INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Présentée et soutenue publiquement

par

Clémence BLOUET

Ingénieur de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier

Le décembre 2006

PROTEINES ALIMENTAIRES ET PREVENTION DES DYSREGULATIONS GLYCEMIQUES : EFFETS DU GLUTATHION ET DE L'APPORT EN CYSTEINE

Directeur de thèse : Jean-François Huneau

Jury

Pr. Daniel Tomé	Président
Pr. Dominique Bonnefont-Rousselot	Rapporteur
Pr. Dominique Darmaun	Rapporteur
Pr. Paul Valensi	Examinateur
M. Bernard Poullain	Examinateur
M. Jean-François Huneau	Examinateur

COLLABORATIONS ET REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRA / INA P-G de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, à Paris, sous la direction de Jean-François Huneau, dans le cadre d'une allocation de recherche du Rectorat de Paris.

Je remercie sincèrement le Professeur Daniel Tomé de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir soutenue et aidée pour la réalisation de mes projets. Je le prie de trouver ici l'assurance de ma profonde et respectueuse considération.

J'exprime toute ma gratitude à Jean-François Huneau, qui m'a confié ce projet de thèse passionnant, m'a supervisée et largement aidée tout au long de mon travail, tout en préservant mon autonomie. Je le remercie de m'avoir transmis sa curiosité et son enthousiasme pour la science. Je remercie également chaleureusement François Mariotti pour sa grande disponibilité, sa participation active à mon travail, pour m'avoir pleinement fait profiter de ses connaissances, et pour toutes ces discussions improvisées et si enrichissantes.

Je remercie le Professeur Dominique Bonnefont-Rousselot et le Professeur Dominique Darmaun de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Professeur Paul Valensi et Bernard Poullain d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je suis très reconnaissante au groupe Bongrain, qui a assuré le financement d'une partie importante de ce travail, et je remercie particulièrement son chef de Projet Nutrition, Takashi Mikogami et son Directeur Marketing, Benoît Laplaize. Merci également aux personnes extérieures de l'Unité avec qui j'ai travaillé et qui m'ont apporté leur savoir-faire : Thierry Gremeaux et Jean-François Tanti (INSERM U568, Faculté de Médecine de Nice) ; Delphine Rousseau (UMR 1154 INRA-Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud XI).

Je tiens également à remercier Véronique, pour son aide technique tout au long de ma thèse et sa participation si enthousiaste à mon travail, Dalila, pour son précieux soutien technique et scientifique et sa perception critique de mon travail, Angélique, pour son aide lors des

expérimentations chez le rat, ainsi que toutes les personnes qui ont participé à mes expériences : Sophie, Cécile, Julie, Maguy, Florine et Salima.

Je remercie chaleureusement Barbara et Amélie, pour leur amitié et leur soutien, ainsi que toutes les personnes de l'Unité qui m'ont apporté leur aide ou leur sympathie et dont il serait difficile de faire une liste exhaustive : Sophie, Cécile, Catherine, Hélène, Claire, Laure, Joëlle, Dominique, Fabienne, Marie-Dominique, Gilles, Sylvette, Rodolphe, Nicolas, Christiane, Abdou, Montserrat, Benjamin, Patrick, Géraldine, Anne, Michel...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES 7
LISTE DES TABLEAUX 10
LISTE DES ABREVIATIONS 11
LISTE DES PUBLICATIONS 13

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 14
INTRODUCTION GENERALE 15

A. APPORT EN ACIDES AMINES SOUFRES ET MODULATION DU STATUT EN GLUTATHION 18

1. LE GLUTATHION ET LE STATUT REDOX 18
1.1. Le glutathion dans l'organisme 18
1.1.1. La synthèse de glutathion 18
1.1.2. La régulation de la synthèse de glutathion 19
1.1.3. Les pools de glutathion et son turnover 21
1.2. Les rôles du glutathion dans la cellule 23
1.2.1. Le glutathion et le statut redox intracellulaire 24
1.2.2. Participation aux défenses antioxydantes et à la détoxification 26
1.2.3. La glutathionylation et l'équilibre thiol/disulfure 26

2. APPORT EN ACIDES AMINES SOUFRES ET STATUT EN GLUTATHION 29
2.1. Rappels sur le métabolisme des acides aminés soufrés 29
2.1.1. Les voies de transméthylation et transsulfuration 29
2.1.2. Les voies d'utilisation de la cystéine 30
2.2. Apport protéique et modulation de la synthèse et du turnover du glutathion : conséquences sur le statut en glutathion 32
2.2.1. Apport protéique et modulation de la synthèse de glutathion 32
2.2.2. Les mécanismes de l'effet des acides aminés sur la synthèse de glutathion 35

B. INFLUENCE DU STATUT EN GLUTATHION SUR LA REGULATION GLYCEMIQUE 36

1. RAPPELS SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE ET LES MECANISMES DE LA CAPTATION PERIPHERIQUE DE GLUCOSE 36

2. STATUT REDOX, REGULATION GLYCEMIQUE ET INSULINO-RESISTANCE 38
2.1. La voie de signalisation de l'insuline et le statut redox intracellulaire 38
2.2. Rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de l'insulino-résistance 40
2.3. Le stress oxydant au cours de la période postprandiale 41
2.4. Stress oxydant, hyperglycémie et altération de la fonction sécrétoire des cellules β pancréatiques et de la fonction endothéliale 43

3. LE STATUT EN GLUTATHION ET LA REGULATION GLYCEMIQUE 44

4. APPORT EN ACIDES AMINES SOUFRES ET REGULATION GLYCEMIQUE 46

C. AUTRES MECANISMES D'ACTION DES ACIDES AMINES ET DES PROTEINES ALIMENTAIRES SUR LA REGULATION GLYCEMIQUE. 50

1. ACIDES AMINES, PROTEINES ALIMENTAIRES ET PRODUCTION ENDOGENE DE GLUCOSE 50
1.1. Rappels sur la production endogène de glucose et sa régulation 50
1.2. Rôle des acides aminés comme précurseur dans la néoglucogenèse 51
1.3. Effet aigu de l'ingestion d'un repas protéique sur la production endogène de glucose 52
1.4. Effet de l'adaptation à une alimentation hyperprotéique sur la production endogène de glucose 53

2. ACIDES AMINES, PROTEINES ALIMENTAIRES ET FONCTION ENDOCRINE PANCREATIQUE. .. 55
2.1. Mise en évidence d'un effet insulino-sécréteur des acides aminés 55
2.2. Rappels sur les mécanismes de sécrétion d'insuline 56
2.3. Modes d'actions des acides aminés sur la sécrétion d'insuline. 56
2.3.1. Le transport électrogénique des acides aminés 57
2.3.2. Le métabolisme intracellulaire des acides aminés 58
2.3.3. Effets indirects des protéines alimentaires sur la sécrétion d'insuline et de glucagon par l'intermédiaire des hormones incrétines 59
2.4. Effet des protéines alimentaires sur la sécrétion d'insuline 60
2.4.1. Effets aigus de l'ingestion d'un repas protéique sur la sécrétion d'insuline 60
2.4.2. Effets d'une alimentation hyperprotéique sur la sécrétion d'insuline 60

3. ACIDES AMINES, PROTEINES ALIMENTAIRES, CAPTATION PERIPHERIQUE DE GLUCOSE ET SENSIBILITE A L'INSULINE. 62

3.1. Mise en évidence d'un effet des acides aminés sur la sensibilité à l'insuline *in vivo* 62
3.2. Mécanismes de la modulation du transport de glucose par les acides aminés 63
3.2.1. Acides aminés et voie de signalisation de l'insuline 63
3.2.2. Acides aminés et utilisation métabolique du glucose 65
3.2.3. Acides aminés et microcirculation périphérique 67
3.3. Régimes hyperprotéiques et sensibilité à l'insuline 68
3.3.1. Effet d'une alimentation HP normo-énergétique sur la sensibilité à l'insuline 68
3.3.2. Effet d'une alimentation HP hypoénergétique sur la sensibilité à l'insuline 70
3.3.3. Effet de la qualité des protéines alimentaires sur l'insulino-sensibilité 71
CONCLUSIONS ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX 74

TRAVAUX PERSONNELS 78
ARTICLE 1 79
RESULTATS COMPLEMENTAIRES DES EXPERIENCES DE L'ARTICLE 1 83
ARTICLE 2 88
ARTICLE 3 91
RESULTATS COMPLEMENTAIRES DES EXPERIENCES DE L'ARTICLE 3 94
ARTICLE 4 98

DISCUSSION GENERALE 101

ANNEXES 123
ARTICLE 5 124
ARTICLE 6 127

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 130

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La structure chimique du glutathion.

Figure 2 : La biosynthèse du glutathion.

Figure 3 : Effet de l'insuline sur l'activité γ-glutamylcystéine synthase.

Figure 4 : Le cycle de la γ-glutamyle.

Figure 5: Participation du glutathion aux défenses antioxydantes.

Figure 6 : Détoxification de composés électrophiles par la glutathion S-tranférase et la voie de l'acide mercapturique.

Figure 7 : Participation du couple redox du glutathion à la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants.

Figure 8 : Métabolisme de la méthionine et de la cystéine.

Figure 9 : Les voies d'utilisation de la cystéine.

Figure 10 : Effet du passage d'un régime hyperprotéique à un régime hypoprotéique et vice versa sur l'expression et l'activité de la cystéine dioxygénase chez le rat.

Figure 11 : Effet de l'apport en acides aminés sur le potentiel de demi-cellule plasmatique du couple redox du glutathion chez le rat.

Figure 12 : Effet de la consommation d'un régime normoprotéique chez des sujets sains adaptés à la consommation d'un régime riche en protéines sur les concentrations et la synthèse du glutathion dans les globules rouges.

Figure 13 : Effet d'un apport supplémentaire en N-acétylcystéine sur les concentrations et la synthèse du glutathion dans les globules rouges.

Figure 14 : Effet du passage d'un régime hyperprotéique à un régime hypoprotéique et vice versa sur l'expression et l'activité de la γ-glutamylcystéine synthase chez le rat.

Figure 15 : Insuline et translocation des transporteurs de glucose GLUT4.

Figure 16 : Mécanismes du redox priming.

Figure 17 : Mécanismes associés au stress oxydant et contribuant à la désactivation de la voie de transduction de l'insuline.

Figure 18 : Chez des sujets insulino-résistants, l'altération du statut redox précède l'insulino-résistance.

Figure 19 : Mécanisme de production de peroxyde d'hydrogène par la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie.

Figure 20 : Mécanisme d'induction de stress oxydant par l'hyperglycémie.

Figure 21 : Aire sous la courbe de la phase précoce de la sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie à jeun lors d'un test intraveineux de tolérance au glucose.

Figure 22 : Tolérance au glucose et sensibilité à l'insuline de rats traités au D, L-buthionine sulfoximine pendant 16 jours.

Figure 23 : Corrélation entre l'utilisation du glucose et le ratio glutathion total/glutathion oxydé chez des sujets sains et hypertendus en réponse à une perfusion de glutathion.

Figure 24 : Activation par l'insuline de la synthèse de la substance hépatique sensibilisant à l'insuline au cours de la période postprandiale.

Figure 25 : Régulation hormonale et nutritionnelle de la production endogène de glucose.

Figure 26 : Catabolisme des acides aminés et néoglucogenèse.

Figure 27 : Représentation du cycle glucose-alanine.

Figure 28 : Concentrations plasmatiques de glucose et vitesse d'apparition du glucose, chez des sujets diabétiques de type 2 en réponse à l'ingestion de 50 g de protéines ou de 50 g d'eau.

Figure 29 : Effet de la source protéique sur l'insulino-sécrétion postprandiale.

Figure 30 : Corrélations entre la glucagonémie et les concentrations plasmatiques d'acides aminés après l'ingestion d'un repas contenant du glucose et diverses sources protéiques.

Figure 31 : Mécanismes de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas.

Figure 32 : Effet des acides aminés sur l'activité électrique de cellules β en présence de glucose.

Figure 33 : Schéma représentant les mécanismes de la stimulation de la sécrétion d'insuline de la cellule β par les acides aminés et le glucose.

Figure 34 : Influence du statut énergétique de la cellule sur l'activation de la sécrétion d'insuline par la leucine.

Figure 35 : Concentrations postprandiales de GIP, CCK et GLP-1 en réponse à l'ingestion d'un repas riche en glucides ou riche en protéines.

Figure 36 : Influence de la teneur en protéines de l'alimentation sur la sécrétion d'insuline en réponse à une charge de glucose chez le sujet sain.

Figure 37 : Activation de la voie de signalisation de mTOR par l'insuline et les acides aminés.

Figure 38 : Effet des acides aminés sur le transport de glucose stimulé par l'insuline.

Figure 39 : Effet de l'administration de leucine par voie orale sur l'activation de la voie de signalisation de l'insuline et le transport de glucose chez le rat.

Figure 40 : Effet de la leucine et de l'insuline sur la captation de glucose mesurée sur muscle isolé.

Figure 41 : Effet *in vitro* de la leucine sur l'oxydation du pyruvate sur diaphragme de rat isolé.

Figure 42 : Activation de la synthèse de glycogène musculaire par les acides aminés.

Figure 43 : Concentrations plasmatiques en glucose et en insuline lors d'un test de tolérance orale au glucose chez des sujets obèses insulino-résistants suite à 16 semaines de consommation d'un régime normoprotéique ou hyperprotéique.

Figure 44 : Effet de la source protéique sur la régulation de la glycémie chez des rats recevant un régime standard ou un régime hyperlipidique, où 22% de l'énergie était fournie sous forme de protéines de lait, de morue ou de soja pendant 4 semaines.

Figure 45 : Croissance pondérale de rats nourris ad libitum pendant 8 semaines avec les régimes NP, HP et HPL.

Figure 46 : Expression hépatique du stérol regulatory binding protein-1c (SREBP-1c) et de la fatty acid synthase (FAS) chez des rats nourris pendant 6 semaines avec les régimes NP (T), HS_0, HS_1 et HS_2.

Figure 47 : Croissance pondérale de rats nourris pendant 7 semaines avec les régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

Figure 48 : Glycémies lors du test oral de tolérance au glucose après 7 semaines de consommation des régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

Figure 49 : Insulinémies lors du test oral de tolérance au glucose après 7 semaines de consommation des régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentrations tissulaires en glutathion chez des souris après administration aiguë (expérience A) ou chronique (expérience B) d'un inhibiteur de la synthèse de glutathion.

Tableau 2 : Effet de la consommation d'un régime dépourvu d'acides aminés soufrés pendant 10 jours chez l'Homme sain sur la synthèse et les concentrations sanguines de glutathion.

Tableau 3 : Effet d'un apport supplémentaire en arginine pendant 1 mois chez des sujets diabétiques de type 2 sur la régulation de la glycémie et la fonction endothéliale.

Tableau 4 : Effet quantitatif et qualitatif de l'apport protéique sur l'insulino-sensibilité chez des rats rendus insulino-résistants par la consommation d'un régime hyperlipidique.

Tableau 5 : Concentrations hépatiques en glutathion, activité hépatique de la glutamylcystéine synthase, expression hépatique de la sous-unité catalytique et régulatrice de la glutamylcystéine synthase standardisée par rapport à l'expression de la 18S et concentrations plasmatiques et hépatiques des protéines carbonylées chez des rats nourris ad libitum avec les régimes NP ou HP ou recevant le régime NP mais restreints à l'apport énergétique spontané des rats HP.

Tableau 6 : Composition des régimes expérimentaux NP, HP et HPL.

Tableau 7 : Composition corporelle moyenne après 8 semaines de consommation ad libitum des régimes NP, HP et HPL.

Tableau 8 : Concentrations plasmatiques en acides aminés à jeun et à l'état nourri chez des rats ayant reçu pendant 8 semaines les régimes NP, HP et HPL ad libitum.

Tableau 9 : Concentrations plasmatiques en acides aminés au cours de la période postprandiale (t=0: début de l'ingestion d'un repas calibré) chez des rats ayant reçu pendant 4 semaines les régimes HS_0, HS_1, HS_2 et HSa.

Tableau 10 : Composition des régimes expérimentaux HS_0, P14-800 et P30-800.

