, 2022, **119**, 428–442.
- 18 N. Shaheen, S. Islam, S. Munmun, Md. Mohiduzzaman and T. Longvah, Amino acid profiles and digestible indispensable amino acid scores of proteins from the prioritized key foods in Bangladesh, *Food Chem.*, 2016, **213**, 83–89.
- 19 Y. Zeng, E. Chen, X. Zhang, D. Li, Q. Wang and Y. Sun, Nutritional Value and Physicochemical Characteristics of Alternative Protein for Meat and Dairy—A Review, *Foods*, 2022, **11**, 3326.

- 20 S. R. Hertzler, J. C. Lieblein-Boff, M. Weiler and C. Allgeier, Plant Proteins: Assessing Their Nutritional Quality and Effects on Health and Physical Function, *Nutrients*, 2020, **12**, 3704.
- 21 L. M. Jiménez-Munoz, G. M. Tavares and M. Corredig, Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality, *Trends Food Sci. Technol.*, 2021, **113**, 139–150.
- 22 M. G. Nosworthy, J. Neufeld, P. Frohlich, G. Young, L. Malcolmson and J. D. House, Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses, *Food Sci. Nutr.*, 2017, **5**, 896–903.
- 23 L. Herreman, P. Nommensen, B. Pennings and M. C. Laus, Comprehensive overview of the quality of plant- And animal-sourced proteins based on the digestible indispensable amino acid score, *Food Sci. Nutr.*, 2020, **8**, 5379–5391.
- 24 P. Ertl, W. Knaus and W. Zollitsch, An approach to including protein quality when assessing the net contribution of livestock to human food supply, *Animal*, 2016, **10**, 1883–1889.
- 25 FAOSTAT, <https://www.fao.org/faostat/fr/#data/FBS/report>, (accessed 21 February 2023).
- 26 N. Singh, K. Singh Sandhu and M. Kaur, Characterization of starches separated from Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars, *J. Food Eng.*, 2004, **63**, 441–449.
- 27 S. E. Suárez-Martínez, R. A. Ferriz-Martínez, R. Campos-Vega, J. E. Elton-Puente, K. de la Torre Carbot and T. García-Gasca, Bean seeds: leading nutraceutical source for human health, *CyTA-J. Food*, 2016, **14**, 131–137.
- 28 Oilseed: World markets and Trade. May 2021 (assessed September 23, 2023).
- 29 J. Bárta, V. Bártová, M. Jarošová, J. Švajner, P. Smetana, J. Kadlec, V. Filip, J. Kyselka, M. Berčíková, Z. Zdráhal, M. Bjelková and M. Kozak, Oilseed Cake Flour Composition, Functional Properties and Antioxidant Potential as Effects of Sieving and Species Differences, *Foods*, 2021, **10**, 2766.
- 30 K. S. Sandhu, L. F. Merrick, S. Sankaran, Z. Zhang and A. H. Carter, Prospectus of Genomic Selection and Phenomics in Cereal, Legume and Oilseed Breeding Programs, *Front. Genet.*, 2021, **12**, DOI: [10.3389/fgene.2021.829131](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.829131).
- 31 S. D. Arntfield, in *Proteins in Food Processing*, ed. R. Y. Yada, Woodhead Publishing, 2nd edn, 2018, pp. 187–221.
- 32 R. Singh, S. Langyan, S. Sangwan, B. Rohtagi, A. Khandelwal and M. Shrivastava, Protein for Human Consumption From Oilseed Cakes: A Review, *Front. Sustainable Food Syst.*, 2022, **6**, DOI: [10.3389/fsufs.2022.856401](https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.856401).
- 33 F. Guillin, These de doctorat, université Paris-Saclay, 2021.
- 34 F. and A. O. of the U. Nations, Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA 4–8 December 1989, Food & Agriculture Org., 1991.
- 35 Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO Expert Consultation [on Protein Quality Evaluation in Human Nutrition], 31 March–2 April, 2011, Auckland, New Zealand, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2013.
- 36 A. Brodkorb, L. Egger, M. Alminger, P. Alvito, R. Assunção, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carrière, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, C. Edwards, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. R. Mackie, C. Martins, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, M. Minekus, R. Portmann, C. N. Santos, I. Souchon, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and I. Recio, INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nat. Protoc.*, 2019, **14**, 991–1014.
- 37 A. G. A. Sá, Y. M. F. Moreno and B. A. M. Carciofi, Food processing for the improvement of plant proteins digestibility, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2020, **60**, 3367–3386.
- 38 I. Berrazaga, V. Micard, M. Gueugneau and S. Walrand, The Role of the Anabolic Properties of Plant- versus Animal-Based Protein Sources in Supporting Muscle Mass Maintenance: A Critical Review, *Nutrients*, 2019, **11**, 1825.
- 39 S. van Vliet, N. A. Burd and L. J. van Loon, The Skeletal Muscle Anabolic Response to Plant- versus Animal-Based Protein Consumption, *J. Nutr.*, 2015, **145**, 1981–1991.
- 40 B. Jithender, K. Uppendar, C. Nickhil and P. J. Rathod, Nutritional and anti-nutritional factors present in oil seeds: An overview, *Int. J. Chem. Stud.*, 2019, **7**, 1159–1165.
- 41 M. Carbonaro, P. Maselli and A. Nucara, Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study, *Amino Acids*, 2012, **43**, 911–921.
- 42 E. Bartkiene, G. Juodeikiene and D. Vidmantiene, Nutritional quality of fermented defatted soya and flaxseed flours and their effect on texture and sensory characteristics of wheat sourdough bread, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2012, **63**, 722–729.
- 43 E. Capuano, T. Oliviero, V. Fogliano and N. Pellegrini, Role of the food matrix and digestion on calculation of the actual energy content of food, *Nutr. Rev.*, 2018, **76**, 274–289.
- 44 L. C. V. Ítavo, C. M. Soares, C. C. B. F. Ítavo, A. M. Dias, H. V. Petit, E. S. Leal and A. D. V. de Souza, Calorimetry, chemical composition and in vitro digestibility of oilseeds, *Food Chem.*, 2015, **185**, 219–225.
- 45 D. M. Kadam, M. Kumar and A. Kasara, Application of high energy electromagnetic radiations in elimination of anti-nutritional factors from oilseeds, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2021, **151**, 112085.
- 46 K. G. Duodu, J. R. N. Taylor, P. S. Belton and B. R. Hamaker, Factors affecting sorghum protein digestibility, *J. Cereal Sci.*, 2003, **38**, 117–131.
- 47 M. Samtiya, R. E. Aluko and T. Dhewa, Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview, *Food Prod., Process. Nutr.*, 2020, **2**, 6.

- 48 P. H. Mattila, J.-M. Pihlava, J. Hellström, M. Nurmi, M. Euroola, S. Mäkinen, T. Jalava and A. Pihlanto, Contents of phytochemicals and antinutritional factors in commercial protein-rich plant products, *Food Qual. Saf.*, 2018, **2**, 213–219.
- 49 S.-W. Hahm, H. Son, W. Kim, Y.-K. Oh and Y.-S. Son, Effects of Gamma Irradiation on Nutrient Composition, Anti-nutritional Factors, In vitro Digestibility and Ruminal Degradation of Whole Cotton Seed, *J. Anim. Sci. Technol.*, 2013, **55**, 123–130.
- 50 M. D. E.-D. H. Farag, Effect of radiation and other processing methods on protein quality of sunflower meal, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, **79**, 1565–1570.
- 51 K. Soni, M. Samtiya, V. Krishnan and T. Dhewa, in *Conceptualizing Plant-Based Nutrition: Bioresources, Nutrients Repertoire and Bioavailability*, ed. S. V. Ramesh and S. Praveen, Springer Nature, Singapore, 2022, pp. 157–179.
- 52 M. S. Moghaddasi, Linseed and usages in human life, *Adv. Environ. Biol.*, 2011, 1380–1393.
- 53 A. P. Vig, G. Rampal, T. S. Thind and S. Arora, Bio-protective effects of glucosinolates – A review, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 1561–1572.
- 54 E. C. Lowcock, M. Cotterchio and B. A. Boucher, Consumption of flaxseed, a rich source of lignans, is associated with reduced breast cancer risk, *Cancer, Causes Control*, 2013, **24**, 813–816.
- 55 V. C. Chang, M. Cotterchio, B. A. Boucher, D. J. A. Jenkins, L. Mirea, S. E. McCann and L. U. Thompson, Effect of Dietary Flaxseed Intake on Circulating Sex Hormone Levels among Postmenopausal Women: A Randomized Controlled Intervention Trial, *Nutr. Cancer*, 2019, **71**, 385–398.
- 56 A. F. Majdalawieh and Z. R. Mansour, Sesamol, a major lignan in sesame seeds (*Sesamum indicum*): Anti-cancer properties and mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.*, 2019, **855**, 75–89.
- 57 D. Tungmunthum, A. Thongboonyou, A. Pholboon and A. Yangsabai, Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview, *Medicines*, 2018, **5**, 93.
- 58 M. Lutz, E. Fuentes, F. Ávila, M. Alarcón and I. Palomo, Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases, *Molecules*, 2019, **24**, 366.
- 59 F. Shahidi, V. Varatharajan, W. Y. Oh and H. Peng, Phenolic compounds in agri-food by-products, their bioavailability and health effects, *J. Food Bioact.*, 2019, **5**, 57–119.
- 60 L. Smith, J. Patterson, L. Walker and M. Verghese, Chemopreventive Potential of Sunflower Seeds in a Human Colon Cancer Cell Line, *Int. J. Cancer Res.*, 2016, **12**, 40–50.
- 61 P. Pająk, R. Socha, D. Galkowska, J. Rożnowski and T. Fortuna, Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts, *Food Chem.*, 2014, **143**, 300–306.
- 62 D. L. Alekel, A. S. Germain, C. T. Peterson, K. B. Hanson, J. W. Stewart and T. Toda, Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **72**, 844–852.
- 63 N. J. Ollberding, U. Lim, L. R. Wilkens, V. W. Setiawan, Y. B. Shvetsov, B. E. Henderson, L. N. Kolonel and M. T. Goodman, Legume, Soy, Tofu, and Isoflavone Intake and Endometrial Cancer Risk in Postmenopausal Women in the Multiethnic Cohort Study, *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.*, 2012, **104**, 67–76.
- 64 M. Rivas, R. P. Garay, J. F. Escanero, P. Cia Jr., P. Cia and J. O. Alda, Soy Milk Lowers Blood Pressure in Men and Women with Mild to Moderate Essential Hypertension, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 1900–1902.
- 65 V. Kumar, A. K. Sinha, H. P. S. Makkar and K. Becker, Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review, *Food Chem.*, 2010, **120**, 945–959.
- 66 E. Feizollahi, R. S. Mirmahdi, A. Zoghi, R. T. Zijlstra, M. S. Roopesh and T. Vasanthan, Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products, *Food Res. Int.*, 2021, **143**, 110284.
- 67 A. Goyal, V. Sharma, N. Upadhyay, S. Gill and M. Sihag, Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food, *J. Food Sci. Technol.*, 2014, **51**, 1633–1653.
- 68 E. Nattagh-Eshstivani, H. Barghchi, N. Pahlavani, M. Barati, Y. Amiri, A. Fadel, M. Khosravi, S. Talebi, P. Arzhang, R. Ziaei and A. Ghavami, Biological and pharmacological effects and nutritional impact of phytosterols: A comprehensive review, *Phytother. Res.*, 2022, **36**, 299–322.
- 69 L. Fontané, J. Pedro-Botet, S. Garcia-Ribera, E. Climent, M. D. Muns, S. Ballesta, P. Satorra, J. A. Flores-Le Roux and D. Benaiges, Use of phytosterol-fortified foods to improve LDL cholesterol levels: A systematic review and meta-analysis, *Nutr., Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2023, **33**, 1472–1480.
- 70 R. A. Moreau, L. Nyström, B. D. Whitaker, J. K. Winkler-Moser, D. J. Baer, S. K. Gebauer and K. B. Hicks, Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses, *Prog. Lipid Res.*, 2018, **70**, 35–61.
- 71 A. Thakur, V. Sharma and A. Thakur, An overview of anti-nutritional factors in food, *Int. J. Chem. Stud.*, 2019, **7**(1), 2472–2479.
- 72 A. C. de Camargo, B. T. Favero, M. C. Morzelle, M. Franchin, E. Alvarez-Parrilla, L. A. de la Rosa, M. V. Galdi, M. R. Maróstica Júnior, F. Shahidi and A. R. Schwember, Is Chickpea a Potential Substitute for Soybean? Phenolic Bioactives and Potential Health Benefits, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 2644.
- 73 C. P. Duodu, D. Adjei-Boateng, R. E. Edziyie, N. W. Agbo, G. Owusu-Boateng, B. K. Larsen and P. V. Skov, Processing techniques of selected oilseed by-products of potential use in animal feed: Effects on proximate nutrient composition, amino acid profile and antinutrients, *Anim. Nutr.*, 2018, **4**, 442–451.