Tableau 11 : Composition corporelle de rats nourris pendant 7 semaines avec les régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

Tableau 12 : Statut en glutathion de rats nourris pendant 7 semaines avec les régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAR : acides aminés à chaîne latérale ramifiée

AAS : acides aminés soufrés

ADMA : diméthylarginine asymétrique

AT% : atom %

AUC : aire sous la courbe

αLAC : protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine

BSO : D,L-buthionine sulfoximine

BW : poids corporel

$[Ca^{2+}]_i$: concentration de calcium intracellulaire

CCK : cholécystokinine

CDO : cystéine dioxygénase

cGMP : Cyclic guanosine monophosphate

ChREBP : carbohydrate responsive element binding protein

CVD : maladies cardio-vasculaires

Cys : cystéine

DBP : pression artérielle diastolique

eNOS : synthase endothéliale de monoxyde d'azote

Exp : expérience

FAS : fatty acid synthase

FFM : masse maigre

FM : masse grasse

γ-GCS : γ-glutamylcystéine synthase

G6P : glucose-6-phosphate

G6Pase : glucose-6-phosphatase

G6PC1 : isoforme néoglucogénique de la sous-unité catalytique de la G6Pase

G6PC3 : isoforme ubiquitaire de la sous-unité catalytique de la G6Pase

GAPDH : glycéraldéhydephosphate déshydrogénase

GCL : γ-glutamylcystéine synthase

GDH : glutamate déshydrogénase

GIP : gastric inhibitory peptide

GLP-1 : glucagon like peptide-1

GSH : glutathione

GSH Ehc : potentiel de reduction de demi-cellule du couple GSSG/2GSH

GSSG : glutathione oxydé

GSHr : tatio glutathione oxydé sur glutathione réduit

Hhcy : hyperhomocystéinémie

HOMA : homeostatic model assessment

HKII : hexokinase II

HP : hyperprotéique

HS : hypersaccharosé

iNOS : synthase inductible de monoxyde d'azote

IR : insulino-résistance

IS : sensibilité à l'insuline

ISI : index d'insulino-sensibilité de Belfiore

IST : test de sensibilité à l'insuline

K_{ATP} : canaux potassiques ATP-dépendants

NAC : N-acétylcystéine

NO : monoxyde d'azote

NP : normoprotéique

NPr : rats nourris avec un régime normoprotéique, apport énergétique restreint

OGTT : test oral de tolérance au glucose

ORAC : capacité d'absorption des radicaux libres de l'oxygène

P :C : ratio protéine/glucide

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

SAA : acides aminés soufrés

SHSI : substance hépatique sensibilisant à l'insuline

SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein-1c

TBW : eau corporelle totale

LISTE DES PUBLICATIONS

Blouet C., Mariotti F., Azzout-Marniche D., Bos C., Mathé V., Tomé D. and Huneau J.F. The reduced energy intake of rats fed a high protein low carbohydrate diet explains the lower fat deposition but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. The Journal of Nutrition, 2006 Jul;136(7):1849-54.

Blouet C., Mariotti F., Mikogami T, Tomé D. and Huneau J.F. Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. The Journal of Nutritional Biochemistry, in press.

Blouet C., Mariotti F., Azzout-Marniche D., Mathé V., Mikogami T., Tomé D. and Huneau J.F. Increasing the dietary cysteine intake alleviates the adverse effects of a high-sucrose diet on oxidative stress and glucose homeostasis in rats. Free Radical Biology and Medicine, in press.

Blouet C., Mariotti F., Mathé V., Tomé D. and Huneau J.F. NO production correlates with insulin sensitivity but NO bioavailability is first altered during early dietary modulations of insulin sensitivity in rats. The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, soumis.

Mariotti F., Hammiche A., **Blouet C**., Daré S, Tomé D. and Huneau J.F. Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline. The European Journal of Nutrition, 2006 Oct;45(7):383-90.

Azzout-Marniche D., Gaudichon C., **Blouet C**., Bos C., Mathé V., Huneau J.F. and Tomé D. Liver glyconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess? The American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology in press.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GENERALE

Le diabète mellitus représente un enjeu majeur de santé publique. Sa prévalence a augmenté de façon exponentielle au cours des 20 dernières années et selon les prévisions de l'Organisation Mondiale de la Santé, 350 millions de personnes dans le monde seront touchées par cette pathologie en 2020 (Wild *et al.*, 2004). Le diabète de type II est la forme de diabète la plus répandue, touchant près de 90% des diabétiques. Il est le résultat d'un processus physiopathologique dont l'une des premières étapes est l'insulino-résistance (IR). L'IR correspond à une baisse de sensibilité des cellules à l'action de l'insuline, hormone qui joue un rôle prédominant dans les mécanismes centraux et périphériques qui gouvernent le maintien de l'homéostasie du glucose.

L'apparition de l'IR est le résultat de processus complexes, faisant intervenir des facteurs endogènes de type génétique et des facteurs environnementaux. Les principaux facteurs de risque établis sont la sédentarité, le surpoids, avec un risque relatif de 1,8 chez les sujets ayant un indice de poids corporel supérieur à 30 (Shulman, 2000), et une répartition des graisses de type androïde (Goodpaster *et al.*, 1999). Les recommandations hygiéno-nutritionnelles tiennent donc une place importante dans la prévention de l'IR et de son évolution, et plusieurs études d'intervention ont mis en évidence que chez les sujets intolérants au glucose, présentant donc un risque important de développer un diabète de type II, une modification du mode de vie (alimentation et activité physique) pouvait réduire l'incidence du diabète de 40 à 60% en 3 ans (Williamson *et al.*, 2004; Kitabchi *et al.*, 2005).

En outre, des données récentes suggèrent que le stress oxydant, qui caractérise les situations où les défenses antioxydantes de l'organisme sont insuffisantes pour prévenir les effet délétères des espèces réactives de l'oxygène (Klatt *et al.*, 2000), intervient de façon précoce dans la physiopathologie de l'IR, notamment lors de la période postprandiale, pendant laquelle la vague postprandiale pourrait induire un déséquilibre du statut redox de l'organisme (Sies *et al.*, 2005; Monnier *et al.*, 2006). Des données épidémiologiques obtenues sur des cohortes de sujet sain indiquent que la sensibilité à l'insuline est corrélée au statut redox de l'organisme (Trevisan *et al.*, 2001; Menon *et al.*, 2004; Sugiura *et al.*, 2006) et suggèrent que le stress oxydant pourrait précéder l'apparition de l'IR (Gopaul *et al.*, 2001). Ainsi, les interventions nutritionnelles visant à maintenir ou améliorer le statut redox de l'organisme pourraient prévenir ou ralentir la progression de l'IR (Paolisso *et al.*, 1993; Manning *et al.*, 2004).

Dans l'ensemble des recommandations nutritionnelles faites aux sujets insulino-résistants, la restriction énergétique apparaît centrale. Elle porte essentiellement sur l'apport lipidique car le coût énergétique de la lipogenèse à partir des lipides alimentaires est très faible et son rendement avoisine les 95%. La qualité de l'apport énergétique joue par ailleurs un rôle certain dans cette pathologie, et on considère que les acides gras saturés favorisent l'IR, ainsi que les aliments à fort index glycémique et pauvres en fibres (Bessesen, 2001). Le rôle de l'apport glucidique, lipidique et des fibres alimentaires dans le développement de l'IR est aujourd'hui bien documenté. En revanche, malgré la mise en évidence d'interactions entre les acides aminés et les différentes composantes de la régulation glycémique – les acides aminés modulant la production endogène de glucose en tant que substrats néoglucogéniques, la sécrétion d'insuline et de glucagon par le pancréas et la captation du glucose par les tissus périphériques -, le rôle quantitatif et qualitatif de l'apport protéique dans le développement ou la prévention de l'IR reste controversé.

Plusieurs études suggèrent qu'une alimentation hyperprotéique favorise l'apparition de l'IR et du diabète de type 2 (Hoppe *et al.*, 2005; Papakonstantinou *et al.*, 2005). A l'inverse, d'autres travaux démontrent que l'ingestion d'un repas hyperprotéique est associée à une diminution de l'excursion glycémique postprandiale chez le sujet sain et diabétique (Linn *et al.*, 2000; Gannon *et al.*, 2004), suggérant un effet bénéfique des protéines alimentaires sur l'insulino-sensibilité. Par ailleurs, la plupart des travaux n'abordent que l'aspect quantitatif de l'apport protéique alors que plusieurs indices expérimentaux suggèrent que tous les acides aminés n'ont pas le même effet vis-à-vis de la sensibilité à l'insuline.

Parmi les acides aminés susceptibles d'intervenir de façon spécifique dans les mécanismes de l'homéostasie du glucose, la cystéine pourrait exercer une action favorable au contrôle glycémique en tant que précurseur du glutathion. Principal sulfhydryle de faible poids moléculaire de l'organisme, le glutathion joue un rôle particulièrement important dans les défenses antioxydantes, la détoxification de composés électrophiles et de peroxydes, l'équilibre thiol/disulfure et la régulation du statut redox intracellulaire. Il module ainsi de nombreuses fonctions de l'organisme sensibles au statut redox intracellulaire, dont l'homéostasie du glucose.

Plusieurs arguments indirects sont en faveur de l'hypothèse d'un effet bénéfique d'une augmentation de l'apport en cystéine sur la régulation glycémique. D'une part, l'apport alimentaire en cystéine module à court et moyen terme la synthèse et le turnover du glutathion (Morand *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 2000), et d'autre part, le statut en glutathion

influence l'homéostasie du glucose (Paolisso *et al.*, 1992a). Cependant, les données concernant l'effet direct d'une augmentation de l'apport en cystéine sur l'homéostasie du glucose et la progression de l'IR sont peu nombreuses.

Notre introduction bibliographique porte sur l'étude des travaux ayant exploré les relations entre l'apport protéique, les acides aminés, avec une attention particulière portée aux acides aminés soufrés, et la régulation de la glycémie.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux données concernant l'apport en acides aminés soufrés et la régulation glycémique. Après une présentation des rôles du glutathion dans le maintien du statut redox de l'organisme et des voies du métabolisme des acides aminés soufrés, nous avons examiné les données portant sur les relations entre l'apport en acides aminés soufrés, le statut en glutathion et la régulation de la glycémie.

Dans un second temps, nous avons étudié les données portant sur les interactions entre les acides aminés, les protéines alimentaires et les différentes composantes de la régulation glycémique – production hépatique de glucose, fonction endocrine pancréatique et captation périphérique de glucose.

A. APPORT EN ACIDES AMINES SOUFRES ET MODULATION DU STATUT EN GLUTATHION

1. LE GLUTATHION ET LE STATUT REDOX

Le glutathion (γ-glutamylcystéinylglycine) est le tripeptide composé de cystéine, glutamate et glycine (Fig. 1). Principal sulfhydryle de faible poids moléculaire de l'organisme, il présente deux caractéristiques structurales qui permettent sa participation à de nombreuses fonctions cellulaires : sa liaison γ-carboxyle entre les résidus glutamate et cystéine, qui le protège de l'hydrolyse, et son groupement sulfhydryle (ou thiol), porté par son résidu cystéine (Pastore *et al.*, 2003). Il joue un rôle particulièrement important dans les défenses antioxydantes et le maintien du statut redox de l'organisme.

1.1. Le glutathion dans l'organisme

1.1.1. La synthèse de glutathion

La synthèse de glutathion, consommatrice d'ATP, est assurée par l'action séquentielle de deux enzymes cytosoliques ubiquitaires, la γ-glutamylcystéine synthase (γ-GCS) et la glutathion synthase (Fig. 2). Lors de la réaction catalysée par la γ-GCS, le groupement γ-carboxyle du glutamate réagit avec le groupement aminé de la cystéine. Cette première réaction, qui constitue l'étape limitante de la synthèse de glutathion, permet la formation d'une liaison peptidique résistante aux peptidases. Bien qu'elle puisse être convertie en 5-oxoproline et cystéine par la γ-glutamyl cyclotransférase, 95 % de la γ-glutamylcystéine formée lors de cette première réaction est orientée vers la synthèse de glutathion par la glutathion synthase, une enzyme présentant une forte affinité pour ses deux substrats, la glycine et la γ-glutamylcystéine. Cette seconde étape de la synthèse de glutathion est rarement limitante (Griffith, 1999). La synthèse de glutathion peut avoir lieu dans toutes les cellules de l'organisme, mais le foie en est le principal site de production et la plus grande partie du glutathion hépatique est exportée vers les autres tissus.

1.1.2. La régulation de la synthèse de glutathion

La formation de γ-glutamylcystéine étant l'étape limitante de la synthèse de glutathion, la synthèse de novo de glutathion est principalement influencée par l'activité γ-GCS, les concentrations de ses substrats et celle du glutathion, qui exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité γ-GCS.

La γ-GCS est une enzyme constituée de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice et une sous-unité catalytique (Huang *et al.*, 1993). Les quantités relatives et absolues de ces deux sous-unités varient d'un tissu à un autre et, pour un même tissu, d'une espèce à une l'autre (Griffith, 1999). En l'absence de sous-unité régulatrice, la sous-unité catalytique, qui présente tous les sites de fixation pour les substrats de l'enzyme et l'ATP, est fonctionnelle, mais son activité est 3 à 15 fois plus faible que celle de l'holoenzyme, selon les espèces (Huang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2006). La sous-unité régulatrice module l'affinité de la sous-unité catalytique pour ses substrats et ses inhibiteurs (Seelig *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1993).

La régulation de l'activité γ-GCS est complexe et modulée par de nombreux facteurs susceptibles d'agir simultanément à différents niveaux : transcription, stabilité des ARN messagers, traduction, modulations post-traductionnelles par phosphorylation et formation de l'holoenzyme (Griffith, 1999).

La transcription des gènes codant pour la γ-GCS est principalement influencée par des facteurs associés au stress et à l'inflammation. Dans des conditions de stress oxydant et/ou de stress nitrosant, la transcription des gènes codant pour les deux sous-unités de l'enzyme est accrue (Shi *et al.*, 1994; Moellering *et al.*, 1998), ainsi que la formation de l'holoenzyme (Pastore *et al.*, 2003). L'effet du stress oxydant sur la transcription des gènes codant pour la γ-GCS implique un site de type ARE/EpRE (antioxydant et electrophile response element) présent sur les promoteurs des gènes de chacune des sous-unités de la γ-GCS (Dickinson *et al.*, 2004) De même, les cytokines proinflammatoires, telles que le TNF-α et l'IL-1β, activent la transcription des gènes codant pour la γ-GCS, par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription NF κB, qui possède un site de liaison sur le promoteur de la GCLc (Dickinson *et al.*, 2004).

L'activité de la γ-GCS est également régulée par l'insuline et le glucagon. *In vitro*, l'ajout d'insuline à une culture primaire d'hépatocytes induit une augmentation de l'activité de la γ-GCS (Fig. 3), et chez des rats rendus insulino-déficients par une injection de streptozotocine, l'administration d'insuline rétablit l'activité γ-GCS au niveau de la valeur mesurée chez des rats sains (Lu *et al.*, 1992). La modulation de l'activité γ-GCS par l'insuline a lieu principalement au niveau de la transcription du gène de la sous-unité catalytique de l'enzyme (Cai *et al.*, 1995), activée par des mécanismes faisant intervenir la PI 3-kinase, la PKB, mTOR et la p70 S6 kinase (Kim *et al.*, 2004b). A l'inverse, le glucagon inhibe la synthèse de glutathion (Lu *et al.*, 1991) par des mécanismes qui feraient intervenir des phosphorylations post-traductionnelles de la sous-unité catalytique de l'enzyme (Sun *et al.*, 1996). Cette régulation hormonale favorise la synthèse de glutathion lors de la phase postprandiale, où la disponibilité des substrats nécessaires à cette synthèse est maximale.

La synthèse de glutathion est également fortement influencée par la disponibilité de ses substrats et en particulier par celle de la cystéine, dont la concentration intracellulaire hépatique est environ dix fois moins importante que celles de la glycine et du glutamate (Tateishi *et al.*, 1974). L'aspect limitant ne vient pas du Km de la γ-GCS pour la cystéine, qui est très proche des concentrations intracellulaires physiologiques en cystéine, mais serait plutôt la conséquence de l'écart entre les tailles respectives des pools de cystéine et de glutathion - le-dernier étant environ 30 fois plus important que le premier - et du renouvellement fréquent du pool de glutathion. A titre d'exemple, le foie exporte près de 20 à 50% de son pool de glutathion toutes les heures chez le rat (Griffith *et al.*, 1979b). Ainsi, une augmentation de la disponibilité en cystéine est associée à une augmentation de la synthèse de glutathion. Cet aspect est détaillé dans la partie A. 2.

Dans une moindre mesure, la synthèse de glutathion est également affectée par la disponibilité en glycine. Lorsque la glycine devient limitante pour la synthèse de glutathion, la γ-glutamylcystéine en excès est orientée vers la synthèse de 5-oxoproline, qui est ensuite excrétée au niveau urinaire. Chez des sujets recevant un alimentation pauvre en protéines (0,4 $g.kg^{-1}.j^{-1}$ de protéines) ou dépourvue de glycine, l'excrétion urinaire de 5-oxoproline augmente (Meakins *et al.*, 1998; Metges *et al.*, 2000). Cette augmentation de l'excrétion urinaire de 5-oxoproline est associée à une diminution du taux de synthèse du glutathion (Yu *et al.*, 2002).

In vitro, la disponibilité en glutamate est également susceptible d'affecter la synthèse de glutathion (Griffith, 1999). Un premier mécanisme implique la modulation de la captation de cystine par l'intermédiaire d'un échangeur cystine/glutamate. Cet échangeur fonctionne principalement dans le sens d'un efflux de glutamate dans le sens d'un gradient sortant de concentrations, qui s'accompagne d'une entrée de cystine dans la cellule. En présence d'un excès de glutamate extracellulaire, l'activité du transporteur est réduite, limitant ainsi l'entrée de cystine dans la cellule. Un second mécanisme a été proposé sur des modèles de cellules qui captent directement la cystéine et non sa forme oxydée, la cystine. Dans ces cellules, de fortes concentrations en glutamate favoriseraient la synthèse de glutathion en levant le rétrocontrôle négatif exercé par le glutathion sur l'activité γ-GCS. Cependant, la signification physiologique de cette modulation par le glutamate observée *in vitro* est très incertaine, au vu de la stabilité des concentrations intra et extracellulaires de cet acide aminé.