- 74 D. C. Pavlov and N. A. Tadorov, in *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*, ed. E. Nwokolo and J. Smartt, Springer US, Boston, MA, 1996, pp. 245–257.
- 75 E. Nwokolo, in *Food and Feed from Legumes and Oilseeds*, ed. E. Nwokolo and J. Smartt, Springer US, Boston, MA, 1996, pp. 259–269.
- 76 S. M. Adeyemo and A. A. Onilude, Enzymatic Reduction of Anti-nutritional Factors in Fermenting Soybeans by *Lactobacillus plantarum* Isolates from Fermenting Cereals, *Niger. Food J.*, 2013, **31**, 84–90.
- 77 M. Folasade and R. Akinoso, Nutrient composition and effect of processing treatments on anti nutritional factors of Nigerian sesame (*Sesamum indicum* Linn) cultivars, *Int. Food Res. J.*, 2013, **20**, 2293–2300.
- 78 A. Rivera del Rio, R. M. Boom and A. E. M. Janssen, Effect of Fractionation and Processing Conditions on the Digestibility of Plant Proteins as Food Ingredients, *Foods*, 2022, **11**, 870.
- 79 D. Carlson and H. D. Poulsen, Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed—effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2003, **103**, 141–154.
- 80 N. Shiferaw Terefe and M. A. Augustin, Fermentation for tailoring the technological and health related functionality of food products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2020, **60**, 2887–2913.
- 81 Z.-M. Liu, S. C. Ho, Y.-M. Chen and J. Woo, Effect of soy protein and isoflavones on blood pressure and endothelial cytokines: a 6-month randomized controlled trial among postmenopausal women, *J. Hypertens.*, 2013, **31**, 384.
- 82 P. Qin, T. Wang and Y. Luo, A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development, *J. Agric. Food Res.*, 2022, **7**, 100265.
- 83 J. L. Slavin, Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber, *J. Am. Diet. Assoc.*, 2008, **108**, 1716–1731.
- 84 J.-W. Hou, R.-C. Yu and C.-C. Chou, Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria, *Food Res. Int.*, 2000, **33**, 393–397.
- 85 Y.-S. Song, J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, C. Vidal-Valdeverde and E. G. de Mejia, Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products, *Food Chem.*, 2008, **108**, 571–581.
- 86 L. Xu, B. Du and B. Xu, A systematic, comparative study on the beneficial health components and antioxidant activities of commercially fermented soy products marketed in China, *Food Chem.*, 2015, **174**, 202–213.
- 87 L. M. Paucar-Menacho, M. A. Berhow, J. M. G. Mandarino, Y. K. Chang and E. G. de Mejia, Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated Brazilian soybean cultivar BRS 258, *Food Res. Int.*, 2010, **43**, 1856–1865.
- 88 M. Ma, H. Zhang, Y. Xie, M. Yang, J. Tang, P. Wang, R. Yang and Z. Gu, Response of nutritional and functional composition, anti-nutritional factors and antioxidant activity in germinated soybean under UV-B radiation, *LWT—Food Sci. Technol.*, 2020, **118**, 108709.
- 89 V. Kumar, A. Rani, V. Pandey and G. S. Chauhan, Changes in lipoxygenase isozymes and trypsin inhibitor activity in soybean during germination at different temperatures, *Food Chem.*, 2006, **99**, 563–568.
- 90 H.-M. Bau, C. Villaume, J.-P. Nicolas and L. Méjean, Effect of Germination on Chemical Composition, Biochemical Constituents and Antinutritional Factors of Soya Bean (*Glycine max*) Seeds, *J. Sci. Food Agric.*, 1997, **73**, 1–9.
- 91 D. B. Egli, D. M. TeKrony, J. J. Heitholt and J. Rupe, Air Temperature During Seed Filling and Soybean Seed Germination and Vigor, *Crop Sci.*, 2005, **45**, 1329–1335.
- 92 B. P. Ismail, L. Senaratne-Lenagala, A. Stube and A. Brackenridge, Protein demand: review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production, *Anim. Front.*, 2020, **10**, 53–63.
- 93 I. Joye, Protein Digestibility of Cereal Products, *Foods*, 2019, **8**, 199.
- 94 S. J. Park, T. W. Kim and B.-K. Baik, Relationship between proportion and composition of albumins, and in vitro protein digestibility of raw and cooked pea seeds (*Pisum sativum* L.), *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 1719–1725.
- 95 S. Y. J. Sim, A. Sriv, J. H. Chiang and C. J. Henry, Plant Proteins for Future Foods: A Roadmap, *Foods*, 2021, **10**, 1967.
- 96 H. Zhou, Y. Hu, Y. Tan, Z. Zhang and D. J. McClements, Digestibility and gastrointestinal fate of meat versus plant-based meat analogs: An in vitro comparison, *Food Chem.*, 2021, **364**, 130439.
- 97 Z. F. Bhat, S. Kumar and H. F. Bhat, Bioactive peptides of animal origin: a review, *J. Food Sci. Technol.*, 2015, **52**, 5377–5392.
- 98 D. P. Mohanty, S. Mohapatra, S. Misra and P. S. Sahu, Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2016, **23**, 577–583.
- 99 D. Montesano, M. Gallo, F. Blasi and L. Cossignani, Biopeptides from vegetable proteins: new scientific evidences, *Curr. Opin. Food Sci.*, 2020, **31**, 31–37.
- 100 D. Kadam and S. S. Lele, Value addition of oilseed meal: a focus on bioactive peptides, *Food Meas.*, 2018, **12**, 449–458.
- 101 J. Wang, T. Wu, L. Fang, C. Liu, X. Liu, H. Li, J. Shi, M. Li and W. Min, Anti-diabetic effect by walnut (*Juglans mandshurica* Maxim.)-derived peptide LPLLR through inhibiting α -glucosidase and α -amylase, and alleviating insulin resistance of hepatic HepG2 cells, *J. Funct. Foods*, 2020, **69**, 103944.
- 102 X.-M. Zhang, Y.-B. Zhang and M.-H. Chi, Soy Protein Supplementation Reduces Clinical Indices in Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome, *Yonsei Med. J.*, 2016, **57**, 681–689.
- 103 L. Azadbakht, R. Shakerhosseini, S. Atabak, M. Jamshidian, Y. Mehrabi and A. Esmail-Zadeh, Beneficiary effect of dietary soy protein on lowering