Enfin, l'activité γ-GCS est sensible à une inhibition compétitive exercée par le glutathion et la γ-glutamylcystéine (Richman *et al.*, 1975). Les résidus glutamyl et cysteinyl de ces peptides viennent occuper respectivement les sites de fixation du glutamate et de la cystéine, réduisant ainsi l'activité enzymatique. La formation de l'holoenzyme est associée à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le glutathion et la γ-glutamylcystéine (Huang *et al.*, 1993).

1.1.3. Les pools de glutathion et son turnover

Le glutathion existe sous forme réduite et sous forme de disulfure lorsqu'il est oxydé. Le plus souvent, les quantités totales de glutathion sont estimées avec la formule suivante : glutathion réduit + 2 × glutathion oxydé. Cette formule ne prend pas en compte le glutathion complexé aux protéines, qui représente environ 15% du pool total de glutathion.

Le glutathion est très abondant dans le milieu intracellulaire où il est réparti en trois compartiments : le cytosol et le noyau, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. Les concentrations intracellulaires les plus élevées sont retrouvées dans la mitochondrie (entre 5 et 11 $mmol.L^{-1}$), qui contient environ 15% du glutathion intracellulaire total, et le cytosol/noyau (entre 0,5 et 10 $mmol.L^{-1}$). Le glutathion y est présent principalement sous forme réduite, et le ratio glutathion oxydé/glutathion réduit est compris entre 1/30 et 1/100. Le réticulum endoplasmique ne contient qu'une faible proportion du pool de glutathion intracellulaire et dans ce compartiment, le ratio glutathion oxydé/glutathion réduit avoisine

1/3 (Pastore *et al.*, 2003). Les concentrations intracellulaires de glutathion varient d'un organe à l'autre. Le foie, qui en est le premier producteur, présente des concentrations en glutathion total environ 3 fois plus importantes que celles de rein, du poumon et du cerveau, autres organes fortement impliqués dans le métabolisme du glutathion (Stipanuk *et al.*, 2002). A l'exception des sécrétions biliaires qui contiennent environ 10 $mmol.L^{-1}$ de glutathion, les concentrations de glutathion dans les fluides extracellulaires sont faibles, de l'ordre du micromolaire dans le plasma (Griffith, 1999). Le glutathion y est présent sous forme plus oxydée que dans le cytosol (le ratio glutathion oxydé/glutathion réduit de 1/7 environ) (Samiec *et al.*, 1998).

Les niveaux intracellulaires de glutathion reflètent l'état d'équilibre entre les entrées (captation et synthèse) et les pertes de glutathion (efflux et dégradation). Ils sont très stables dans tous les organes extra-hépatiques mais peuvent varier de façon importante dans le foie en réponse à des modulations de l'apport en acides aminés soufrés (AAS), de l'état nutritionnel, du statut anti-oxydant de l'organisme ou dans des conditions de stress (Malmezat *et al.*, 2000; Stipanuk *et al.*, 2002). Ces variations hépatiques sont principalement la conséquence de variations de la synthèse et de l'export du glutathion, qui assurent respectivement le stockage et l'approvisionnement en glutathion des autres organes. Ainsi, les concentrations hépatiques de glutathion indiquent l'état des réserves en glutathion de l'organisme, tandis que les concentrations sanguines reflètent le niveau d'export hépatique de glutathion, dont le rôle est de maintenir les concentrations extra-hépatiques en glutathion (Stipanuk, 2004a). Les pertes nettes de glutathion sont limitées et sont principalement la conséquence des réactions de conjugaison qui aboutissent à la formation d'acide mercapturique, excrétés via l'urine, (Griffith, 1999). Dans la plupart des autres cas, le glutathion peut être régénéré, soit par l'intermédiaire du cycle glutathion oxydé/glutathion réduit gouverné par la glutathion réductase, soit par l'intermédiaire d'un cycle hydrolyse/resynthèse impliquant la γ-glutamyl transpeptidase et détaillé ci-après.

Le transport transmembranaire de glutathion est assuré par deux types de transporteurs, les transporteurs sinusoïdaux exprimés uniquement par les hépatocytes, et les transporteurs canaliculaires ubiquitaires. Ces transporteurs permettent un flux bidirectionnel mais fonctionnent principalement dans le sens d'une diffusion passive du glutathion du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, du fait de l'important gradient de concentrations existant entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Griffith *et al.*, 1979a; Lu *et al.*, 1996). En conséquence, ces transporteurs sont très impliqués dans l'export de glutathion mais n'ont

qu'un rôle limité dans sa captation. En revanche, l'action de la γ-glutamyl transpeptidase au sein du cycle du γ-glutamyl permet la translocation du glutathion à l'intérieur de la cellule (Fig. 4) (Griffith *et al.*, 1979a; Pastore *et al.*, 2003). Cette enzyme transfère le groupement γ-glutamyl du glutathion vers un acide aminé libre (le meilleur accepteur de ce groupement étant la cystine), une réaction qui conduit à la formation d'un γ-glutamyl-acide aminé et de cystéinyl-glycine. Cette synthèse est couplée au transport du γ-glutamyl-acide aminé dans la cellule. Ce dipeptide est ensuite hydrolysé sous l'action de la γ-glutamyl cyclotransférase qui libère l'acide aminé correspondant et de la 5-oxoproline. Cette dernière peut être décyclisée par l'oxoprolinase pour former du glutamate. La cystéinyl-glycine est hydrolysée par des dipeptidases qui permettent la libération de cystéine et de glycine, rapidement captées par la cellule et disponibles pour la synthèse protéique ou la resynthèse de glutathion.

Bien que dans des conditions physiologiques normales, les concentrations intracellulaires en glutathion varient peu, elles sont la résultante d'un système dynamique où le turnover est important. Au niveau hépatique, rénal et pancréatique, la demi-vie du glutathion est de l'ordre de 2 à 3 heures. Ainsi chez l'animal, l'administration d'un inhibiteur de la synthèse de glutathion comme le D,L-Buthionine sulfoximine induit une diminution très rapide des concentrations hépatiques en glutathion, rénales et pancréatiques, tandis-qu'elles sont peu modifiées dans les autres organes (Tab. 1)(Griffith *et al.*, 1979b). Au niveau hépatique, le turnover du glutathion est principalement la conséquence d'un export important vers la circulation, compensé par une synthèse de glutathion suffisante pour maintenir les niveaux hépatiques intracellulaires de glutathion. Dans les autres organes, le turnover du glutathion est la conséquence des flux importants d'entrée/sortie de la cellule par l'intermédiaire du cycle du γ-glutamyl. Ce cycle permet une utilisation efficace du glutathion en tant que source de cystéine, contrôle les concentrations extracellulaires en glutathion et la disponibilité extra-hépatique en cystéine (Pastore *et al.*, 2003).

1.2. Les rôles du glutathion dans la cellule

Le glutathion est impliqué dans de nombreuses fonctions vitales ((Wu *et al.*, 2004) pour revue) et joue en particulier un rôle central dans les défenses antioxydantes de l'organisme et la détoxification. Il exerce un effet protecteur vis-à-vis des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène, grâce à son pouvoir réducteur important ou par l'intermédiaire

d'enzymes antioxydantes dont il sert de cofacteur. Il tamponne l'environnement redox intracellulaire, ce qui permet entre autres de maintenir les groupements sulfhydryles des protéines sous forme réduite. Dans des conditions de stress oxydant, il contribue à la réponse adaptative au stress notamment en se liant aux groupements sulfhydryles des protéines (il modifie ainsi leurs fonctions) et en régulant l'activation de facteurs de transcriptions impliqués dans la réponse antioxydante. De cette manière, le glutathion module les fonctions immunitaires et la progression de nombreuses pathologies impliquant stress oxydant, inflammation ou réponse immune (Townsend *et al.*, 2003). Un statut en glutathion altéré est observé dans plusieurs pathologies, comme le diabète, qui est associé à la présence d'un stress oxydant important (Samiec *et al.*, 1998). Enfin, le glutathion sert de forme de stockage et de transport de la cystéine qui est très instable dans le milieu extracellulaire et s'oxyde spontanément et rapidement en cystine, un processus pouvant conduire à la production de radicaux libres. Ainsi, le glutathion permet l'approvisionnement en cystéine des tissus qui ne peuvent pas la synthétiser et il peut être mobilisé pour faire face aux besoins en cystéine pour la synthèse protéique ou la synthèse de taurine.

1.2.1. Le glutathion et le statut redox intracellulaire

Le potentiel redox intracellulaire, reflet du statut redox intracellulaire, peut se définir comme étant la somme des produits des potentiels de réduction des différents couples redox intracellulaires et des équivalents réducteurs correspondants (Schafer *et al.*, 2001).

Statut redox intracellulaire = $\Sigma_{i\ \text{couples redox}} E_i \times [\text{espèce réduite}]_i$

où E_i est le potentiel de demi-cellule du couple redox i et $[\text{espèce réduite}]_i$ la concentration intracellulaire de l'espèce réduite du couple i. Ce potentiel de demi-cellule peut être calculé par la formule de Nernst :

$$E_i = E_i^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[i_{ox}]}{[i_{red}]}$$

où E_i° est le potentiel de réduction standard du couple i, n le nombre d'électrons échangés, R la constante des gaz parfaits, T la température, F la constante de Faraday, pH 7.

Les couples redox intracellulaires les plus réducteurs sont la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ($NADPH/NADP^+$), la thioredoxine (TRXred/TRXox) et le glutathion

(GSSG/GSH), mais il en existe de nombreux autres, parmi lesquels toutes les protéines portant un groupement sulfhydryle. Par conséquent la mesure absolue du potentiel redox intracellulaire n'est pas réalisable. En revanche, il peut être estimé à l'aide du potentiel de réduction d'un couple choisi. On considère que le potentiel redox du couple redox du glutathion en est le plus représentatif. En effet, bien que le E° du couple redox du glutathion soit moins négatif que celui du couple redox du NADPH (-240 mV et -316 mV, respectivement), les concentrations intracellulaires de glutathion sont très supérieures à celles du NADPH. Ainsi, le potentiel redox intracellulaire est mieux apprécié par le potentiel de demi-cellule du glutathion que par celui de tout autre couple redox (Schafer *et al.*, 2001).

Le calcul du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit [GSSG/GSH] est une manière simple d'apprécier le niveau d'oxydation du couple GSSG/GSH. Cette approche ne donne cependant pas une image fidèle du potentiel d'oxydo-réduction du glutathion. Dans le cas du glutathion, et contrairement à d'autres couples comme celui du NADPH par exemple, le potentiel de demi-cellule dépend en effet non seulement du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit, mais aussi de la concentration en glutathion réduit. Cette particularité s'explique par le fait que l'espèce oxydée est le résultat d'une condensation de deux molécules de glutathion réduit.

$GSSG + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2GSH$

Par conséquent, pour estimer le potentiel du glutathion (ou statut en glutathion), il est plus juste d'utiliser le potentiel de demi-cellule du glutathion en appliquant la formule de Nernst :

E_{hc}= -240 -(59,1/2) log ([GSH]²/[GSSG]) à 25°C et pH 7.

Le couple redox du glutathion est considéré comme le tampon redox de la cellule, non seulement parce qu'il fournit le pool le plus important d'espèces sous forme réduite, mais aussi parce que dans des conditions de stress oxydant, plusieurs mécanismes permettent le maintien du potentiel de demi-cellule du glutathion, et par conséquent celui du statut redox intracellulaire (Schafer *et al.*, 2001). D'une part, la forme réduite du glutathion peut être facilement régénérée à partir de la forme oxydée, sous l'action de la glutathion réductase (Fig. 5). Lors de cette réaction, l'oxydation du NADPH en $NADP^+$ fournit les unités réductrices nécessaires au recyclage du glutathion. Le statut redox du glutathion est donc affecté par celui d'autres couples redox, comme le couple NADPH/$NADP^+$ (Wu *et al.*, 2004). D'autre part, le glutathion oxydé peut se lier aux groupements sulfhydryles des protéines : PSH + GSSG → PS-SG + GSH.

Cette réaction, qui consomme du glutathion oxydé et produit du glutathion réduit, limite l'accumulation du glutathion oxydé dans des conditions pro-oxydantes. Elle contribue

notablement au maintien du potentiel de demi-cellule du glutathion car les groupements sulfhydryles des protéines constituent un pool intracellulaire quantitativement très important. Cet aspect est détaillé dans la partie A 1.2.3. Enfin, dans des conditions de stress oxydant sévères qui dépassent la capacité de recyclage enzymatique du glutathion, ou si les cofacteurs de la glutathion réductase sont en défaut, le glutathion oxydé peut être exporté sous forme libre ou conjuguée puis éliminé au niveau rénal, ce qui limite la dégradation du statut redox intracellulaire.

1.2.2. Participation aux défenses antioxydantes et à la détoxification

Le glutathion joue un rôle majeur dans les défenses antioxydantes de l'organisme et la détoxification. Il réagit spontanément avec les radicaux hydroxyles produits par la réaction de Fenton, ainsi qu'avec le peroxynitrite produit lors de la réaction entre le monoxyde d'azote (NO) et l'oxygène ou l'anion superoxyde (Griffith, 1999).

Il contribue également aux réactions enzymatiques antioxydantes, catalysées par les différentes isoformes de la glutathion peroxydase (Fig. 5). La glutathion peroxydase agit de concert avec la catalase et la superoxyde dismutase pour protéger l'organisme des effets délétères des espèces réactives de l'oxygène qu'elle neutralise, et éliminer les peroxydes. L'élimination des peroxydes par la glutathion peroxydase produit du glutathion oxydé, qui peut être recyclé sous l'action de la glutathion réductase ou exporté et éliminé par le rein.

Lors des réactions catalysées par la glutathion-S-tranférase, le glutathion réagit avec divers composés électrophiles et xénobiotiques pour produire des sulfures de glutathion chimiquement stables qui sont ensuite catabolisés, ce qui permet la récupération des résidus glycine et glutamate. Le produit final, appelé acide mercapturique, est éliminé dans l'urine, entraînant une perte nette de cystéine (Griffith, 1999; Pastore *et al.*, 2003) (Fig. 6).

Enfin, le recyclage du glutathion est impliqué dans la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants impliqués dans la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène, tels que les tocophérols ou l'acide ascorbique (Sen *et al.*, 2000) (Fig. 7).

1.2.3. La glutathionylation et l'équilibre thiol/disulfure

Le glutathion joue un rôle important dans la régulation du statut thiol/disulfure des groupements sulfhydryles des protéines, qui peut conditionner la fonction des protéines. Dans des conditions physiologiques normales, il les maintient sous forme réduite ; dans des conditions de stress oxydant, il forme avec les groupements sulfhydryles des protéines des disulfures mixtes de manière réversible, par une réaction de glutathionylation (Cotgreave *et al.*, 1998). D'après certains auteurs, la glutathionylation jouerait un rôle central dans l'initiation de la réponse au stress et la régulation des cycles cellulaires. (Moriarty-Craige *et al.*, 2004).

La glutathionylation, spontanée ou catalysée par des enzymes telles que la glutaredoxine, modifie la stabilité des protéines et les protège de certaines réactions irréversibles pouvant avoir lieu dans des conditions de stress oxydant, comme la carbonylation, la glycation ou la nitration, ces réactions étant souvent associées à la perte de la fonction des protéines (Cotgreave *et al.*, 1998).

Cependant, si le résidu cystéine de la protéine est critique pour sa fonction, la glutathionylation peut induire la perte de la fonction de la protéine et peut compromettre certaines fonctions cellulaires de façon réversible (Barrett *et al.*, 1999). Elle peut à l'inverse faire émerger une nouvelle fonction ou modifier l'activité d'enzymes ou de facteurs de transcription.

De nombreuses enzymes sont sensibles aux échanges thiol/disulfure, notamment les enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes, comme la superoxyde dismutase, ou les enzymes du métabolisme énergétique, comme la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Cotgreave *et al.*, 1998). L'inhibition de cette-dernière par les espèces réactives de l'oxygène déclenche plusieurs mécanismes délétères associés au stress oxydant (Brownlee, 2001) ; sa glutathionylation la protègerait de l'inactivation par les espèces réactives de l'oxygène, ce qui correspondrait à une réponse cellulaire à l'excès de radicaux libres, dont les mécanismes et les conséquences sont encore mal connus (Lind *et al.*, 1998). La glutathionylation modulerait également l'expression de certains gènes, notamment des gènes impliqués dans l'inflammation, les mécanismes de l'apoptose et de la prolifération cellulaire (Cotgreave *et al.*, 1998; Arrigo, 1999). Ainsi, la glutathionylation du site de reconnaissance de la c-jun kinase - une protéine impliquée dans les voies de signalisation de réponse au stress - sur l'ADN permet un control direct et réversible de l'activation de ces voies de signalisation (Klatt *et al.*, 1999). La glutathionylation pourrait contribuer à une modification réversible du phénotype de la cellule en réponse à des modifications du statut redox intracellulaire et

constituerait une réponse cellulaire adaptative qui serait impliquée dans la protection contre le stress oxydant (Cotgreave *et al.*, 1998).

2. APPORT EN ACIDES AMINES SOUFRES ET STATUT EN GLUTATHION

La cystéine constitue avec la méthionine, l'homocystéine et la taurine l'un des quatre AAS présents dans l'organisme. Parmi eux, seule la méthionine est indispensable chez l'Homme. Un ensemble de voies métaboliques complexes permet la synthèse de cystéine à partir de méthionine, puis celle de taurine à partir de cystéine, l'homocystéine constituant un intermédiaire métabolique entre les deux premiers acides aminés. De fait, il existe potentiellement des relations entre apport en méthionine et cystéine, synthèse de glutathion, et statut redox.