Food & Function

Review

- plasma levels of lipid and improving kidney function in type II diabetes with nephropathy, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2003, **57**, 1292–1294.
- 104 L. Azadbakht, S. Atabak and A. Esmailzadeh, Soy Protein Intake, Cardiorenal Indices, and C-Reactive Protein in Type 2 Diabetes With Nephropathy: A longitudinal randomized clinical trial, *Diabetes Care*, 2008, **31**, 648–654.
- 105 R. Han, A. J. Hernández Álvarez, J. Maycock, B. S. Murray and C. Boesch, Comparison of alcalase- and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates – Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties, *Curr. Res. Food Sci.*, 2021, **4**, 141–149.
- 106 A. Doyen, C. C. Udenigwe, P. L. Mitchell, A. Marette, R. E. Aluko and L. Bazinet, Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes, *Food Chem.*, 2014, **145**, 66–76.
- 107 J.-Y. Dong, X. Tong, Z.-W. Wu, P.-C. Xun, K. He and L.-Q. Qin, Effect of soya protein on blood pressure: a meta-analysis of randomised controlled trials, *Br. J. Nutr.*, 2011, **106**, 317–326.
- 108 J. He, D. Gu, X. Wu, J. Chen, X. Duan, J. Chen and P. K. Whelton, Effect of Soybean Protein on Blood Pressure: A Randomized, Controlled Trial, *Ann. Intern. Med.*, 2005, **143**, 1–9.
- 109 D. D. Ramdath, E. M. T. Padhi, S. Sarfaraz, S. Renwick and A. M. Duncan, Beyond the Cholesterol-Lowering Effect of Soy Protein: A Review of the Effects of Dietary Soy and Its Constituents on Risk Factors for Cardiovascular Disease, *Nutrients*, 2017, **9**, 324.
- 110 M. Moradi, E. Daneshzad and L. Azadbakht, The effects of isolated soy protein, isolated soy isoflavones and soy protein containing isoflavones on serum lipids in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2020, **60**, 3414–3428.
- 111 K. Reynolds, A. Chin, K. A. Lees, A. Nguyen, D. Bujnowski and J. He, A Meta-Analysis of the Effect of Soy Protein Supplementation on Serum Lipids, *Am. J. Cardiol.*, 2006, **98**, 633–640.
- 112 A. T. Girgih, A. Alashi, R. He, S. Malomo and R. E. Aluko, Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Eur. J. Nutr.*, 2014, **53**, 1237–1246.
- 113 A. M. Alashi, C. L. Blanchard, R. J. Mailer, S. O. Agboola, A. J. Mawson, R. He, S. A. Malomo, A. T. Girgih and R. E. Aluko, Blood pressure lowering effects of Australian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats, *Food Res. Int.*, 2014, **55**, 281–287.
- 114 D. Nakano, K. Ogura, M. Miyakoshi, F. Ishii, H. Kawanishi, D. Kurumazuka, C.-J. Kwak, K. Ikemura, M. Takaoka, S. Moriguchi, T. Iino, A. Kusumoto, S. Asami, H. Shibata, Y. Kiso and Y. Matsumura, Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2006, **70**, 1118–1126.
- 115 I. D. Nwachukwu, A. T. Girgih, S. A. Malomo, J. O. Onuh and R. E. Aluko, Thermoase-Derived Flaxseed Protein Hydrolysates and Membrane Ultrafiltration Peptide Fractions Have Systolic Blood Pressure-Lowering Effects in Spontaneously Hypertensive Rats, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 18131–18147.
- 116 A. T. Girgih, C. C. Udenigwe, H. Li, A. P. Adebisi and R. E. Aluko, Kinetics of Enzyme Inhibition and Antihypertensive Effects of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysates, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2011, **88**, 1767–1774.
- 117 K. M. Flegal, M. D. Carroll, C. L. Ogden and L. R. Curtin, Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999–2008, *J. Am. Med. Assoc.*, 2010, **303**, 235–241.
- 118 S. J. Bhatena and M. T. Velasquez, Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, **76**, 1191–1201.
- 119 C. S. A. Sugizaki and M. M. V. Naves, Potential Prebiotic Properties of Nuts and Edible Seeds and Their Relationship to Obesity, *Nutrients*, 2018, **10**, 1645.
- 120 G. H. Anderson and S. E. Moore, Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans, *J. Nutr.*, 2004, **134**, 974S–979S.
- 121 N. Hwalla Baba, S. Sawaya, N. Torbay, Z. Habbal, S. Azar and S. A. Hashim, High protein vs high carbohydrate hypoenergetic diet for the treatment of obese hyperinsulinemic subjects, *Int. J. Obes.*, 1999, **23**, 1202–1206.
- 122 P. Deibert, D. König, A. Schmidt-Trucksass, K. S. Zaenker, I. Frey, U. Landmann and A. Berg, Weight loss without losing muscle mass in pre-obese and obese subjects induced by a high-soy-protein diet, *Int. J. Obes.*, 2004, **28**, 1349–1352.
- 123 M. Neacsu, C. Fyfe, G. Horgan and A. M. Johnstone, Appetite control and biomarkers of satiety with vegetarian (soy) and meat-based high-protein diets for weight loss in obese men: a randomized crossover trial, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2014, **100**, 548–558.
- 124 J. W. Anderson, J. Fuller, K. Patterson, R. Blair and A. Tabor, Soy compared to casein meal replacement shakes with energy-restricted diets for obese women: randomized controlled trial, *Metabolism*, 2007, **56**, 280–288.
- 125 K. J. Speaker, R. D. Sayer, J. C. Peters, H. N. Foley, Z. Pan, H. R. Wyatt, M. R. Flock, R. Mukherjea and J. O. Hill, Effects of consuming a high-protein diet with or without soy protein during weight loss and maintenance: a non-inferiority, randomized clinical efficacy trial, *Obes. Sci. Pract.*, 2018, **4**, 357–366.
- 126 O. Bosello, L. Cominacini, I. Zocca, U. Garbin, R. Compri, A. Davoli and L. Brunetti, Short- and long-term effects of hypocaloric diets containing proteins of different sources on plasma lipids and apoproteins of obese subjects, *Ann. Nutr. Metab.*, 1988, **32**, 206–214.

Review

Food & Function

- 127 R. C. Mollard, A. Johnston, A. Serrano Leon, H. Wang, P. J. Jones and D. S. MacKay, Acute effects of hemp protein consumption on glycemic and satiety control: results of 2 randomized crossover trials, *Appl. Physiol., Nutr., Metab.*, 2021, **46**, 887–896.
- 128 M. T. Velasquez and S. J. Bhatena, Role of Dietary Soy Protein in Obesity, *Int. J. Med. Sci.*, 2007, **4**, 72–82.
- 129 C. M. Rebholz, K. Reynolds, M. R. Wofford, J. Chen, T. N. Kelly, H. Mei, P. K. Whelton and J. He, Effect of soybean protein on novel cardiovascular disease risk factors: a randomized controlled trial, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2013, **67**, 58–63.
- 130 M. Nishimura, T. Ohkawara, Y. Sato, H. Satoh, Y. Takahashi, M. Hajika and J. Nishihira, Improvement of Triglyceride Levels through the Intake of Enriched- β -Conglycinin Soybean (Nanahomare) Revealed in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study, *Nutrients*, 2016, **8**, 491.
- 131 Y. Liu, J. Yang, L. Lei, L. Wang, X. Wang, K. Ying Ma, X. Yang and Z.-Y. Chen, 7S protein is more effective than total soybean protein isolate in reducing plasma cholesterol, *J. Funct. Foods*, 2017, **36**, 18–26.
- 132 M. Grancieri, T. A. Verediano, C. T. Sant'Ana, A. de Assis, R. L. Toledo, E. G. de Mejia and H. S. D. Martino, Digested protein from chia seed (*Salvia hispanica* L) prevents obesity and associated inflammation of adipose tissue in mice fed a high-fat diet, *PharmaNutrition*, 2022, **21**, 100298.
- 133 L. J. Coronado-Cáceres, G. Rabadán-Chávez, L. Mojica, B. Hernández-Ledesma, L. Quevedo-Corona and E. Lugo Cervantes, Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Seed Proteins' Anti-Obesity Potential through Lipase Inhibition Using In Silico, In Vitro and In Vivo Models, *Foods*, 2020, **9**, 1359.
- 134 S. Chaipoot, W. Punfa, S. Ounjaijean, R. Phongphisutthinant, K. Kulprachakarn, W. Parklak, L. Phaworn, P. Rotphet and K. Boonyapranai, Antioxidant, Anti-Diabetic, Anti-Obesity, and Antihypertensive Properties of Protein Hydrolysate and Peptide Fractions from Black Sesame Cake, *Molecules*, 2023, **28**, 211.

REVIEW



Plant proteins: are they a good alternative to animal proteins in older people?

Lina Toutirais^{a,b}, Carole Vaysse^a, Marine Gueugneau^b
and Stephane Walrand^{b,c}

Purpose of review

This review provides the latest insight into the impact of consuming plant-based protein for older people.

Recent findings

According to the latest data, a healthy diet rich in plant-based-protein-rich-food could promote healthy aging. This health effect is partly because of the amino acid composition of proteins, as well as to the important constituents such as fiber and bioactive compounds found in the matrix. Furthermore, even though animal protein is more effective at stimulating muscle protein synthesis, a high consumption of plant protein (beyond 31 g/day) appears to enhance physical performance and reduce the risk of frailty in older individuals.

Summary

Recent literature highlights numerous health benefits for older people associated with a substantial intake of plant-based vs. animal-based protein, both in preventing and mitigating chronic age-related diseases and reducing the risk of all-cause mortality. However, a high intake of plant-based protein-rich products could pose risks of malnutrition and fiber-related intestinal intolerances. Further research is needed to assess the risk-benefit ratio of a high consumption of plant proteins in older individuals before we can make robust recommendations on how far animal proteins can be healthfully replaced with plant proteins.