2.1. Rappels sur le métabolisme des acides aminés soufrés

2.1.1. Les voies de transméthylation et transsulfuration

Deux voies métaboliques principales régulent le métabolisme de la méthionine : la transméthylation et la transsulfuration (Fig. 8). La transméthylation est une voie ubiquitaire. Sa première étape est la condensation de la méthionine avec des molécules d'ATP, catalysée par la méthionine adénosyltransférase, qui donne lieu à la formation de S-adénosylméthionine. La S-adénosylméthionine est un donneur de groupement méthyle dans de très nombreuses réactions catalysées par des enzymes de la famille des méthyltransférases et qui affectent les protéines, les acides nucléiques ou diverses molécules organiques. La perte du groupement méthyle produit de la S-adénosylhomocystéine, hydrolysée en homocystéine. L'homocystéine peut ensuite être reméthylée en méthionine sous l'action de méthyltransférases en présence de 5-méthyl-tétrahydrofolates ou de bétaïne (c'est le cycle de la méthionine) (Stipanuk, 2004b) ou bien être orientée vers une voie irréversible, la synthèse de cystéine par transsulfuration. L'homocystéine est alors condensée avec la sérine par la cystathionine β-synthase pour produire la cystathionine, qui est ensuite clivée par la cysthathionine γ-lyase pour produire la cystéine. La transsulfuration n'est présente de façon significative que dans le foie et le pancréas, et de façon plus marginale dans l'intestin, le rein, le tissu adipeux et le cerveau (Mudd *et al.*, 1965).

La synthèse de cystéine à partir de méthionine constitue l'une des voies principales d'utilisation de la méthionine et est indispensable à l'approvisionnement des différents pools de cystéine présents dans l'organisme – cystéine libre, cystine, protéines ou glutathion. L'apport alimentaire journalier en cystéine est en effet de l'ordre de 1,3 $g.kg^{-1}$ de poids corporel chez l'Homme (Stipanuk, 2004b), soit environ 9 $\mu moles.kg^{-1}.h^{-1}$, alors que le taux de disparition du glutathion, qui ne représente qu'environ 65 % de l'utilisation de cystéine chez l'Homme sain, est de 25 $\mu moles.kg^{-1}.h^{-1}$ (Lyons *et al.*, 2000). Une part importante de la cystéine nécessaire à la synthèse de glutathion et à celle des protéines provient donc de la synthèse endogène de cystéine par la transsulfuration ou du catabolisme protéique. De fait, une partie du besoin alimentaire en méthionine est liée aux flux de synthèse de cystéine. Chez l'Homme, une réduction de plus de 60 % de la synthèse de cystéine par transsulfuration est observée lorsque l'apport en AAS se fait sous la forme d'un mélange méthionine/cystéine (13 mg/11 mg) – valeurs proches de l'équilibre constaté dans les principales sources protéiques alimentaires – comparé à un apport exclusivement constitué de méthionine (24 mg) (Di Buono *et al.*, 2003). Ces données, ainsi que des observations similaires réalisées chez l'animal (Finkelstein *et al.*, 1988), suggèrent que l'apport en cystéine exerce un effet d'épargne sur les besoins en méthionine, en réduisant la transsulfuration et augmentant le pourcentage d'homocystéine utilisé pour la synthèse de méthionine (Kurpad *et al.*, 2004). Pour cette raison, le besoin en méthionine est désormais exprimé sous la forme d'un besoin combiné en méthionine + cystéine. Celui-ci a été dernièrement évalué par la FAO à 13 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ (Raguso *et al.*, 2000).

2.1.2. Les voies d'utilisation de la cystéine

La cystéine est utilisée pour la synthèse des protéines ainsi qu'en tant que précurseur de composés non protéiques essentiels à l'organisme par l'intermédiaire de trois voies métaboliques (Fig. 9). La première est son oxydation en cystéinesulfinate, catalysée par la cystéine dioxygénase (CDO), une enzyme exprimée presque exclusivement dans le foie (Haesler *et al.*, 1994). La cystéinesulfinate peut ensuite être convertie en taurine par décarboxylation et oxydation, ou bien en β-sulfinylpyruvate par l'aspartate aminotranférase, voie qui aboutit à la formation de sulfate (Stipanuk, 2004b). La cystéine peut également être condensée avec du glutamate par la γ-GCS, pour former la γ-glutamylcystéine, puis en glutathion sous l'action de la glutathion synthase. La synthèse de glutathion est virtuellement

possible dans toutes les cellules de l'organisme mais elle a lieu majoritairement dans le foie, qui convertit la cystéine alimentaire en glutathion, forme de stockage privilégiée de cet acide aminé.

La régulation du métabolisme de la cystéine a lieu principalement dans le foie, qui la stocke et la fournit aux autres organes sous forme de glutathion ou l'oxyde en cas d'apport excessif (Fukagawa *et al.*, 1996). Le rein participe également à la régulation des concentrations circulantes en cystéine et ses métabolites. Il capte les métabolites de la cystéine en excès (taurine, sulfate et glutathion), qu'il excrète dans l'urine, et peut libérer de la cystéine formée à partir de l'hydrolyse du glutathion. Le rein peut également synthétiser de la taurine, dont il adapte la synthèse ou l'excrétion en fonction des besoins. (Stipanuk, 2004a).

Deux enzymes jouent un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme de la cystéine : la CDO et la γ-GCS. En réponse à des variations de l'apport alimentaire en protéines ou en AAS, ce sont principalement les modulations de l'activité CDO qui assurent le maintien des concentrations en cystéine libre circulante, tandis que l'activité GCS varie de façon beaucoup moins importante. Cette dernière assure toutefois la régulation des pools de glutathion, source extra-hépatique majeure de cystéine (cf. paragraphe B. 2.2.2).

La faible affinité de la CDO pour la cystéine lui confère la capacité de répondre rapidement à une augmentation des concentrations en cystéine, tandis que son activité est quasiment nulle lorsque la disponibilité en cystéine est faible (Bagley *et al.*, 1995). Par ailleurs, les données obtenues chez le rat indiquent que l'activité CDO hépatique augmente d'un facteur de 35 au cours des 24h suivant le passage d'une alimentation hypoprotéique à une alimentation hyperprotéique (HP, plus de 20% de l'énergie ingérée sous forme de protéines), et suggèrent une régulation traductionnelle ou post-traductionnelle de l'activité CDO par le niveau d'apport protéique, sans effet transcriptionnel (Fig. 10) (Bella *et al.*, 1999b; Lee *et al.*, 2004). Cette adaptation est principalement une réponse aux variations du niveau d'apport en AAS (Bella *et al.*, 1999a), qui inhiberaient l'ubiquination de la CDO et par là-même sa dégradation par le protéasome (Stipanuk *et al.*, 2004; Dominy *et al.*, 2006).

Bien qu'une augmentation de l'apport en acides aminés non-soufrés n'induise pas de modification de l'activité CDO (Bella *et al.*, 1999a), les acides aminés non-soufrés semblent influencer l'effet post-traductionnel de la cystéine sur l'activité CDO, puisque l'activité et la quantité de CDO est plus importante chez des rats adaptés à un régime HP que chez des rats adaptés à un régime normoprotéique (NP) enrichi en méthionine (Bella *et al.*, 1999a).

Dans les autres tissus, les modifications de la teneur en protéines de l'alimentation induisent peu de modifications de l'activité CDO, ce qui pourrait être la conséquence de l'absence d'augmentation des concentrations extra-hépatiques en cystéine, le foie assurant la régulation des excès d'AAS (Stipanuk *et al.*, 2002). Toutefois, la synthèse rénale de taurine varie en fonction de la teneur en protéines du régime : elle augmente dans des conditions hypoprotéiques et assure ainsi l'approvisionnement en taurine de l'organisme dans des conditions où la synthèse hépatique de taurine est très faible ; dans des conditions hyperprotéiques, la synthèse rénale de taurine est inhibée et le rein excrète la taurine libérée en excès par le foie (Stipanuk *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004).

2.2. Apport protéique et modulation de la synthèse et du turnover du glutathion : conséquences sur le statut en glutathion

La synthèse de glutathion varie de façon moins importante que celle de taurine et de sulfate en réponse à des variations de l'apport protéique et fait l'objet de mécanismes de régulation complexes. Cependant, plusieurs études suggèrent que ces mécanismes autorisent dans une certaine mesure des variations de la synthèse de glutathion en réponse à des modulations de l'apport protéique à court et à long terme.

2.2.1. Apport protéique et modulation de la synthèse de glutathion

Plusieurs études ont mis en évidence que la consommation d'un régime hypoprotéique ou déficient en AAS induit une diminution du taux et de la vitesse de synthèse du glutathion, la synthèse de glutathion n'étant pas prioritaire par rapport à la synthèse protéique sur l'utilisation du pool d'AAS libres. Chez le rat, un niveau d'apport protéique inférieur à 15 % (150 g de protéines par kg d'aliment) induit une diminution des concentrations hépatiques en cystéine lors de la période postprandiale, associée à une baisse de la synthèse de glutathion qui se répercute sur le statut en glutathion extra-hépatique, notamment au niveau du plasma et du tissu musculaire, et est associée à une diminution du taux de renouvellement plasmatique du glutathion (Hum *et al.*, 1992; Morand *et al.*, 1997; Bella *et al.*, 1999b). Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats consommant un régime NP mais pauvre en méthionine (Richie *et al.*, 2004). Les organes les plus affectés par la restriction en méthionine

sont ceux les plus impliqués dans le métabolisme du glutathion (foie, érythrocytes, rein et pancréas).

Au cours de la période post-absorptive, caractérisée par une faible synthèse hépatique de glutathion, une restriction de l'apport protéique se traduit par une forte réduction de la concentration hépatique en glutathion, qui tombe à des valeurs comprises entre 15 et 50 % de celle observée chez des rats adaptés à un régime NP (Bauman *et al.*, 1988; Bella *et al.*, 1999b). En revanche, les concentrations plasmatiques et extra-hépatiques en glutathion sont peu affectées à court et moyen terme (Morand *et al.*, 1997), ce qui suggère que l'export hépatique de glutathion est augmenté pour maintenir le statut en glutathion extra-hépatique. Cependant, une étude récente montre que chez des rats recevant un régime déficient en SAA, les concentrations plasmatiques en glutathion oxydé sont plus importantes que chez des rats recevant en régime standard, et bien que les concentrations en glutathion total ne soient pas affectées, le potentiel redox du glutathion est plus oxydé (Fig. 11) (Nkabyo *et al.*, 2006).

Bien que les données concernant l'effet de l'apport en AAS sur la synthèse de glutathion chez l'Homme sain soient peu nombreuses, une étude de traceurs a confirmé les résultats obtenus chez l'animal (Lyons *et al.*, 2000). La consommation d'un régime dépourvu en AAS pendant dix jours est associée à une diminution de l'oxydation de la cystéine, des flux de cystéine, du taux et de la vitesse de synthèse du glutathion, sans que les concentrations sanguines en glutathion total ne soient affectées (Tab. 2).

Les conséquences de l'augmentation de l'apport protéique au-delà des apports recommandés sur la synthèse et le statut en glutathion sont plus controversées.

Selon certains travaux réalisés chez l'animal, un apport protéique très supérieur aux besoins - 30 à 45% de protéines dans l'aliment - n'affecte pas les concentrations hépatiques en glutathion ni son taux de renouvellement plasmatique, comparés au valeurs obtenues chez des animaux consommant un régime NP (15 à 20 % de protéines) (Bauman *et al.*, 1988; Hum *et al.*, 1992; Bella *et al.*, 1999b).

A l'inverse, d'autres études également réalisées chez le rat suggèrent qu'une augmentation spécifique de l'apport en AAS favorise la synthèse du glutathion. Chez le rat, une apport supplémentaire aigu ou chronique en AAS accroît la disponibilité en cystéine lors de la phase postprandiale et augmente la synthèse et les concentrations hépatiques en glutathion, ces effets étant maintenus lors de la phase post-absorptive (Morand *et al.*, 1997; Bella *et al.*, 1999a). Bien que les concentrations plasmatiques en glutathion ne soient pas affectées par un apport supplémentaire en AAS, les concentrations en glutathion dans les autres

compartiments extra-hépatiques sont plus importantes. Ces études suggèrent également qu'un apport supplémentaire spécifique en AAS est plus efficace qu'un régime HP pour accroître la disponibilité hépatique en cystéine, paramètre qui semble affecter linéairement la synthèse de glutathion (Hum *et al.*, 1992; Morand *et al.*, 1997).

Récemment, une étude chez l'Homme a suggéré que la synthèse de glutathion est affectée par des variations modérées de l'apport protéique autour des valeurs correspondant aux besoins azotés (Jackson *et al.*, 2004). Ainsi, chez des sujets sains adaptés à un apport protéique de 1,13 $g.kg^{-1}.j^{-1}$, ce qui est proche du niveau de consommation observé dans les pays occidentaux, une réduction de l'apport à 0,75 $g.kg^{-1}.j^{-1}$, soit un niveau proche de l'apport de sécurité (0,8 $g.kg^{-1}.j^{-1}$) et suffisant pour permettre d'obtenir un bilan azoté équilibré, est associée à une diminution du taux de synthèse du glutathion et une augmentation de l'excrétion urinaire de 5-oxoproline. Chez ces sujets, la concentration érythrocytaire en glutathion est également réduite de façon transitoire, cette concentration retournant à sa valeur initiale après 10 jours, lorsque le bilan azoté des individus retrouve un nouvel équilibre après la baisse de l'apport protéique (Fig. 12). Selon les auteurs, la diminution du taux de synthèse du glutathion, même en absence d'une réduction de ses concentrations sanguines, aurait un coût pour l'organisme en limitant sa capacité d'adaptation à des situations de stress oxydant et/ou infectieux, caractérisées par une augmentation des pertes en glutathion.

De fait, plusieurs études indiquent que dans différentes conditions physiopathologiques associées à un stress oxydant - drépanocytose, diabète de type 1 mal contrôlé, sida, brûlures étendues - les stocks de glutathion sont réduits et le potentiel redox du couple GSH/GGSG altéré du fait d'une synthèse réduite (Jahoor *et al.*, 1999; Badaloo *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) et/ou d'une consommation accrue de glutathion (Darmaun *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2006) comparés à ceux mesurés chez des sujets sains. Dans ces conditions de stress oxydant chronique, une augmentation à court terme de l'apport en cystéine, par l'intermédiaire d'un donneur de cystéine (la N-acétylcystéine, NAC) ou de protéines naturellement riches en cystéine (les protéines de lactosérum), permet d'obtenir une augmentation significative de la synthèse et des concentrations en glutathion (Fig. 13) (Jahoor *et al.*, 1999; Badaloo *et al.*, 2002; Micke *et al.*, 2002). Ces données montrent l'intérêt d'une augmentation de l'apport en cystéine au-delà de l'apport habituel dans des situations de stress oxydant chronique, caractérisées par une demande plus importante en glutathion.

2.2.2. Les mécanismes de l'effet des acides aminés sur la synthèse de glutathion

Les données concernant l'effet de modulations de l'apport protéique sur la synthèse de glutathion suggèrent qu'elle est soumise à des mécanismes de régulation/contre-régulation complexes dont le rôle serait d'assurer le maintien des concentrations en glutathion malgré la variation des apports en AAS et des besoins de l'organisme.

La γ-GCS présente une forte affinité pour la cystéine et en aigu, son activité répond à de faibles variations de la disponibilité en cystéine (Griffith, 1999). Ainsi, les transitions d'état nutritionnel sont associées à des modifications significatives de la synthèse hépatique de glutathion. Au cours de la phase postprandiale, la synthèse hépatique de glutathion est significativement augmentée, du fait d'une élévation de la disponibilité hépatique en cystéine, et d'une augmentation de l'expression de la γ-GCS par rapport à la phase post-absorptive, qui permet d'accroître l'utilisation de la cystéine du repas pour la synthèse de glutathion (Morand *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004).

Paradoxalement, les études réalisées chez le rat indiquent que l'adaptation à un apport protéique élevé induit une diminution de l'activité γ-GCS, principalement au travers d'une modulation transcriptionnelle de l'expression de cette enzyme (Morand *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2004)(Fig. 14). Cette réponse est induite par l'augmentation de l'apport en AAS et plus particulièrement la cystéine, car les acides aminés non-soufrés seuls n'affectent pas la transcription des gènes codant pour la γ-GCS (Bella *et al.*, 1999a; Cresenzi *et al.*, 2003). Cependant, des données récentes ont mis en évidence que les acides aminés non-soufrés peuvent également moduler l'activité γ-GCS, au travers de modifications post-traductionnelles (Bella *et al.*, 1999b), dont le mécanisme pourrait être associé à une inhibition de la formation de l'holoenzyme (Lee *et al.*, 2006).

Ainsi, la réduction de l'expression/activité de la γ-GCS permettrait de limiter l'augmentation du flux de cystéine vers la synthèse de glutathion lorsque la disponibilité en SAA augmente de façon importante. L'excès de cystéine serait alors dirigé vers l'oxydation grâce à l'augmentation de l'activité CDO.