Keywords

chronic diseases, mortality risk, older people, plant proteins, sarcopenia

INTRODUCTION

Because of global population aging, preserving the well being of older people is fast emerging as a major societal challenge. The global population aged 60 years and over reached 1.4 billion in 2020 and is projected to reach 2.1 billion by 2050 [1]. Aging is accompanied by observable physiological changes that frequently lead to diseases such as cancer, type 2 diabetes (T2D), chronic kidney disease (CKD), cardiovascular disease (CVD), osteoporosis, and sarcopenia [1].

Dietary proteins play a crucial role in maintaining physiological functioning and preventing these noncommunicable diseases. European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN) guidelines recommend a daily quantity of 1–1.2 g of proteins/kg body weight/day for healthy older individuals, higher than the recommended daily allowance of 0.8 g/kg body weight/day in the general population [2].

Beyond the quantity of protein intake, the quality and source of protein eaten both play a central

role in the health of older people. Animal proteins provide all the essential amino acids (EAAs) and are more bioavailable than their plant counterparts [3[•]]. Moreover, protein-rich foods also contain other components that can influence health and may explain the effects attributed to dietary proteins. For example, animal proteins are generally associated with saturated fats whereas plant proteins are often accompanied by fiber and bioactive components [4]. As a result, numerous studies have examined the effect of plant protein vs. animal protein intake on consumer health, primarily in terms of

^aITERG, Department of Nutritional Health and Lipid Biochemistry, Bordeaux, ^bUniversité Clermont Auvergne, INRAE, UNH Clermont Ferrand, France and ^cDepartment of Clinical Nutrition, Clermont-Ferrand University Hospital, Clermont-Ferrand, France

Correspondence to Lina Toutirais, Unité de nutrition humaine de Clermont-Ferrand, France. Tel: +33 7 81 61 43 52; e-mail: lina.toutirais@doctorant.uca.fr

Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2024, 27:000–000

DOI:10.1097/MCO.0000000000001026

Hot topic

KEY POINTS

- Plant-based food protein improves metabolic profile and thus reduces the risk of developing chronic diseases in older people.
- A substantial intake of plant-based proteins can be as effective, if not superior, to animal proteins for promoting muscle mass development, reducing risk of frailty, and improving physical performance in older individuals.
- Replacing a portion of animal-source protein intake, particularly red meat, with plant-based proteins may help reduce mortality risks.

risks for frailty [5,6^{***},7,8^{***}], development of chronic diseases such as diabetes [9], healthy aging [10], and mortality [10].

The objective of this narrative review is to examine the latest evidence demonstrating benefits to older people of consuming plant-based proteins and to highlight situations where plant-based protein has a greater impact on health than animal-source protein.

PLANT PROTEIN AND METABOLIC DYSFUNCTION

Aging is a complex process that can lead to a gradual development of metabolic disorders such as high plasma triglycerides, low levels of HDL cholesterol, impaired glucose metabolism, high blood pressure, and increased concentrations of inflammatory biomarkers, thereby increasing the risk of chronic diseases [11]. Lifestyle modifications, particularly dietary habits, are one of the main therapeutic strategies against these metabolic changes [11]. A healthy diet based on plant-source protein, typically plenty of fruit, vegetables, nuts, legumes, and cereals, has been presented as having a positive impact on older individuals [12,13]. Plant-based foods often have a low energy density because of their high fiber content, which confers beneficial effects against inflammation, insulin resistance, and weight loss [14]. For example, Shivakoti *et al.* [15] recently demonstrated that dietary cereal fiber consumption by individuals aged 65 years and over had a favorable effect on inflammation by significantly reducing blood concentrations of C-reactive protein, interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA). The hypothesis put forward by the authors is that the decrease in IL-1RA, an anti-inflammatory cytokine that inhibits IL-1 β , could be associated with the reduction in IL-1 β induced by fibers. These beneficial effects were associated with a decrease in

the incidence of CVD. Furthermore, plant proteins are accompanied by numerous other plant food-derived nutrients and bioactive components such as minerals, vitamins, polyphenols, phytosterols, carotenoids, and other phytonutrients, and many studies have shown that some of these compounds have antioxidant and anti-inflammatory properties that can improve insulin sensitivity, inflammation, and blood pressure [12,13,16]. The lipid profile of plant-based foods, especially seeds and nuts, consists of monounsaturated fatty acids and omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω 3 fatty acids) that help to decrease LDL cholesterol and triglycerides [17^{**}]. In contrast, meat products are sources of saturated fats, sodium, and heme iron, which have been associated with CVD [18] and cancer [19^{**},20]. In addition to the protein matrix, amino acid composition is another important factor [21]. Arginine, for example, is thought to have a hypocholesterolemic effect, unlike leucine, which is a precursor to cholesterol in humans, and so soy protein, which has a low leucine/arginine ratio, may have a hypocholesterolemic effect [22]. Furthermore, compared with animal proteins, plant proteins contain lower levels of lysine and methionine, which are EAAs that can produce a hypercholesterolemic response, and higher levels of nonessential amino acids such as arginine, a precursor to the potent vasodilator nitric oxide, which is beneficial for blood pressure [23].

EFFECT OF SUBSTITUTING ANIMAL PROTEIN WITH PLANT PROTEIN ON AGE-RELATED DISEASES

According to recently published studies, substituting animal proteins with plant proteins could have a protective role against the incidence and progression of age-related T2D, CVD and CKD [9,24^{*},25^{*}].

Li *et al.* [9] studied a large cohort of postmenopausal women aged over 50 years and observed that T2D is mainly mediated by obesity-related inflammation and endothelial dysfunction. They found that replacing one portion per day of meat or eggs with protein-rich plant-based food including whole grains led to a 13–26% reduction in the risk for T2D [9]. Similarly, replacing animal proteins, particularly processed meat and seafood and eggs, with protein-rich plant-based food (legumes, nuts, whole grains) led to a decrease in BMI, waist circumference, and LDL cholesterol concentrations and a lower incidence of CVD over a long (10–20 years) period in an Asian and American population with an average age of 50 years at the beginning of the study [26]. These results may be explained by the fact that whole grains and nuts are rich in phytonutrients and ω 3 fatty acids with anti-inflammatory and

antioxidant properties and also rich in fiber, which can decrease systemic inflammation, increase satiety, reduce calorie intake, improve insulin resistance, and enhance glucose and fatty acid metabolism [15,27^{*}]. However, a high-fiber diet that increases satiety and reduced calorie intake could also pose a risk of malnutrition in the elderly [28]. Conversely, animal proteins, especially from red and processed meat, poultry and eggs, have been associated with increased risk for T2D because of higher serum ferritin and lipid metabolites. However, substituting unprocessed fish for plant proteins was not associated with a lower risk of CVD, as fish is rich in ω 3 fatty acids, which have cardioprotective properties. Indeed, consuming fish once or twice a week may reduce the risk of cardiometabolic multimorbidity in elderly men [29^{*}]. Furthermore, replacing meat with ω 3-rich seafood led to a reduction in the risk for T2D. [9]