B. INFLUENCE DU STATUT EN GLUTATHION SUR LA REGULATION GLYCEMIQUE

Le stress oxydant joue un rôle important dans la physiopathologie de l'insulino-résistance (IR), notamment au cours de la période postprandiale où l'hyperglycémie induit une perturbation du statut redox. Dans ce contexte, une amélioration du statut en glutathion par l'intermédiaire d'une augmentation de l'apport en AAS pourrait limiter l'altération du statut redox lors des périodes d'hyperglycémie et prévenir l'IR, mais les données sont actuellement peu nombreuses et parcellaires.

1. RAPPELS SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE ET LES MECANISMES DE LA CAPTATION PERIPHERIQUE DE GLUCOSE

Au cours de la phase postprandiale, 80 % du glucose d'origine exogène est capté par le tissu musculaire et le tissu adipeux par l'intermédiaire de mécanismes activés par l'insuline.

Le premier mécanisme par lequel l'insuline active la captation de glucose par les tissus périphériques lors de la phase postprandiale est l'adressage vers la membrane plasmique de transporteurs de glucose GLUT4 stockés dans des vésicules intracellulaires (Shepherd *et al.*, 1999). Ce mécanisme est observé *in vitro* sur des cellules adipeuses ou musculaires après stimulation par de l'insuline (Cushman *et al.*, 1980; Suzuki *et al.*, 1980). L'insuline exerce son action par le biais d'un récepteur et déclenche une voie de signalisation récemment explorée et aujourd'hui bien documentée (Fig. 15).

Le récepteur de l'insuline est un complexe hétérotétramérique qui possède un domaine extracellulaire de liaison stéréospécifique à l'insuline, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique présentant plusieurs sites de phosphorylation. La fixation de l'insuline à son récepteur induit un changement conformationnel qui active l'activité tyrosine-kinase d'un de ces sites, qui active à son tour différents substrats intracellulaires. Parmi ces substrats, les protéines IRS (insulin receptor substrate) dont on connaît 4 isoformes, jouent un rôle central dans l'initiation des voies de transduction qui aboutissent aux réponses associées à la croissance et au métabolisme énergétique (White, 2002). Il existe des spécificités tissulaires d'activation des protéines IRS. Ainsi, dans le muscle et le tissu adipeux, c'est

l'isoforme IRS1 qui intervient de manière prépondérante tandis que dans le foie, et les cellules β du pancréas, c'est IRS2 qui est activée préférentiellement (White, 2002).
La phosphorylation des protéines IRS sur leurs résidus tyrosine a pour conséquence des modifications conformationnelles entraînant l'apparition de sites de liaison stéréospécifiques pour différentes protéines à domaine SH2, dont la p85, sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) (Saltiel *et al.*, 2002). La liaison d'IRS à la p85 déclenche une cascade complexe de phosphorylations qui aboutit à la mise en place des réponses cellulaires à l'insuline telles que l'activation du transport du glucose, la stimulation de la protéosynthèse ou l'inhibition de la lipolyse (Pessin *et al.*, 2000).
La séquence qui relie la PI 3-kinase à la translocation de GLUT4 reste controversée. Certains auteurs ont mis en évidence l'importance de l'isoforme β de la PKB (protein kinase B ou Akt) (Brozinick *et al.*, 2003), tandis que d'autres soutiennent que les PKCa (protein kinase C atypiques, isoformes λ et ξ) jouent un rôle majeur dans l'activation de la translocation de GLUT4 (Kim *et al.*, 2003). L'insuline active également la translocation de GLUT4 par des voies de signalisation indépendantes de la PI 3-kinase, notamment celle initiée par la phosphorylation des cavéolines (Lund *et al.*, 1995).

L'insuline favorise également la captation de glucose par les tissus périphériques de façon indirecte, en activant la production de NO par les cellules endothéliales. En effet, la NO synthase endothéliale (eNOS) est une protéine cible de la PKB (Zeng *et al.*, 2000) et son expression est activée par l'insuline (Kuboki *et al.*, 2000). Chez l'Homme, une hyperinsulinémie physiologique augmente le volume sanguin microvasculaire et le recrutement de microvaisseaux (Coggins *et al.*, 2001). Plusieurs études suggèrent que le niveau de microperfusion musculaire et la captation de glucose en période postprandiale sont étroitement liés (Bonadonna *et al.*, 1998) et des données *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence que l'inactivation de eNOS induisait une IR (Roy *et al.*, 1998; Schnyder *et al.*, 2002). Ainsi, la stimulation de la production de NO par l'insuline favorise le recrutement de capillaires, augmente le débit sanguin et la perfusion musculaire, et favorise l'arrivée du glucose à la périphérie. Ce mécanisme serait responsable pour 25 à 40 % de l'augmentation de la captation périphérique de glucose en période postprandiale (Baron *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2003).

2. STATUT REDOX, REGULATION GLYCEMIQUE ET INSULINO-RESISTANCE

2.1. La voie de signalisation de l'insuline et le statut redox intracellulaire

Présentes en faibles concentrations (de l'ordre du micromolaire), les espèces réactives de l'oxygène participent à l'activation de certaines voies de signalisation (Droge, 2005) et pourraient notamment intervenir dans la transduction du signal de l'insuline.

Plusieurs auteurs ont observé sur des cultures d'adipocytes isolés que le peroxyde d'hydrogène mime les effets métaboliques de l'insuline : activation du transport de glucose, de son oxydation, de la synthèse de glycogène et de lipides et inhibition de la lipolyse (Czech *et al.*, 1974b; Lawrence *et al.*, 1978; May *et al.*, 1979a). Ces effets étaient associés à une activation de la voie de signalisation de l'insuline, avec phosphorylation du récepteur de l'insuline (Heffetz *et al.*, 1992), activation de la PI 3 kinase et de la PKB (Shaw *et al.*, 1998). L'utilisation de divers réactifs modifiant les groupements sulfhydryles des protéines a permis de mettre en évidence que l'action insulino-mimétique du peroxyde d'hydrogène implique l'oxydation de résidus cystéine protéiques, qui conditionnerait l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et l'initiation de sa voie de signalisation (Czech *et al.*, 1974a; Wilden *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1993).

Par ailleurs, d'autres études ont montré une production transitoire de peroxyde d'hydrogène en réponse à différents stimuli (facteurs de croissance, cytokines) (Sundaresan *et al.*, 1995), dont l'insuline (May *et al.*, 1979b), par l'intermédiaire d'une voie indépendante de la phosphorylation du récepteur de l'insuline sur ses résidus tyrosine (Krieger-Brauer *et al.*, 1992) et dont l'effecteur serait une NADPH oxydase membranaire (Mukherjee *et al.*, 1977).

Des résultats plus récents ont confirmé que le peroxyde d'hydrogène produit en réponse à l'insuline active des étapes précoces de sa voie de signalisation (Schmid *et al.*, 1998). L'activation de la voie de signalisation de l'insuline nécessiterait une étape oxydative préliminaire qui favoriserait l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline et le déclenchement de la cascade de phosphorylations aboutissant aux réponses cellulaires de l'insuline. Les mécanismes de ce phénomène, dit de « redox priming », ont été décrits (Fig.16). En réponse à l'insuline, l'activation de l'isoforme 4 de la NADPH oxydase conduit rapidement à une production modérée de peroxyde d'hydrogène qui agirait comme un second

messager de l'insuline. (Hildebrandt *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 2005). L'oxydation par le peroxyde d'hydrogène de la PTP1B, une phosphatase inhibitrice de la phosphorylation des résidus tyrosine, lèverait l'inhibition exercée par cette-dernière sur le récepteur de l'insuline à l'état basal, favorisant ainsi le déclenchement de la transduction du signal de l'insuline (van Montfort *et al.*, 2003). Ces mécanismes joueraient un rôle particulièrement important dans l'activation du transport de glucose dans le muscle squelettique au cours d'un exercice (Sandstrom *et al.*, 2006). Ainsi, à dose faible, le peroxyde d'hydrogène joue un rôle de second messager de l'insuline favorisant l'activation de sa voie de signalisation.

En revanche, une exposition prolongée aux espèces réactives de l'oxygène induit des perturbations du statut redox qui peuvent inhiber la voie de signalisation de l'insuline et induire une IR (Fig.17).

Le premier mécanisme des effets délétères des espèces réactives de l'oxygène est l'activation des protéines phosphatases impliquées dans l'extinction du signal de l'insuline, PTP-1B, LAR et SHP2 (Saltiel *et al.*, 2002; Asante-Appiah *et al.*, 2003). Ces protéines phosphatases induisent la déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur à l'insuline et des protéines IRS (Gual *et al.*, 2005). D'autres événements clés de la voie de signalisation de l'insuline semblent être perturbés par l'excès de peroxyde d'hydrogène. Sur des lignées adipocytaires 3T3L1, l'ajout de peroxyde d'hydrogène à des concentrations micromolaires altère l'association des protéines IRS à la PI 3-kinase en modifiant la distribution de ces deux protéines entre le cytosol et les compartiments endosomiques du LDM (low density microsome) (Tirosh *et al.*, 1999; Nomiyama *et al.*, 2004).

A plus long terme, lorsque l'organisme se trouve dans une situation de stress oxydant, l'activation des voies de signalisation du stress et de l'inflammation est également impliquée dans l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline. L'activation du facteur de transcription NF-κB, de la PKC, de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα et des voies sensibles au stress, comme la voie de la protéine 38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) et la voie des NH2-terminal Jun kinase et stress-activated protein kinases (JNK/SAPK) (Nishikawa *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2003), favorise les phosphorylations sur les résidus sérine et inhibe les phosphorylations sur les résidus tyrosine du récepteur à l'insuline et des protéines IRS, deux mécanismes largement impliqués dans l'IR (Kim *et al.*, 2004a; Cai *et al.*, 2005).

2.2. Rôle du stress oxydant dans la physiopathologie de l'insulino-résistance

De plus en plus de données expérimentales et cliniques suggèrent que le stress oxydant, par l'intermédiaire des mécanismes précédemment décrits, joue un rôle dans la physiopathologie des étapes précoces de l'IR (Ceriello, 2003).

Plusieurs études épidémiologiques ont observé dans des cohortes de sujets non-diabétiques une corrélation indépendante entre la glycémie à jeun et différents marqueurs de stress oxydant. Dans trois d'entre elles, la glycémie à jeun était positivement corrélée aux concentrations plasmatiques en 8-épi-prostaglandine $F_{2\alpha}$ ou en substances réactives à l'acide thiobarbiturique, marqueurs de la peroxydation des lipides par les radicaux libres, et négativement corrélée aux concentrations sanguines en glutathion (Gopaul *et al.*, 2001; Trevisan *et al.*, 2001; Menon *et al.*, 2004). Chez les sujets intolérants au glucose mais non insulino-résistants, le niveau de stress oxydant était significativement plus important, et l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase plus faibles que chez des sujets non intolérants au glucose (Vijayalingam *et al.*, 1996). De plus, dans l'étude de Gopaul *et al.*, les concentrations plasmatiques en 8-épi-prostaglandine $F_{2\alpha}$ étaient également positivement corrélées à l'index HOMA d'IR (Fig. 18), et négativement corrélées à la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante.

L'importance du stress oxydant dans l'étiologie de l'IR est également suggérée par les études mettant en évidence l'effet bénéfique d'un apport supplémentaire en antioxydants sur l'insulino-sensibilité. Chez le rat Zucker obèse, un modèle d'IR, un apport supplémentaire en vitamine E pendant 4 semaines réduit le stress oxydant, évalué par les concentrations plasmatiques en 8-épi-prostaglandine $F_{2\alpha}$ (Laight *et al.*, 1999). L'amélioration du statut redox s'accompagne d'une diminution de la glycémie et de l'insulinémie à jeun ($P<0.1$), et d'une réduction significative de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie induites par une charge de glucose. Des résultats similaires ont été obtenus chez l'Homme. Chez des sujets diabétiques de type 2 un apport supplémentaire en acide α-lipoique augmente la tolérance au glucose, la sensibilité à l'insuline et le taux d'extraction métabolique du glucose (Jacob *et al.*, 1999). Cet effet bénéfique de l'acide lipoique sur le transport de glucose, par l'intermédiaire de l'activation d'étapes en amont de la voie de signalisation de l'insuline, a été confirmé *in vitro*, sur des cellules musculaires et des adipocytes isolés (Jacob *et al.*, 1996) (Henriksen *et al.*, 1997). De la même manière, un apport supplémentaire en vitamine E chez des sujets

obèses insulino-résistants réduit significativement les concentrations sanguines en peroxydes ainsi que l'insulinémie, la glycémie à jeun et l'index HOMA (Manning *et al.*, 2004) et des résultats similaires ont été obtenus chez le sujet sain (Paolisso *et al.*, 1993). Dans l'étude de Manning *et al.*, la diminution de l'insulinémie à jeun et des concentrations sanguines en peroxydes étaient significativement et positivement corrélées à l'augmentation des concentrations plasmatiques en vitamine E, ce qui souligne l'évolution parallèle des marqueurs du statut redox et de ceux de l'insulino-sensibilité (Manning *et al.*, 2004). Chez des sujets hypertendus non insulino-résistants, l'amélioration de l'insulino-sensibilité suite à une supplémentation en vitamine E, mesurée par un clamp euglycémique hyperinsulinémique, s'accompagnait d'une amélioration du statut en glutathion (Barbagallo *et al.*, 1999b).

Enfin, les modèles expérimentaux d'induction d'IR indiquent que le stress oxydant joue un rôle critique dans l'apparition de cette pré-pathologie. Chez l'animal, la consommation d'un régime riche en saccharose ou en fructose induit un stress oxydant à court terme (2 semaines), comme l'indiquent l'augmentation des concentrations urinaires en substances réactives à l'acide thiobarbiturique et la diminution de l'activité et de l'expression de la catalase et de la superoxyde dismutase dans différents tissus (Cavarape *et al.*, 2001; Busserolles *et al.*, 2002b). Ces modifications du statut redox sont associées à une IR hépatique et périphérique (Pagliassotti *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 2005) et une perte importante de réactivité de la voie de signalisation de l'insuline en réponse à une stimulation insulinique (Bezerra *et al.*, 2000). Un apport supplémentaire en acide α-lipoique ou en vitamine E prévient la dégradation du statut en glutathion, la diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes (glutathion peroxydase et superoxyde dismutase) et l'IR induite par la consommation d'un régime riche en saccharose ou en fructose (Faure *et al.*, 1997; El Midaoui *et al.*, 2002).

2.3. Le stress oxydant au cours de la période postprandiale

Lors de la production d'énergie, les phosphorylations oxydatives mitochondriales s'accompagnent de la production de peroxyde d'hydrogène. L'augmentation de la disponibilité des nutriments énergétiques (glucose ou acides gras), associée à la période postprandiale, accroît la production de donneurs d'électrons NADH et $FADH_2$, qui augmentent le potentiel membranaire mitochondrial et favorisent la réduction de l'oxygène en anion superoxyde (Du *et al.*, 2000; Brownlee, 2001) (Fig. 19). L'excès de superoxyde

perturbe en lui-même le statut redox intracellulaire, mais son action inhibitrice sur l'activité de la GAPDH, enzyme de la glycolyse, intensifie ses effets délétères. L'inhibition de la GAPDH conduit à une accumulation des métabolites en amont de cette enzyme (glycéraldéhyde-3P, fructose-6P et glucose), qui sont alors utilisés par des voies métaboliques parallèles, la voie des hexosamines et la voie des polyols, ou disponibles pour des réactions non enzymatiques, la glycation et l'autooxydation du glucose (Du *et al.*, 2000; Bonnefont-Rousselot, 2002) (Fig. 20). L'activation de ces voies a des conséquences délétères directes sur les macromolécules, notamment en oxydant l'ADN, les protéines et les lipides et modifiant ainsi leurs fonctions, mais également en activant des voies de l'inflammation et des voies sensibles au stress, impliquées dans l'IR.

S'il est reconnu que ces mécanismes jouent un rôle central dans la physiopathologie des complications liées au diabète (Ceriello *et al.*, 2004), leur implication chez le sujet sain dans l'étiologie de l'IR est encore discutée. Chez l'Homme sain une hyperglycémie prolongée, induite lors d'un clamp hyperglycémique, est associée à une augmentation significative des concentrations plasmatiques en nitrotyrosine (Marfella *et al.*, 2001) et en cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF-α, ces augmentations étant prévenues par la perfusion simultanée de glutathion (Esposito *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus chez des sujets diabétiques au cours de la phase postprandiale (Ceriello *et al.*, 2002), mais pas chez des sujets sains, chez qui l'hyperglycémie postprandiale est plus modérée et transitoire (Ceriello *et al.*, 2002). L'absence de modifications du statut redox plasmatique suite à l'administration d'une charge orale de glucose chez des sujets sains a été confirmée dans une seconde étude (Ma *et al.*, 2005). Cependant, une étude épidémiologique très récente a mis en évidence une corrélation positive significative entre les concentrations urinaires de 8-isoprostaglandine F2α et l'amplitude des excursions glycémiques postprandiales (r^2=0,72), et l'aire sous la courbe de la glycémie postprandiale (r^2=0.41) (Monnier *et al.*, 2006). D'autres études réalisées chez le sujet sain ont montré une diminution des défenses antioxydantes totales plasmatiques et des groupements sulfhydryles réduits portés par les protéines (Ceriello *et al.*, 1998), et une augmentation des concentrations plasmatiques de malondialdéhyde (Koska *et al.*, 2000) suite à l'administration d'une charge orale de glucose. Ces effets étaient associés à une diminution des concentrations érythrocytaires en glutathion total, corrélée linéairement avec l'excursion glycémique mesurée après la charge de glucose (Konukoglu *et al.*, 1997). Ainsi, plusieurs résultats sont en faveur de l'existence d'un stress oxydant postprandial chez le sujet sain.