Moreover, the link between plant proteins and their beneficial effects on the progression of kidney diseases has recently been documented in older people. The increase in circulating fibroblast growth factor 23 (FGF23), one of the earliest signs of CKD, leads to increased phosphate excretion, promoting the formation of renal microcrystals and lesions. The persistent elevation of FGF23, resulting from the decrease in functional nephrons caused by renal lesions, triggers an accelerated deterioration that exacerbates the progression of CKD [25^{*}]. Yoshioka *et al.* [25^{*}] showed that replacing 3% of animal-protein energy from with plant-protein energy was associated with lower serum FGF23 levels in CKD patients. This is explained by the fact that, in plants, phytates are the major form of phosphorus stockage, which is poorly bioavailable to humans. Thus, replacing a portion of animal protein intake with plant proteins could be a strategy to limit phosphate absorption without resorting to protein restriction. However, it is important to note that the phytate tends to bind with other components, notably micronutrients such as copper, magnesium, lead, and zinc, preventing their absorption in the gastrointestinal tract. Phytate intake can exacerbate mineral deficiencies in older people, who are already particularly prone to this issue [30]. Moreover, Yoshioka *et al.* did not specify the effect of animal proteins on FGF23 levels based on source. Note that processed meat products have the highest bioavailable phosphorus, which has a more pronounced effect on CKD [31,32]. Moreover, Kubo *et al.* [33] showed that seafood consumption was inversely associated with risk for CKD, whereas meat, eggs, and dairy products were not, which suggests that the benefit of seafood could be attributed to the anti-

inflammatory effect of its component ω 3 fatty acids [33]. It is, therefore, important to distinguish protein sources when developing dietary guidelines aimed at reducing the progression and risk of kidney disease. Another important factor is the amount of dietary protein intake. According to the KDOQI 2020 guidelines on nutrition in CKD, moderate-to-severe protein restriction (0.4–0.6 g/kg/day) should be implemented in older adults with end-stage CKD. Indeed, chronic ingestion of a protein-rich diet increases glomerular pressure and filtration rate, leading to renal damage. Moreover, proteins, mainly animal-source proteins, induce metabolic acidosis and increase serum urea levels, which promotes the synthesis of reactive oxygen species and uremic toxins [34^{**}]. However, we do not know what effects a plant-based protein-rich diet would have on progression of the disease and whether the use of plant proteins could make it possible to restrict protein intake less in this population of patients.

CONSUMPTION OF PLANT PROTEINS FOR BETTER STRENGTH

Sarcopenia occurs when a person falls below specific threshold of low muscle mass, strength, and physical performance. In geriatric research, sarcopenia is seen as a public health issue, as it may predict adverse effects such as frailty [35], falls/fractures [36,37^{*}], postoperative complications [38] and/or mortality [39^{**},40]. Healthy aging thus hinges on maintaining muscle mass and physical performance. However, older individuals often exhibit anabolic resistance in response to hyperaminoacidemia, that is, their muscles show sub-maximal muscle protein synthesis (MPS) [41^{**}]. Nutritional interventions [42], including a higher protein intake [27^{*},43], can modulate muscle health in older people and help protect against sarcopenia.

Animal proteins are known for their high nutritional quality because of their high levels of branched-chain amino acids (BCAA), particularly leucine which is considered a major stimulator of MPS, and also for their good digestibility compared with plant proteins. A recent study showed that in older men and women, ingestion of an omnivorous meal containing beef results in better postprandial circulating EAA availability and a 47% higher rate of MPS compared with ingestion of an isonitrogenous and isocaloric vegan meal [44]. However, although there is a general consensus that animal proteins are a potent stimulator of acute postprandial MPS, it is important to note that the conclusions of these studies are primarily based on the use of high-quality proteins (beef, whey, or casein) and may not

Hot topic

necessarily extrapolate to clinically observed effects such as skeletal muscle mass and function [45]. That explains why recent studies have shown that a largely plant-based diet is associated with better muscle synthesis [46], improved physical performance [47], and lower risk of frailty [5,6^{***},7,8^{***}] in older individuals compared with a largely animal protein-based diet.

A prospective study conducted on individuals over 65 years in Hong Kong revealed that a 4-year increase in plant protein consumption (mainly rice and soy) to reach an average of 31 ± 14 g/day (i.e. representing 48.7% of total protein intake) improved walking performance [47]. Moreover, according to two studies conducted by Struijk *et al.* [6^{***},8^{***}] on a large cohort of women aged over 60 years from the Nurses' Health Study, a diet based on protein-rich plant foods (mainly bread, cereals, pasta, nuts, beans, and legumes) decreased the risk for frailty whereas a diet based on a higher amount of animal proteins led to a higher risk of frailty, especially with regular consumption of red meat. Replacing one portion/day of red meat or substituting 5% of the animal-protein energy with plant-protein energy resulted in a significantly lower risk of frailty [6^{***},8^{***}]. These results were confirmed in a longitudinal study including both men and women [5]. The benefits that these studies found for physical performance and frailty in the elderly could be attributed, on the one hand, to the phytonutrients [48] and fiber [49^{*}] associated with consumption of protein-rich plant food, and on the other hand, to the maintenance of muscle mass following a high consumption of diverse plant proteins. Phytonutrients have been found to help maintain muscle mass by acting on autophagy [48], whereas dietary fiber decreases inflammation and promotes the synthesis of short-chain fatty acids (SCFA), thus helping to preserve muscle quality by activating AMPK, PPAR- δ , and PGC1 α enzymes [49^{*}]. Moreover, according to Ouyang *et al.* [46], adequate intake of plant proteins could stimulate muscle anabolism and support the maintenance of muscle mass during aging.

Although animal proteins are generally considered stronger stimulants of MPS than plant proteins, recent studies suggest that a significant consumption of plant proteins (beyond 31 g/day) might be a superior strategy to enhance muscle mass, decrease risk of frailty, and improve physical performance in older individuals. However, as consumption of protein-rich plant products also means ingesting a high fiber content, it could lead to complications such as intestinal intolerance, digestive discomfort, dehydration and malabsorption of essential minerals [50].

CONTRADICTORY RESULTS ON MORTALITY OUTCOMES

Based on the aforementioned results of the benefits of consuming plant proteins compared with animal proteins for the health of older people, we could reasonably assume that such an approach could also help reduce mortality risks. However, recent studies on the relationship between protein intake and mortality based on source of dietary proteins in older people have not produced a consistent set of conclusions. The study conducted by Das *et al.* [51] involving 794 men aged 70 years and older in Australia showed an inverse association between increased intake of plant proteins, especially from nuts and seeds, and an elevated risk of all-cause and cancer-specific mortality. In contrast, intake of animal protein, particularly from sources like red meat and dairy, was positively associated with all-cause and cancer-specific mortality. However, Meroño *et al.* [52], who focused on a restricted cohort of 1139 women and men aged 65 years and above, found the opposite pattern of results, where higher intake of animal protein but not plant protein was associated with a lower risk of all-cause and cardiovascular mortality. It is hard to compare these studies because of the differences in methodology, especially in the measurement of protein consumption (total number of servings per day vs. percentage of total daily energy), participants (age, sex, ethnicity), and duration of follow-up. Moreover, although both studies show a predominance of animal-source protein intake (approximately 65% animal-source vs. 35% plant-source), the total amounts of dietary protein differed (100 vs. 74 g/day). Furthermore, the inverse correlation between nuts and seeds and mortality risk in Das *et al.* [51] was probably not replicated in Meroño *et al.* [52] because the participants primarily consumed cereals with a small quantity of nuts and no seeds. Thus, according to these results, high consumption of nuts and seeds would be beneficial in reducing the risks of mortality in older people.

To better understand how animal and plant protein intake affects mortality, it is crucial to conduct studies with iso-caloric adjustments for both protein sources. A systematic review found evidence supporting a significant reduction in overall mortality and specific CVD when replacing 3–5% of animal proteins with plant proteins. The greatest risk reduction was observed by replacing 3% of energy from processed meat proteins with plant-based protein [23]. Note that this review did not specifically target the elderly, as it included publications involving adults over 18 years old, but we can reasonably posit that the findings would also apply to older people. The mechanisms involved when substituting animal protein with plant protein, which could explain the

reduction in risk of mortality, are the same as those contributing to reducing the risk of developing CVD, T2D, and CKD in older individuals, and are attributed to differences in bioactive compound contents and amino acid and fatty acid profiles. Furthermore, certain meat compounds act as pro-oxidants that may promote oxidative damage in various organs, contribute to the aging process, and pose a cancer risk [20,23,53]. However, further studies focusing specifically on animal and plant protein intake in older people are now needed to help to develop more accurate dietary recommendations for this specific population.

CONCLUSION

Plant-based protein foods appear to have a potential role in preventing or mitigating age-related diseases and could help to decrease in mortality risks compared with animal proteins. However, for plant proteins to be effective in certain pathological conditions such as sarcopenia and osteoporosis requires a substantial intake, which may not be suitable for many older people. While increasing plant protein intake is essential for bone and muscle health, it also carries concerns in terms of kidney health and inflammation. Therefore, additional studies are needed to assess the risk–benefit ratio of a high intake of plant proteins in older people before we can make robust recommendations on how far animal proteins can be healthfully replaced with plant proteins. It is highly probable that plant proteins cannot replace 100% of animal proteins, but increasing their proportion in the diet of the elderly could be a good strategy to help define a healthy elderly diet that is also environmentally friendly.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

This review did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We thank the ANRT or funding L.T.'s PhD grant.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Ageing and health. [cited 15 November 2023]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>.
2. Volkert D, Beck AM, Cederholm T, *et al.* ESPEN practical guideline: clinical nutrition and hydration in geriatrics. *Clin Nutr* 2022; 41:958–989.
3. Connolly G, Hudson JL, Bergia RE, *et al.* Effects of consuming ounce-equivalent portions of animal- vs. plant-based protein foods, as defined by the dietary guidelines for Americans on Essential Amino Acids Bioavailability in Young and Older Adults: two cross-over randomized controlled trials. *Nutrients* 2023; 15:2870.
4. Animal and plant protein sources and cardiometabolic health. *Adv Nutr* 2019; 10:S351–S366.
5. Tanaka T, Das JK, Jin Y, *et al.* Plant protein but not animal protein consumption is associated with frailty through plasma metabolites. *Nutrients* 2023; 15:4193.
6. Struijk EA, Fung TT, Rodriguez-Artalejo F, *et al.* Protein intake and risk of frailty among older women in the Nurses' Health Study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2022; 13:1752–1761.
7. According to data from a large cohort of women aged over 60 years from the Nurses' Health Study, the substitution of plant protein for animal protein was associated with lower risk of frailty in older women.
8. Yildirim Borazan F, Citar Daziroglu ME, Erdogan Govez N, *et al.* The relationship between the quantity and type of macronutrients in diet and frailty in older outpatients. *Aging Clin Exp Res* 2023; 35:3033–3040.
9. Struijk EA, Fung TT, Sotos-Prieto M, *et al.* Red meat consumption and risk of frailty in older women. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2022; 13:210–219.
10. According to data from a large cohort of women aged over 60 years from the Nurses' Health Study, a regular consumption of red meat had a higher risk of frailty and replacement of one portion/day of red meat with plant proteins resulted in a lower risk of frailty in older women.
11. Li J, Glenn AJ, Yang Q, *et al.* Dietary protein sources, mediating biomarkers, and incidence of type 2 diabetes: findings from the Women's Health Initiative and the UK Biobank. *Diabetes Care* 2022; 45:1742–1753.
12. Budhathoki S, Sawada N, Iwasaki M, *et al.* Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality in a Japanese Cohort. *JAMA Intern Med* 2019; 179:1509–1518.
13. Di Giosia P, Stamerra CA, Giorgini P, *et al.* The role of nutrition in inflammation. *Ageing Res Rev* 2022; 77:101596.
14. Huo Y, Cao S, Liu J, *et al.* The association between plant-based diet indices and metabolic syndrome in Chinese adults: longitudinal analyses from the China Health and Nutrition Survey. *Nutrients* 2023; 15:1341.
15. Thomas MS, Calle M, Fernandez ML. Healthy plant-based diets improve dyslipidemias, insulin resistance, and inflammation in metabolic syndrome. A narrative review. *Adv Nutr* 2023; 14:44–54.
16. Niero M, Bartoli G, De Colle P, *et al.* Impact of dietary fiber on inflammation and insulin resistance in older patients: a narrative review. *Nutrients* 2023; 15:2365.
17. Shivakoti R, Biggs ML, Djoussé L, *et al.* Intake and sources of dietary fiber, inflammation, and cardiovascular disease in older US adults. *JAMA Network Open* 2022; 5:e225012.
18. Ambroselli D, Masciulli F, Romano E, *et al.* New advances in metabolic syndrome, from prevention to treatment: the role of diet and food. *Nutrients* 2023; 15:640.
19. Peña-Jorquera H, Cid-Jofré V, Landaeta-Díaz L, *et al.* Plant-based nutrition: exploring health benefits for atherosclerosis, chronic diseases, and metabolic syndrome—a comprehensive review. *Nutrients* 2023; 15:3244.
20. This comprehensive review underscores the potential of a plant-based diet to improve the health of the population by targeting the underlying causes of chronic diseases.
21. Singh B, Khan AA, Anamika FNU, *et al.* Red meat consumption and its relationship with cardiovascular health: a review of pathophysiology and literature. *Cardiol Rev*. 2023. 10.1097/CRD.0000000000000575.
22. Di Y, Ding L, Gao L, Huang H. Association of meat consumption with the risk of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2023; 23:782.
23. This systematic review and meta-analysis reveal that the consumption of red and processed meat increases the risk of developing colorectal cancer, both colon and rectal.
24. Said Abasse K, Essien EE, Abbas M, *et al.* Association between dietary nitrate, nitrite intake, and site-specific cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients* 2022; 14:666.
25. Xiao F, Guo F. Impacts of essential amino acids on energy balance. *Mol Metab* 2022; 57:101393.
26. Chalvon-Demersay T, Azzout-Marniche D, Arfsten J, *et al.* A systematic review of the effects of plant compared with animal protein sources on features of metabolic syndrome. *J Nutr* 2017; 147:281–292.
27. Zheng J, Zhu T, Yang G, *et al.* The isocaloric substitution of plant-based and animal-based protein in relation to aging-related health outcomes: a systematic review. *Nutrients* 2022; 14:272.

Hot topic

24. Lee YQ, Chia A, Whittom C, *et al.* Isocaloric substitution of plant-based protein for animal-based protein and cardiometabolic risk factors in a multiethnic Asian population. *J Nutr* 2023; 153:1555–1566.

Based on the Singapore Multi-Ethnic Cohort, a cross-sectional analysis concluded that the substitution of plant-based proteins for animal-based proteins was inversely associated with established CVD risk factors.

25. Yoshioka M, Kosaki K, Matsui M, *et al.* Association between the intake of plant and animal proteins and the serum fibroblast growth factor-23 level in patients with chronic kidney disease analyzed by the isocaloric substitution model. *Endocr J* 2023; 70:31–42.