2.4. Stress oxydant, hyperglycémie et altération de la fonction sécrétoire des cellules β pancréatiques et de la fonction endothéliale

Dans les tissus insulino-sensibles (principalement le tissu musculaire et le tissu adipeux), l'IR peut être considérée comme un mécanisme protecteur vis-à-vis de l'excès des substrats énergétiques, puisqu'elle réduit l'entrée du glucose dans la cellule et par conséquent limite la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Ceriello *et al.*, 2004). Certains tissus, dans lesquels le transport de glucose se fait de manière passive, sont donc plus particulièrement sujets au stress oxydant associé à l'hyperglycémie. C'est le cas des îlots de Langerhans et de l'endothélium vasculaire. Les îlots de Langerhans expriment le transporteur de glucose GLUT2, qui présente une faible affinité pour le glucose et dont l'activité augmente fortement lorsque la glycémie dépasse son niveau basal de 5 $mmol.L^{-1}$, ce qui provoque une accumulation de glucose importante dans les cellules β en cas d'hyperglycémie. Dans le cas de l'endothélium vasculaire, s'il exprime le transporteur de glucose GLUT 1 à forte affinité pour le glucose, ce qui le protège en partie des hyperglycémies, il est particulièrement sensible aux hyperglycémies car c'est le premier exposé au glucose plasmatique.

L'hyperglycémie joue un rôle central dans l'apparition de la dysfonction sécrétoire des cellules β. Chez des sujets non diabétiques, la glycémie à jeun est corrélée négativement à l'amplitude de la phase précoce de la sécrétion d'insuline en réponse à une charge intraveineuse de glucose (Godsland *et al.*, 2004) (Fig. 21). La glucotoxicité serait une conséquence directe du stress oxydant issu du métabolisme pancréatique du glucose (Robertson *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003). Les cellules β pancréatiques sont particulièrement sensibles au stress oxydant car elles possèdent un bagage enzymatique antioxydant restreint (catalase, glutathion peroxydase et superoxyde dismutase) (Tiedge *et al.*, 1997). L'exposition prolongée de cellules β pancréatiques à des concentrations élevées de glucose induit une diminution de l'expression du gène codant pour l'insuline (Olson *et al.*, 1993; Jacqueminet *et al.*, 2000), prévenue par la l'administration simultanée d'antioxydants comme le NAC (Tanaka *et al.*, 1999) ou par la surexpression de la glutathion peroxydase chez le rat (Robertson *et al.*, 2003). *In vivo*, la perfusion prolongée de glucose chez des sujets sains réduit la sécrétion d'insuline (Boden *et al.*, 1996). Des données mécanistiques suggèrent que la surproduction d'anion superoxyde par la mitochondrie activerait d'une part la protéine UCP2 (uncoupling protein 2), diminuant ainsi le ratio ATP/ADP et l'exocytose des granules d'insuline (Krauss *et al.*, 2003), et d'autre part des facteurs pro-apoptotiques des cellules β,

via l'activation de NFκB et de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine 1 (Cardozo *et al.*, 2001; Fridlyand *et al.*, 2004).

Dans l'endothélium vasculaire, le stress oxydant associé à l'hyperglycémie induit une diminution de la biodisponibilité du NO (Giugliano *et al.*, 1997) de façon directe, via l'oxydation du NO en peroxynitrite, et indirecte, par l'intermédiaire de l'inhibition de eNOS au niveau transcriptionnel et post-traductionnel (Du *et al.*, 2001). L'inhibition de l'activité eNOS en situation de stress oxydant serait pour partie la conséquence d'une augmentation de la concentration en ADMA, un inhibiteur constitutif endogène de cette enzyme (Lin *et al.*, 2002; Sydow *et al.*, 2005). L'oxydation de la tétrahydrobioptérine, un cofacteur de eNOS, contribuerait également à une réduction de la production de NO et une augmentation de la production d'anion superoxyde par eNOS, un phénomène appelé découplage (Channon, 2004). Ces mécanismes, notamment au niveau des artérioles musculaires, ont pour conséquence à court et moyen terme une moindre perfusion des tissus et contribuent à diminuer la captation de glucose (Frisbee *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2005). A plus long terme, le stress oxydant de l'endothélium vasculaire participe à la dysfonction endothéliale, dont l'incidence est corrélée à la formation de produits finaux de la glycation, marqueur de stress oxydant, chez les sujets diabétiques (Federici *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2002).

3. LE STATUT EN GLUTATHION ET LA REGULATION GLYCEMIQUE

Bien que l'on dispose de peu d'éléments démontrant une relation directe entre le glutathion et l'homéostasie du glucose, plusieurs indices expérimentaux suggèrent que des modulations du statut en glutathion peuvent affecter l'insulino-sensibilité.

In vitro, l'exposition de cellules 3T3L1 à des concentrations millimolaires de peroxyde d'hydrogène induit une déplétion des stocks de glutathion intracellulaires associée à des altérations de la voie de signalisation de l'insuline et une diminution significative du transport de glucose induit par l'insuline (Rudich *et al.*, 1999). De même, la déplétion des stocks de glutathion intracellulaire de lignées 3T3L1 par l'intermédiaire d'un traitement au D,L-Buthionine sulfoximine (BSO) provoque une diminution de la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines IRS1 en réponse à l'insuline, ainsi qu'une diminution de l'activation de la PI 3-kinase et de la PKB, et une réduction de la translocation des transporteurs GLUT4 à la

membrane et de la captation du glucose (Khamaisi *et al.*, 2000; Ogihara *et al.*, 2004). Les effets négatifs de la déplétion des stocks de glutathion sur la voie de signalisation de l'insuline impliqueraient l'activation du facteur de transcription NFκB, puisque le traitement au BSO induit la phosphorylation de la protéine IκB, responsable de la séquestration de NFκB dans le cytosol et dont la phosphorylation permet la translocation de NFκB vers le noyau. La surexpression d'un mutant spécifique dominant négatif pour la protéine IκB désensibilise les cellules 3T3L1 aux effets délétères du BSO (Ogihara *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que l'altération du statut en glutathion induit l'activation de NFκB, ce-dernier favorisant l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline.

Des données obtenues chez l'animal ont confirmé ces résultats. Chez le rat, la déplétion chronique des stocks de glutathion par l'intermédiaire d'un traitement au BSO induit une diminution progressive des concentrations sanguines, musculaires et hépatiques des thiols de faible poids moléculaire, associée à une intolérance au glucose et à une IR hépatique et périphérique (Khamaisi *et al.*, 2000; Guarino *et al.*, 2003; Ogihara *et al.*, 2004) (Fig. 22). Des observations réalisées sur des fragments de muscle et de tissu adipeux blanc prélevés sur des animaux traités au BSO ont confirmé qu'une déplétion des stocks de glutathion est associée à une altération des étapes précoces de la voie de signalisation de l'insuline, de la translocation de GLUT4 et du transport de glucose en réponse à une stimulation insulinique (Khamaisi *et al.*, 2000; Ogihara *et al.*, 2004). De plus, chez ces animaux, l'inhibition de la synthèse de glutathion est également associée à une diminution de la disponibilité plasmatique du NO, une augmentation de la pression artérielle et une altération de la fonction endothéliale susceptible de diminuer la microperfusion musculaire et par conséquent, la captation périphérique de glucose (Ganafa *et al.*, 2002)

Dans la plupart de ces travaux, l'administration de BSO est associée à l'induction d'un stress oxydant, comme l'indiquent l'augmentation du ratio glutathion oxydé/glutathion réduit au niveau du cœur, du rein et de l'aorte chez des animaux traités au BSO (Ganafa *et al.*, 2002), ainsi que l'augmentation des concentrations plasmatiques en peroxyde d'hydrogène (Ogihara *et al.*, 2004). Ces données indiquent que la déplétion aiguë ou chronique des stocks de glutathion est associée à une dégradation du statut en glutathion mais également à un stress oxydant et suggèrent que la modulation de la régulation de la glycémie résultant de la déplétion des stocks de glutathion pourrait être la conséquence du stress oxydant induit par le BSO et non pas un effet direct de la modulation du statut en glutathion.

A contrario, plusieurs études suggèrent que l'amélioration du statut en glutathion est associée à une amélioration de la régulation de la glycémie.

L'ajout de glutathion réduit au milieu de culture d'îlots pancréatiques isolés de rats ou d'humains augmente la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation au glucose de façon dose-dépendante (Ammon *et al.*, 1989; Del Guerra *et al.*, 2005), tandis que le glutathion oxydé induit l'effet inverse (Ammon *et al.*, 1986), ce qui suggère que le statut en glutathion module la sensibilité des cellules β au glucose. Par ailleurs, l'incubation de cellules 3T3L1 avec du peroxyde d'hydrogène induit une diminution des concentrations en glutathion total et de la captation de glucose en réponse à une stimulation à l'insuline. Ces effets sont prévenus par l'acide α-lipoique, qui accroît la synthèse de novo de glutathion en réduisant la cystine et en augmentant ainsi la disponibilité en cystéine (Han *et al.*, 1997), mais pas par d'autres antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E (Rudich *et al.*, 1999).

Ces résultats ont été confirmés *in vivo*. Chez le rat, une perfusion intraveineuse de glutathion augmente la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation au glucose (Ammon *et al.*, 1989). Chez l'homme sain, l'amélioration du statut en glutathion sanguin en réponse à une administration intraveineuse de glutathion est associée à une augmentation de la captation de glucose lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (Paolisso *et al.*, 1992b; De Mattia *et al.*, 1998; Barbagallo *et al.*, 1999a). Chez des sujets intolérants au glucose ou diabétiques, les mêmes effets sont observés et de façon plus marquée, et s'accompagnent d'une amélioration de la tolérance au glucose et d'une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à une administration intraveineuse de glucose (Paolisso *et al.*, 1992b; De Mattia *et al.*, 1998). Dans ces études, le ratio glutathion oxydé/glutathion total était négativement et significativement corrélé à la sensibilité à l'insuline évaluée lors du clamp euglycémique hyperinsulinémique (De Mattia *et al.*, 1998; Barbagallo *et al.*, 1999a) (Fig. 23). Cependant, l'utilisation de doses pharmacologiques de glutathion dans ces expériences de perfusion rend difficile l'extrapolation des résultats à une situation physiologique normale.

4. APPORT EN ACIDES AMINES SOUFRES ET REGULATION GLYCEMIQUE

On dispose de très peu de travaux ayant exploré l'effet direct de l'apport en AAS sur les mécanismes de régulation de la glycémie. En revanche, plusieurs études portent sur l'effet du NAC, un antioxydant, qui est un donneur de cystéine en particulier lorsqu'il est administré par voie orale, du fait de son important métabolisme intestinal de premier passage.

Chez le rat, une perfusion intraveineuse de NAC au cours d'un clamp hyperglycémique de 6 heures prévient l'apparition d'un stress oxydant induit par l'hyperglycémie, évalué par la mesure de la peroxydation lipidique et de la carbonylation des protéines musculaires, ainsi que la mise en place d'une IR, mesurée par un clamp euglycémique hyperinsulinémique subséquent (Haber *et al.*, 2003). En effet, la diminution de 20% du débit de glucose perfusé pendant le clamp euglycémique hyperinsulinémique chez les rats exposés pendant 6 heures à l'hyperglycémie, était entièrement prévenue par l'administration simultanée de NAC. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence l'implication du stress oxydant dans les effets délétères de l'hyperglycémie sur l'insulino-sensibilité, et affirment que l'effet bénéfique du NAC est principalement induit par ses propriétés antioxydantes, et non par son rôle de donneur de cystéine et précurseur du glutathion. Cette conclusion s'appuie sur l'observation d'un effet protecteur analogue de la taurine, acide aminé qui possède également des propriétés antioxydantes mais ne peut être converti en cystéine. De plus, dans cette étude, la voie d'administration du NAC est en faveur de son effet antioxydant direct puisque le métabolisme de premier passage est réduit, ce qui n'est pas le cas lors d'une administration par voie orale.

Dans une étude similaire réalisée chez l'Homme sain, l'administration intraveineuse de NAC à dose faible (0,5 $mg.kg^{-1}$ vs. environ 126 mg.kg-1 dans l'étude de Haber *et al.*) était associée à une augmentation de la captation périphérique de glucose (Ammon *et al.*, 1992). Cependant, à dose plus forte (4 $mg.kg^{-1}$) le NAC ne modifiait plus la captation de glucose, un résultat qui rend difficile l'interprétation de ces données. La perfusion de NAC était associée à une augmentation dose-dépendante des concentrations plasmatiques en cystéine mais ne modifiait pas les concentrations plasmatiques en glutathion.

S'il n'existe pas à l'heure actuelle d'études ayant exploré l'effet aigu du NAC par voie orale sur les mécanismes de régulation de la glycémie, plusieurs auteurs ont exploré son effet au cours d'une supplémentation chronique, la plupart du temps dans des contextes expérimentaux de prédisposition à l'IR ou au diabète.

Chez des rats recevant un régime riche en fructose, un apport supplémentaire en NAC prévient l'augmentation du stress oxydant, de la pression artérielle, l'hyperinsulinémie à jeun et en réponse à une charge de glucose, ainsi que l'IR, telle qu'évaluée par un index d'insulino-sensibilité (Song *et al.*, 2005). De la même manière, chez des rats recevant un régime hypersaccharosé (HS), un apport supplémentaire en NAC par voie orale prévient la dégradation du statut antioxydant de l'organisme - évalué au niveau hépatique et plasmatique

par les concentrations en glutathion total, le statut en glutathion et l'activité de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase – ainsi que la dyslipidémie et l'hyperglycémie à jeun (Diniz *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats Zucker prédisposés au diabète et à l'obésité et chez des souris diabétiques. Sur ces modèles, un apport supplémentaire en NAC à partir de l'âge de 6 semaines prévient l'augmentation du stress oxydant, limite l'hyperglycémie à jeun, l'intolérance au glucose et la dysfonction sécrétoire des cellules β pancréatiques (Kaneto *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). Enfin, chez des femmes présentant un syndrome de l'ovaire polykystique, où l'on retrouve fréquemment une IR, un apport supplémentaire en NAC pendant 6 semaines par voie orale est associé à une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité périphérique à l'insuline (Fulghesu *et al.*, 2002).

De la même manière que dans les études de perfusion de NAC en aigu au cours de clamps hyperglycémiques, les auteurs concluent le plus souvent des études à long terme que l'administration de NAC améliore la régulation de la glycémie par son action antioxydante directe. Bien que certaines d'entre elles rapportent une augmentation des concentrations hépatiques de glutathion en réponse à un apport supplémentaire en NAC (Diniz *et al.*, 2006), l'observation que d'autres antioxydants tels que l'aminoguanidine et les vitamines C et E induisent les mêmes effets bénéfiques similaires vis-à-vis du statut redox et de l'insulino-sensibilité est en défaveur d'un rôle du glutathion (Kaneto *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999; Nandhini *et al.*, 2005).

Plusieurs indices expérimentaux suggèrent cependant que des manipulations de l'apport en AAS induisent des modifications des mécanismes de régulation de la glycémie par l'intermédiaire de la synthèse de glutathion. En particulier, des résultats récents sont en faveur d'un rôle direct du glutathion hépatique dans l'utilisation périphérique du glucose pendant la période postprandiale par l'intermédiaire de sa contribution à la synthèse de la substance hépatique sensibilisant à l'insuline (SHSI). D'après l'hypothèse de Lautt *et al.*, l'insuline initie lors de la période postprandiale un réflexe parasympathique qui permettrait la libération par le foie d'une substance sensibilisant les tissus périphériques à l'action de l'insuline (Lautt, 1999; Lautt, 2004) (Fig. 24). Celle-ci serait responsable d'environ 50% de l'effet de l'insuline sur l'utilisation du glucose en période postprandiale (Lautt, 1999) et chez le rat nourri avec un régime HS, l'IR serait en grande partie la conséquence d'une moindre production de cette substance (Ribeiro *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2005). La libération de la SHSI met en jeu la production hépatique de NO (Guarino *et al.*, 2004) et des résultats obtenus

récemment par cette équipe suggèrent que la production hépatique de glutathion est également requise.

Dans une première étude, Guarino a mis en évidence chez le rat que l'administration aiguë d'un inhibiteur de la synthèse du NO, le L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester), induit une IR pouvant être prévenue par l'administration d'un donneur de NO capable de S-nitrosyler le glutathion, SIN-1, tandis que le nitroprusside de sodium, autre donneur de NO ne conduisant pas à la formation de S-nitrosoglutathion, est sans effet. Par ailleurs, chez des rats déplétés en glutathion, l'administration de L-NAME et de SIN-1 ne modifient pas la sensibilité à l'insuline (Guarino *et al.*, 2003). Dans une seconde étude, cette équipe a observé que l'administration de SIN-1 et de glutathion chez le rat augmente la sensibilité à l'insuline de façon dose-dépendante, tandis que séparément ces deux composés sont sans effet (Guarino *et al.*, 2006).

Ces données suggèrent un rôle conjoint du NO et du glutathion dans la formation de la SHSI, qui pourrait mettre en jeu la formation de nitrosoglutathion à partir de ces deux molécules. Le nitrosoglutathion est formé lors de la nitrosylation du groupement sulfhydryle du glutathion par le NO. C'est un conjugué stable et une forme de stockage du NO, qui pourrait prolonger son action et permettre son transport dans le plasma, favorisant ainsi son action à distance, notamment au niveau du muscle où il joue un rôle dans la captation de glucose (Jourd'heuil *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 2003).

Si plusieurs éléments convergent pour suggérer qu'une augmentation de l'apport en cystéine pourrait prévenir les désordres de la régulation de la glycémie, notamment chez des sujets prédisposés à l'IR, par l'intermédiaire de l'amélioration de la synthèse et du statut en glutathion, il n'existe pas à l'heure actuelle de démonstration directe de cette hypothèse. D'autres études sont donc nécessaires, et en particulier pour mettre en évidence que l'apport en cystéine dans un contexte nutritionnel (apport direct en cystéine et utilisation de doses physiologiques) peut moduler les mécanismes de régulation de la glycémie.

C. AUTRES MECANISMES D'ACTION DES ACIDES AMINES ET DES PROTEINES ALIMENTAIRES SUR LA REGULATION GLYCEMIQUE.

Au-delà de son effet sur le statut redox au travers des acides aminés soufrés, la fraction protéique de l'alimentation pourrait influencer les différentes composantes de la régulation glycémique par le biais d'autres acides aminés, intervenant directement dans la production endogène de glucose en tant que substrats néoglucogéniques, ou modulant la fonction endocrine pancréatique et la captation de glucose des tissus périphériques. Dans cette troisième partie, nous présentons les données concernant les autres mécanismes d'action des acides aminés et des protéines alimentaires sur la régulation glycémique.

1. ACIDES AMINES, PROTEINES ALIMENTAIRES ET PRODUCTION ENDOGENE DE GLUCOSE

1.1. Rappels sur la production endogène de glucose et sa régulation

L'organisme dispose de deux voies métaboliques lui permettant de produire du glucose en période post-absorptive : la glycogénolyse**,** correspondant à l'utilisation des réserves de glycogène du foie et du muscle, et la néoglucogenèse, ou synthèse de glucose à partir de substrats tels que le glycérol, le lactate, le pyruvate ou les acides aminés. La néoglucogenèse a lieu majoritairement au niveau hépatique et serait responsable de 75% de la production endogène de glucose en période post-absorptive (Hellerstein *et al.*, 1997). Elle serait activée après un jeûne prolongé dans le rein et selon certains travaux récents dans l'intestin grêle (Meyer *et al.*, 1999; Croset *et al.*, 2001). Ces deux voies métaboliques productrices de glucose sont soumises à une régulation nutritionnelle et hormonale, dont les deux principaux acteurs sont l'insuline et le glucagon (Pilkis *et al.*, 1992).

En période post-absorptive (Fig. 25 A), la baisse de l'insulinémie lève l'inhibition exercée par l'insuline sur la sécrétion de glucagon (Ishihara *et al.*, 2003). L'augmentation de la

glucagonémie et la diminution de l'insulinémie activent la glycogénolyse. Son principal site de régulation se situe au niveau de la glycogène phosphorylase. Le glucagon stimule la synthèse d'AMPc, ce qui entraîne l'activation de la glycogène phosphorylase (Roden *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2003). Parallèlement, la baisse de l'insulinémie lève l'inhibition exercée par l'insuline sur la glycogène phosphorylase, entraînant une réduction de l'activité glycogène synthase (Barthel *et al.*, 2003).

L'augmentation du ratio glucagon/insuline favorise également la néoglucogenèse. L'activation de cette voie varie selon l'abondance de ses précurseurs (lactate, glycérol et acides aminés glucoformateurs) et l'activité de ses trois enzymes limitantes : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la fructose-1,6-bisphosphatase (F-1,6-BPase). Le glucagon induit une augmentation de l'activité de ces trois enzymes (Barthel *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003). La baisse de l'insulinémie entraîne la levée de l'inhibition des activités pyruvate kinase, PEPCK et G6PASE, et réduit l'activité glucokinase (Lawrence, 1992; Barthel *et al.*, 2003). En parallèle, l'inhibition exercée par l'insuline sur la lipolyse et la libération des acides gras et du glycérol par le muscle et le tissu adipeux est levée (Sindelar *et al.*, 1997).

En période postprandiale (Fig. 25 B), l'activation de la sécrétion d'insuline a pour conséquence les effets inverses de ceux précédemment décrits et limite ainsi la production hépatique de glucose, ce qui favorise la régulation glycémique en période postprandiale.

1.2. Rôle des acides aminés comme précurseur dans la néoglucogenèse

Les acides aminés servent de première source de carbone pour la néoglucogenèse hépatique (Jungas *et al.*, 1992). A l'exception de la leucine et la lysine, le catabolisme oxydatif de tous les acides aminés peut conduire à la formation de pyruvate ou d'intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques pouvant servir de précurseur pour la néoglucogenèse (Beaufrère, 2002) (Fig. 26). L'alanine et la glutamine sont les acides aminés qui participent le plus à la néoglucogenèse.

Certains acides aminés, notamment les acides aminés à chaîne latérale ramifiée, participent à la production de glucose par l'intermédiaire du cycle alanine-glucose. Il existe un flux continu d'AAR de la zone viscérale vers le tissu musculaire, où ils sont transaminés et fournissent un groupement α-aminé utilisé pour la production d'alanine à partir du pyruvate (Fig. 27). Un flux parallèle d'alanine du muscle vers le foie alimente la néoglucogenèse

hépatique (Ahlborg *et al.*, 1974). Le cycle alanine-glucose joue un rôle particulièrement important au cours de l'exercice et du jeûne (Rennie *et al.*, 2000). Dans des conditions physiologiques normales, l'alanine formée à partir des AAR serait responsable de 25 % de la néoglucogenèse à partir d'acides aminés (Layman, 2003).

1.3. Effet aigu de l'ingestion d'un repas protéique sur la production endogène de glucose

L'ingestion de protéines est susceptible de favoriser la production endogène de glucose : les acides aminés stimulent la sécrétion de glucagon et le catabolisme des acides aminés augmente la disponibilité de substrats néoglucogéniques. Cependant, chez le sujet sain et diabétique de type II, l'ingestion d'un repas exclusivement composé de protéines ne provoque pas d'augmentation de la glycémie, qui est maintenue à sa valeur physiologique normale (Brand-Miller *et al.*, 2000; Gannon *et al.*, 2001). De fait, la mesure directe de l'efflux hépatique de glucose par cathétérisation de la veine hépatique démontre l'absence d'augmentation de la production hépatique nette de glucose (PHG) en réponse à l'ingestion de protéines (Wahren *et al.*, 1976; Barrett *et al.*, 1986), ce qui a été confirmé par l'utilisation de techniques de dilution isotopique avec perfusion de [^{13}C]- ou [^{3}H]-glucose chez l'Homme (Khan *et al.*, 1992; Gannon *et al.*, 2001) (Fig. 28). Dans ces deux dernières études, la mesure de la synthèse d'urée indique toutefois une augmentation du catabolisme des acides aminés, suggérant une augmentation de leur utilisation pour la néoglucogenèse.

Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer de deux façons. D'une part, dans des conditions où la disponibilité des acides aminés est accrue, le foie utiliserait préférentiellement les acides aminés comme substrat de la néoglucogenèse aux dépens des autres substrats néoglucogéniques tels que le glycérol ou le lactate, maintenant ainsi la PHG nette au niveau observé au cours du jeûne précédent le repas (Jahoor *et al.*, 1990; Tappy *et al.*, 2000). D'autre part, une adaptation du métabolisme hépatique du glycogène pourrait survenir - diminution de la glycogénolyse et/ou orientation du glucose néoformé vers la synthèse de glycogène hépatique – afin de prévenir toute augmentation de la PHG nette.

Les résultats de plusieurs études viennent soutenir cette dernière hypothèse. Bien que l'augmentation de la glucagonémie en réponse à une perfusion d'acides aminés active la néoglucogenèse et la glycogénolyse (Boden *et al.*, 1990; Krebs *et al.*, 2003), la glycogénolyse est très sensible à l'inhibition que l'insuline exerce sur elle (Edgerton *et al.*, 2001).

L'activation de la néoglucogenèse en réponse à une perfusion intraveineuse d'acides aminés se fait sans modification de la PHG nette et de la glycémie, comparées aux valeurs à jeun, ce qui suggère que l'activation de la sécrétion d'insuline par les acides aminés contrebalance l'effet activateur du glucagon sur la glycogénolyse, conduisant à une inhibition de la glycogénolyse (Krebs *et al.*, 2003).

Par ailleurs, d'autres données suggèrent que le glucose néoformé en réponse à l'activation de la néoglucogenèse par les acides aminés est orienté vers la synthèse de glycogène. Sur des hépatocytes isolés prélevés sur rats à jeun et incubés en présence de glucose, l'ajout d'une solution d'acides aminés au milieu de culture augmente le dépôt de glycogène, stimule la glycogène synthase et diminue les flux de la glucose-6-phosphatase (Baquet *et al.*, 1990; Gustafson *et al.*, 2001). L'augmentation du pool de glucose-6-phosphate, un activateur allostérique de la glycogène synthase, et l'inhibition de la glycogène synthase kinase 3, une enzyme inhibitrice de la glycogène synthase, pourraient expliquer ces résultats (Armstrong *et al.*, 2001). *In vivo*, la synthèse de glycogène en réponse à l'administration intragastrique d'une charge de glucose est très inhibée en présence d'inhibiteurs de la néoglucogenèse (Newgard *et al.*, 1984). Ces données soulignent l'implication de la néoglucogenèse dans la synthèse de glycogène, une voie métabolique appelée néoglycogenèse (Radziuk *et al.*, 2001), mais l'activation de cette voie *in vivo* en réponse à l'ingestion d'un repas protéique n'a pas encore été démontrée.

1.4. Effet de l'adaptation à une alimentation hyperprotéique sur la production endogène de glucose

Plusieurs résultats expérimentaux suggèrent que l'adaptation à une alimentation riche en protéines est associée à une augmentation de la capacité néoglucogénique. Chez le rat, la consommation d'un régime HP induit à moyen terme (10 à 21 jours de traitement) une augmentation de l'activité hépatique de systèmes de transport des acides aminés et d'enzymes de leur catabolisme (arginase, alanine aminotransférase et sérine/thréonine déshydratase), deux adaptations en faveur d'une augmentation de la disponibilité de substrats néoglucogéniques (Fafournoux *et al.*, 1982; Moundras *et al.*, 1993). L'activité hépatique d'enzymes clés de la néoglucogenèse est également augmentée (PEPCK et F-1,6-BPase, par l'intermédiaire d'une activation de la fructose-2,6-biphosphatase et d'une inhibition de la phosphofructokinase-2) (Bois-Joyeux *et al.*, 1987; Baum *et al.*, 2006), bien que celle de la

glucose-6 phosphatase ne soit pas modifiée (Peret *et al.*, 1975). Ces adaptations s'accompagnent d'une augmentation de la néoglucogenèse chez des rats adaptés à un régime HP comparés à des rats adaptés à un régime NP (Kettelhut *et al.*, 1980), confirmée chez l'Homme (Linn *et al.*, 2000), mais leurs conséquences sur la PHG nette varient selon l'état nutritionnel et s'accompagnent de modifications du métabolisme du glycogène.

Le nombre de travaux évaluant la PHG chez des sujets adaptés à un régime HP est limité. La majorité des études disponibles indiquent que la consommation d'un régime HP induit une augmentation de la PHG à jeun. Chez le rat, plusieurs auteurs rapportent qu'à moyen terme (10 à 21 jours), la PHG et la glycémie à jeun sont légèrement plus importantes chez des animaux recevant un régime HP que chez ceux recevant un régime NP (Kettelhut *et al.*, 1980; Rossetti *et al.*, 1989; Baum *et al.*, 2006). Une étude réalisée chez l'Homme sain montre également qu'à long terme (6 mois), la consommation d'une alimentation riche en protéines induit une augmentation d'environ 10% de la production endogène de glucose à jeun (Linn *et al.*, 2000). Cependant, les données concernant les contributions respectives de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse à l'augmentation de la PHG à jeun ne sont pas unanimes. Les études chez le rat suggèrent que la consommation d'un régime HP induit une épargne du glycogène hépatique à jeun, puisque les concentrations hépatiques de glycogène à jeun sont plus élevées chez des rats adaptés à un régime HP que chez des rats adaptés à un régime NP (Kettelhut *et al.*, 1980; Baum *et al.*, 2006), tandis que les données obtenues chez l'homme suggèrent qu'une activation de la glycogénolyse contribuerait à l'augmentation de la PHG à jeun chez des sujets adaptés à un régime HP (Linn *et al.*, 2000).

On ne dispose pas de données chez l'Homme et de peu de données chez l'animal concernant la PHG à l'état nourri après adaptation à un régime HP. Une étude rapporte une différence de glycémie négative entre la veine porte et la veine hépatique en période postprandiale chez des rats adaptés à un régime HP ($-0{,}9 \pm 0{,}25$ vs $3{,}1 \pm 0{,}4$ $mmol.L^{-1}$ chez les rats HP et NP, respectivement) (Remesy *et al.*, 1978), mais le régime HP utilisé était complètement dépourvu de glucides, une condition peu nutritionnelle pouvant influencer les résultats obtenus. En revanche, deux études réalisées chez le rat suggèrent qu'à l'état nourri, la PHG ne diffère pas selon la teneur en protéines de l'alimentation (Kettelhut *et al.*, 1980; Baum *et al.*, 2006), un résultat qui pourrait s'expliquer en partie par une moindre activation de la synthèse de glycogène postprandiale chez des rats adaptés à un régime HP comparés aux rats recevant une alimentation NP (Kettelhut *et al.*, 1980; Baum *et al.*, 2006).

2. ACIDES AMINES, PROTEINES ALIMENTAIRES ET FONCTION ENDOCRINE PANCREATIQUE.

2.1. Mise en évidence d'un effet insulino-sécréteur des acides aminés

Des études anciennes de perfusions intraveineuses de solutions d'acides aminés chez l'Homme ou l'animal suggèrent que la plupart des acides aminés activent la sécrétion d'insuline et de glucagon (Floyd *et al.*, 1966b; Rocha *et al.*, 1972). La sécrétion d'insuline serait particulièrement sensible à la présence d'arginine, d'aspartate, d'isoleucine, de leucine, de lysine, de phénylalanine et de tryptophane, tandis que la sécrétion de glucagon serait plus activée par l'asparagine, l'aspartate, la glycine, la phénylalanine, la sérine et le tryptophane. Si l'approche utilisée dans ces études présente l'avantage de permettre d'évaluer l'effet individuel de chaque acide aminé sur l'activité endocrine pancréatique *in vivo*, les conditions expérimentales sont peu représentatives des conditions physiologiques. Ainsi, les doses utilisées sont toujours supérieures aux concentrations plasmatiques postprandiales normales, et la perfusion intraveineuse ne permet pas de prendre en compte l'effet du premier passage intestinal et de la cinétique postprandiale de mise à disposition des acides aminés, qui jouent un rôle important dans leur effet insulino-sécréteur (van der Meulen *et al.*, 1997).

En dépit de toutes ces limitations, les résultats de ces études de perfusion ont été en partie confirmés par ceux de travaux comparant les concentrations postprandiales d'insuline et de glucagon en réponse à l'ingestion de diverses sources protéiques (protéines totales de lait, protéines de lactosérum, protéines de pois, protéines de morue, protéines de soja) (Fig. 29) chez l'Homme. Dans ces études, la sécrétion postprandiale d'insuline était significativement corrélée aux excursions plasmatiques postprandiales d'arginine et de lysine (acides aminés à chaîne latérale positivement chargée), de leucine, d'isoleucine et de valine (AAR), de phénylalanine et de tyrosine (acides aminés aromatiques), de thréonine et de proline (van Loon *et al.*, 2000; Calbet *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2004; Manders *et al.*, 2005). Ces études ont notamment mis en évidence le fort effet insulinotrope des protéines de lactosérum, riches en AAR et en thréonine. La sécrétion postprandiale de glucagon était corrélée aux excursions postprandiales de tyrosine et de méthionine (Calbet *et al.*, 2002) (Fig. 30).

2.2. Rappels sur les mécanismes de sécrétion d'insuline

L'insuline est sécrétée au cours de la phase postprandiale par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques. Les mécanismes de sa sécrétion, biphasique et pulsatile, sont aujourd'hui bien documentés (Fig. 31). L'entrée du glucose dans la cellule β, par un transport passif impliquant les transporteurs GLUT2, stimule la sécrétion d'insuline par deux voies de transduction distinctes qui requièrent son métabolisme. La première, appelée également voie dépendante des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}), est associée à la phase de sécrétion précoce et transitoire. L'augmentation du rapport ATP/ADP intracellulaire liée à l'oxydation du glucose entraîne la fermeture des $K_{ATP,}$ l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants et une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ qui amorce l'exocytose des granules d'insuline stockés dans la cellule (Rorsman *et al.*, 2003). La seconde, appelée voie indépendante des K_{ATP}, est associée à l'amplification et au maintien de la sécrétion d'insuline, ainsi qu'à l'activation de la synthèse de novo de l'insuline (Aizawa *et al.*, 1994). Plusieurs mécanismes possibles ont été proposés, faisant intervenir des facteurs dérivés du métabolisme du glucose ou d'autres effecteurs comme l'AMP-cyclique ou le GMP-cyclique, qui modulent l'entrée de calcium dans la cellule (Maechler *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 2002). Au cours de cette phase, les oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ sont directement responsables du caractère pulsatile de la sécrétion d'insuline (Gilon *et al.*, 2002).
Les mécanismes de la sécrétion de glucagon sont proches de ceux de la sécrétion d'insuline et requièrent le métabolisme du glucose et la fermeture des K_{ATP}. Dans la cellule α, les K_{ATP} seraient 5 fois plus sensibles à l'inhibition exercée par l'ATP que dans la cellule β, autorisant une sécrétion de glucagon dans des conditions d'hypo- et de normoglycémie (Leung *et al.*, 2006). La sécrétion de glucagon par les cellules α en période post-absorptive est directement liée à la levée de l'inhibition exercée sur elle par le glucose et surtout par l'insuline, qui activerait l'ouverture des K_{ATP} de la cellule β par voie paracrine (Ishihara *et al.*, 2003).