In this study, isocaloric substitution modeling showed that replacing animal proteins with plant proteins was associated with a low-serum FGF23 level. These findings encourage patients with CKD to consume diets high in plant proteins to reduce the risks of renal lesions and deterioration due to hypertrophy.

26. Zhong WW, Allen NB, Greenland P, *et al.* Protein foods from animal sources, incident cardiovascular disease and all-cause mortality: a substitution analysis. *Int J Epidemiol* 2021; 50:223–233.

27. Fekete M, Szarvas Z, Fazekas-Pongor V, *et al.* Nutrition strategies promoting healthy aging: from improvement of cardiovascular and brain health to prevention of age-associated diseases. *Nutrients* 2023; 15:47.

According to literature data, certain diets, such as the Mediterranean diet, may play a role in healthy aging because of their beneficial composition of macronutrients and micronutrients.

28. Lonnie M, Hooker E, Brunstrom JM, *et al.* Protein for life: review of optimal protein intake, sustainable dietary sources and the effect on appetite in ageing adults. *Nutrients* 2018; 10:E360.

29. Wang Q, Schmidt AF, Lennon LT, *et al.* Prospective associations between diet quality, dietary components, and risk of cardiometabolic multimorbidity in older British men. *Eur J Nutr* 2023; 62:2793–2804.

According to the data from the British Regional Heart Study, this study examined the relationships between diet quality and the risk of cardiometabolic multimorbidity. According to this study, higher consumption of fish/seafood reduces the risk of transitioning from the first cardiometabolic disease to cardiometabolic multimorbidity in older men.

30. Sarkhel S, Roy A. Phytic acid and its reduction in pulse matrix: structure-function relationship owing to bioavailability enhancement of micronutrients. *J Food Process Eng* 2022; 45:e14030.

31. Dawson J, McLean C. Nutrition in conservative kidney management: from evidence to practice. *Semin Nephrol* 2023; 43:151399.

32. Molina RE, Bohrer BM, Mejia SMV. Phosphate alternatives for meat processing and challenges for the industry: a critical review. *Food Res Int* 2023; 166:112624.

33. Kubo S, Imano H, Muraki I, *et al.* Total protein intake and subsequent risk of chronic kidney disease: the Circulatory Risk in Communities Study. *Environ Health Prev Med* 2023; 28:32.

34. Piccoli GB, Cederholm T, Avesani CM, *et al.* Nutritional status and the risk of malnutrition in older adults with chronic kidney disease - implications for low protein intake and nutritional care: A critical review endorsed by ERN-ERA and ESPEN. *Clin Nutr* 2023; 42:443–457.

This critical review prepared by ERN-ERA and ESPEN summarizes key concepts related to the prevention and treatment of CKD using dietary approaches, considering the patient's quality of life and the stage of CKD.

35. Wang C, Guo X, Xu X, *et al.* Association between sarcopenia and frailty in elderly patients with chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2023; 14:1855–1864.

36. Luo C, Liu R, Shen X, *et al.* Possible sarcopenia and risk of hip fracture in older adults in China. *Arch Gerontol Geriatr* 2024; 117:105248.

37. Jauffret C, Périchon R, Lamer A, *et al.* Association between sarcopenia and fracture risk in a population from the UK Biobank Database. *J Bone Miner Res* 2023; 38:1422–1434.

This retrospective study, utilizing the UK Biobank cohort and the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2, associated a higher risk of

fracture and major osteoporotic fracture in presarcopenic and sarcopenic individuals compared with nonsarcopenic participants.

38. Chang K, Albright JA, Testa EJ, *et al.* Sarcopenia is associated with an increased risk of postoperative complications following total hip arthroplasty for osteoarthritis. *Biology* 2023; 12:295.

39. Liang CK, Peng LN, Lin MH, *et al.* Long-term mortality risk in older adults with sarcopenia: an 11-year prospective cohort study comparing AWGS 2014 and AWGS 2019 guidelines for enhanced clinical utility and accurate risk prediction. *J Nutr Health Aging* 2023; 27:507–513.

This 11-year prospective cohort study demonstrated that the criteria of the Asian Working Group for Sarcopenia 2019 (AWGS 2019) allowed for a better diagnostic identification of the risk of sarcopenia and prediction of mortality.

40. Yuan S, Larsson SC. Epidemiology of sarcopenia: prevalence, risk factors, and consequences. *Metabolism* 2023; 144:155533.

41. Coelho-Junior HJ, Cahvani R, Azzolino D, *et al.* Protein intake and sarcopenia in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health* 2022; 19:8718.

This systematic review and meta-analysis investigated the cross-sectional and longitudinal associations between protein intake and sarcopenia in older adults. The results suggest that insufficient protein intake may be associated with sarcopenia in older individuals.

42. Shen Y, Shi Q, Nong K, *et al.* Exercise for sarcopenia in older people: a systematic review and network meta-analysis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2023; 14:1199–1211.

43. Nasimi N, Sohrabi Z, Nunes EA, *et al.* Whey protein supplementation with or without vitamin D on sarcopenia-related measures: a systematic review and meta-analysis. *Adv Nutr* 2023; 14:762–773.

44. Pinckaers PJ, Domic J, Petrick HL, *et al.* Higher muscle protein synthesis rates following ingestion of an omnivorous meal compared with an isocaloric and isonitrogenous vegan meal in healthy, older adults. *J Nutr* 2023; 10.1016/j.tjnut.2023.11.004.

45. Nishimura Y, Hejfeldt G, Breen L, *et al.* Dietary protein requirements and recommendations for healthy older adults: a critical narrative review of the scientific evidence. *Nutr Res Rev* 2023; 36:69–85.

46. Ouyang Y, Huang F, Zhang X, *et al.* Association of dietary protein intake with muscle mass in elderly Chinese: a cross-sectional study. *Nutrients* 2022; 14:5130.

47. Yeung SSY, Woo J. Association of plant protein intake with change in physical performance in Chinese community-dwelling older adults. *Nutrients* 2022; 14:4534.

48. Sun Y, Zheng Q, Sun J, *et al.* Phytonutrients as potential dietary supplements to ameliorate sarcopenia via the involvement of autophagic pathway. *Food Rev Int* 2023; 1–41; 10.1080/87559129.2023.2274487.

49. Kao CC, Yang ZY, Chen WL. The association between dietary fiber intake and sarcopenia. *J Funct Foods* 2023; 102:105437.

According to data from the National Health and Nutrition Examination Survey, this study demonstrated that increased dietary fiber intake had significant positive correlations with muscle strength, skeletal muscle index, and gait speed. The findings suggest that adequate intake of dietary fiber is advised for the sarcopenia prevalent geriatric population.

50. Ioniã-Mindrican CB, Ziani K, Mititelu M, *et al.* Therapeutic benefits and dietary restrictions of fiber intake: a state of the art review. *Nutrients* 2022; 14:2641.

51. Das A, Cumming R, Naganathan V, *et al.* Associations between dietary intake of total protein and sources of protein (plant vs. animal) and risk of all-cause and cause-specific mortality in older Australian men: the Concord Health and Ageing in Men Project. *J Hum Nutr Dietet* 2022; 35:845–860.

52. Meroño T, Zamora-Ros R, Hidalgo-Liberona N, *et al.* Animal protein intake is inversely associated with mortality in older adults: the InCHIANTI Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2022; 77:1866–1872.

53. Li D, Ju F, Wang H, *et al.* Combination of the biomarkers for aging and cancer? - challenges and current status. *Transl Oncol* 2023; 38:101783.