2.3. Modes d'actions des acides aminés sur la sécrétion d'insuline.

Des travaux d'électrophysiologie réalisés sur des îlots pancréatiques isolés exposés à différentes concentrations de glucose et d'acides aminés ont permis de mettre en évidence et de caractériser l'effet des acides aminés sur l'activité électrique de la cellule β. Celle-ci n'est

pas détectable lorsque les cellules sont incubées dans 5 mmol.L^{-1} de glucose, mais l'ajout d'une solution d'acides aminés en concentrations physiologiques induit une faible oscillation du potentiel membranaire des cellules, ce qui suggère que les acides aminés pourraient initier la sécrétion d'insuline (Bolea *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 1999) (Fig. 32). Pour des concentrations de glucose croissantes, on observe que la présence d'acides aminés augmente la sensibilité des cellules β au glucose, ce qui se traduit par une diminution du seuil de concentration de glucose nécessaire au déclenchement de la sécrétion d'insuline (Bolea *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2006) (Fig. 32 B). De plus, les acides aminés augmentent la fréquence et l'amplitude des oscillations du potentiel membranaire de la cellule β en réponse au glucose, de façon non-linéaire, ce qui suggère que les acides aminés potentialisent l'effet insulino-sécréteur du glucose (Bolea *et al.*, 1997) (Fig. 32 A). Selon les conditions expérimentales, ils peuvent induire à la fois la phase précoce de sécrétion d'insuline, dépendante des canaux K_{ATP}, et la phase tardive indépendante des canaux K_{ATP} (Liu *et al.*, 2003). Différents mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'activité modulatrice des acides aminés sur le potentiel membranaire des cellules β (Fig. 33).

2.3.1. Le transport électrogénique des acides aminés

Le transport électrogénique de certains acides aminés est le premier mécanisme d'induction de la sécrétion d'insuline par les acides aminés à avoir été mis en évidence (Weinhaus *et al.*, 1995). L'entrée dans la cellule d'acides aminés à chaîne latérale positivement chargée, comme l'arginine ou la lysine, par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques exprimés dans les cellules α et β du pancréas (Smith *et al.*, 1997), modifie le potentiel membranaire et induit une dépolarisation dose-dépendante, qui stimule l'entrée de calcium dans la cellule et module directement la sécrétion d'insuline en présence de glucose (Blachier *et al.*, 1989; Sener *et al.*, 2000). L'entrée de certains acides aminés neutres, tels que l'alanine, par le biais d'un co-transport sodium-dépendant, induit également une dépolarisation qui active la sécrétion d'insuline de la même manière que les acides aminés à chaîne latérale positivement chargée (Hellman *et al.*, 1971). Dans ces deux cas, le mécanisme impliqué est peu spécifique, une réponse sécrétoire pouvant être obtenue avec des analogues non métabolisables d'acides aminés empruntant les mêmes transporteurs, tels que l'homoarginine dans le cas des acides aminés cationiques, ou l'acide amino-isobutyrique pour les acides aminés neutres (Blachier *et al.*, 1989).

2.3.2. Le métabolisme intracellulaire des acides aminés

Sur des îlots pancréatiques isolés exposés à une concentration de glucose de 5 mmol.L^{-1}, la leucine, l'alanine et l'isoleucine induisent de lentes oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$, incompatibles avec la dépolarisation résultant d'un transport électrogénique (Martin *et al.*, 1995; Bolea *et al.*, 1997). Dans certaines conditions expérimentales, ces oscillations de $[Ca^{2+}]_i$ sont associées à des oscillations parallèles de la sécrétion d'insuline (Sener *et al.*, 2002).

Plusieurs indices expérimentaux suggèrent que ces observations pourraient être liées à l'utilisation de ces acides aminés comme substrat énergétique par les cellules pancréatiques. La leucine augmente la consommation d'oxygène d'îlots pancréatiques isolés et leur contenu intracellulaire en produits du métabolisme de la leucine (NH_4^+, 2-cétoisocaproate, acétoacétate, CO_2), en NADH et en ATP (Malaisse *et al.*, 1980). En présence d'inhibiteurs du métabolisme de l'alanine, son effet insulino-sécréteur est partiellement inhibé, ce qui indique que son métabolisme intracellulaire participe à l'activation de la sécrétion d'insuline (Brennan *et al.*, 2003). La cellule β présente en effet la particularité de pouvoir utiliser de nombreux acides aminés comme source d'énergie (Newsholme *et al.*, 2005). L'oxydation des acides aminés à des fins énergétiques implique la production de métabolites intermédiaires, qui rejoignent le cycle des acides tricarboxyliques et induisent une augmentation du contenu cellulaire d'ATP (Brennan *et al.*, 2003). Cette oxydation est souvent incomplète et conduit à la formation de glutamate, métabolite activateur de la phase d'amplification de la sécrétion d'insuline (Hoy *et al.*, 2002). Ils modulent ainsi les deux phases de sécrétion de l'insuline, activant l'ouverture des canaux K_{ATP} et contribuant aux oscillations de la $[Ca^{2+}]_i$ (Sener *et al.*, 2002).

Plusieurs études ont suggéré que le statut énergétique de la cellule β joue un rôle important dans ces effets. Lorsque le stock d'ATP est important ([glucose]>7,5 mmol.L^{-1}), les acides aminés contribuent à la sécrétion d'insuline par la voie indépendante des K_{ATP}, sans modifier les concentrations intracellulaires d'ADP et d'ATP (Gao *et al.*, 1999; Ronner *et al.*, 2001). En revanche, en situation de déplétion énergétique, le catabolisme des acides aminés provoque des modifications des concentrations intracellulaires d'ATP et d'ADP (Martin *et al.*, 1995; Ronner *et al.*, 2001; Sener *et al.*, 2002). La glutamate déshydrogénase (GDH) pourrait participer au sensing énergétique de la cellule β. Cette enzyme, qui catalyse le catabolisme du glutamate en α-kétoglutarate, est inhibée par l'ATP et le glucose, et activée par la leucine,

l'alanine et l'ADP. L'activation de la GDH par la leucine et l'alanine représente un second mécanisme par lesquels ces deux acides aminés pourraient activer la sécrétion d'insuline. Ils favoriseraient ainsi l'entrée du glutamate dans le cycle de l'acide tricarboxylique, aboutissant à la formation d'ATP, à l'entrée de calcium dans la cellule et à la sécrétion d'insuline (Brennan *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003) (Fig. 34) L'activation de la GDH et les effets qui en découlent peuvent être obtenus avec des analogues non métabolisables d'acides aminés, tel que l'acide 2-amino-2-norbornane-carboxylique, un analogue de la leucine (Gao *et al.*, 1999), ce qui montre qu'ils sont indépendants du métabolisme des acides aminés activateurs.

2.3.3. Effets indirects des protéines alimentaires sur la sécrétion d'insuline et de glucagon par l'intermédiaire des hormones incrétines

Au cours de la période postprandiale, la sécrétion intestinale d'hormones incrétines (le gastric inhibitory peptide (GIP), le glucagon like peptide-1 (GLP-1) et la cholécystokinine (CCK)) participe à la réponse initiale à l'ingestion du repas, dont le but est de préparer l'organisme à l'utilisation et au stockage des nutriments ingérés. Ces hormones stimulent la sécrétion d'insuline et/ou de glucagon par l'intermédiaire de l'activation de l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (Gromada *et al.*, 2004; Gautier *et al.*, 2005; Drucker, 2006).

Les protéines alimentaires influencent la sécrétion intestinale postprandiale des hormones incrétines. L'ingestion d'un repas HP induit une augmentation des concentrations plasmatiques de GIP, GLP1 et CCK, plus importante que celle mesurée en réponse à l'ingestion d'un repas NP (Blom *et al.*, 2006) ou une perfusion intraveineuse ou intraduodénale d'acides aminés (Ohneda *et al.*, 1968; Fieseler *et al.*, 1995) (Fig. 35) La stimulation de la sécrétion de ces hormones par les protéines impliquerait une dépolarisation membranaire des cellules intestinales, induite par le transport électrogénique de certains acides aminés, notamment la glutamine, ou une stimulation de l'ouverture de canaux ioniques en réponse à des acides aminés tels que l'alanine, la glycine et la sérine, conduisant à l'exocytose de granules de GLP-1, GIP ou CCK par les cellules entéro-endocrines (Gameiro *et al.*, 2005). L'effet des protéines alimentaires sur la sécrétion d'incrétines serait dépendant de leur composition en acides aminés et de leur digestibilité. Cet aspect est mis en évidence par les études ayant comparé les excursions postprandiales d'incrétines en réponse à des repas contenant diverses sources protéiques (Hall *et al.*, 2003; Frid *et al.*, 2005). Ces études ont confirmé l'important effet insulinotrope des protéines de lactosérum, comparées aux caséines,

aux protéines de morue ou de viande de porc, par l'intermédiaire d'une sécrétion postprandiale accrue de GIP et de GLP-1.

2.4. Effet des protéines alimentaires sur la sécrétion d'insuline

2.4.1. Effets aigus de l'ingestion d'un repas protéique sur la sécrétion d'insuline

Chez le sujet sain, l'ingestion de protéines seules ne stimule que modestement la sécrétion d'insuline tandis-qu'elle active fortement la sécrétion de glucagon (Gaudichon *et al.*, 1999; Brand-Miller *et al.*, 2000). Cependant, lors de l'ingestion d'un repas mixte, plusieurs études ont montré un effet synergique entre les protéines et les glucides sur l'insulino-sécrétion, suggérant que les acides aminés potentialisent l'effet insulino-sécréteur des glucides (Floyd *et al.*, 1966a; Nuttall *et al.*, 1984; Gannon *et al.*, 1992).

La sécrétion postprandiale d'insuline et de glucagon en réponse à l'ingestion de protéines est influencée par la vitesse et l'amplitude de l'apparition plasmatique des acides aminés (van Loon *et al.*, 2000; Calbet *et al.*, 2002). Celles-ci sont déterminées par la digestibilité de la protéine ingérée, sa composition en acides aminés, ainsi que par les autres constituants du repas (Rerat *et al.*, 1992; Bos *et al.*, 2003). Ainsi, l'ingestion d'un hydrolysat de protéines de lactosérum, très digestibles et mises à disposition rapidement, induit une sécrétion d'insuline plus importante que l'ingestion d'un hydrolysat de protéines de pois (van Loon *et al.*, 2000).

Chez des sujets présentant des anomalies de la sécrétion d'insuline - obèses insulino-résistants et diabétiques de type II, l'effet insulino-sécréteur des protéines alimentaires serait quantitativement plus important que chez le sujet sain (Nuttall *et al.*, 1991) et contribuerait à améliorer la régulation de la glycémie postprandiale (Manders *et al.*, 2005).

2.4.2. Effets d'une alimentation hyperprotéique sur la sécrétion d'insuline

On dispose de peu de données sur les conséquences d'une alimentation HP à moyen ou long terme sur la fonction endocrine pancréatique.

Les études réalisées chez l'Homme et l'animal rapportent unanimement que la consommation d'un régime HP est associée à une réduction de l'insulinémie postprandiale (Harber *et al.*,

2005; Baum *et al.*, 2006) - ce qui s'expliquerait par l'augmentation du rapport protéines/glucides du régime et le moindre effet sécrétagogue des protéines par rapport aux glucides vis-à-vis de l'insuline (Parks, 2002) – ainsi qu'à une augmentation de la glucagonémie postprandiale (Eisenstein *et al.*, 1979; Linn *et al.*, 2000), comparées à celles mesurées chez des sujets adaptés à un régime NP.
Par ailleurs, une étude montrant une corrélation positive entre la teneur en protéines de l'alimentation et la sécrétion d'insuline en réponse à une perfusion intraveineuse de glucose suggère qu'une alimentation HP augmente la capacité insulino-sécrétrice en réponse à une provocation au glucose (Linn *et al.*, 2000) (Fig. 36).

Les résultats obtenus chez le sujet insulino-résistant ou diabétique ne sont pas unanimes et les différences d'apport énergétique, de durée de traitement et de composition des régimes en macronutriments rendent difficile l'analyse comparée des données disponibles. Par ailleurs, il est souvent impossible de distinguer ce qui relève d'un effet direct des protéines sur la sécrétion d'insuline de ce qui résulte d'une adaptation de cette sécrétion à des variations de l'insulino-sensibilité périphérique.
Plusieurs travaux suggèrent qu'à moyen terme, l'augmentation de l'apport protéique ne modifie pas l'insulinémie postprandiale chez l'insulino-résistant ou le diabétique de type II. Ainsi, Gannon *et al.* rapportent que la consommation d'une alimentation HP normo-énergétique pendant 5 semaines ne modifie pas l'insulinémie cumulée sur 24 heures et augmente significativement la glucagonémie chez des diabétiques de type II (Gannon *et al.*, 2003). D'autres études réalisées chez des sujets obèses hyperinsulinémiques placés dans un contexte de restriction énergétique et recevant une alimentation HP ou NP montrent que l'insulinémie postprandiale diminue indépendamment de la teneur en protéines du régime (Moran *et al.*, 2005). En revanche, chez des femmes hyperinsulinémiques en surpoids, la consommation pendant 10 semaines d'un régime hypoénergétique HP induit une diminution de l'insulinémie postprandiale significativement plus importante que celle mesurée après la consommation d'un régime isoénergétique NP (Layman *et al.*, 2003). Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez des sujets diabétiques de type 2 soumis pendant 5 semaines à un régime normo-énergétique HP hyperlipidique (Gannon *et al.*, 2004), où l'apport glucidique ne représentait que 20% de l'apport énergétique total. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la teneur en glucides de l'alimentation est le déterminant des modifications de l'insulinémie postprandiale.

En ce qui concerne le diabète de type I, les résultats obtenus chez l'Homme ou l'animal sont contradictoires. Les modèles animaux d'induction de diabète de type I suggèrent qu'une alimentation HP limite la dégradation de la fonction insulino-sécrétrice (Schneider *et al.*, 1996; Karabatas *et al.*, 2000). Une étude chez l'Homme suggère à l'inverse qu'une alimentation HP l'altèrerait en accélérant la perte du capital sécrétoire des cellules β (Linn *et al.*, 1996). Les conséquences de la consommation d'un régime HP sur la sécrétion d'insuline chez des sujets insulino-résistants ou diabétiques restent donc à établir.

3. ACIDES AMINES, PROTEINES ALIMENTAIRES, CAPTATION PERIPHERIQUE DE GLUCOSE ET SENSIBILITE A L'INSULINE.

3.1. Mise en évidence d'un effet des acides aminés sur la sensibilité à l'insuline *in vivo*

Les expériences de clamp euglycémique hyperinsulinémique couplé à une perfusion intraveineuse d'acides aminés ont permis d'évaluer chez l'Homme l'effet direct des acides aminés sur la sensibilité à l'insuline indépendamment de leur effet sur l'insulino-sécrétion. L'ensemble de ces études montre que la perfusion d'acides aminés provoque une nette diminution du débit de glucose perfusé nécessaire au maintien de l'euglycémie (Flakoll *et al.*, 1991; Pisters *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 2002). La plupart l'attribue à une réduction de l'insulino-sensibilité périphérique, l'utilisation de somatostatine et des techniques de dilution isotopique ayant montré que la PHG n'était pas modifiée par la perfusion d'acides aminés en condition d'hyperinsulinémie. Ces études sont en faveur d'un effet des acides aminés en amont de l'entrée du glucose dans la cellule (Krebs *et al.*, 2002). De plus, plusieurs auteurs suggèrent que certains acides aminés seraient plus susceptibles que d'autres de jouer un rôle dans l'induction de cette IR périphérique. Ainsi, de part leur utilisation privilégiée au niveau musculaire, les AAR seraient de bons candidats pour expliquer l'IR périphérique en réponse à une perfusion d'acides aminés (Pisters *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 2002). Cependant, aucune de ces études n'apporte de démonstration directe de cette hypothèse.

Si ces expériences de clamp euglycémique hyperinsulinémique apportent des informations importantes quant à l'influence des acides aminés sur l'insulino-sensibilité, leur traduction

nutritionnelle est limitée. L'insulinémie imposée dans les expériences de clamp est extrêmement élevée par rapport à celle observée en condition postprandiale, même après consommation d'un repas riche en glucides. Par ailleurs, l'administration des acides aminés par voie intraveineuse supprime le premier passage intestinal et hépatique qui a lieu après ingestion orale de protéines. Or le métabolisme splanchnique affecte fortement l'équilibre des concentrations en acides aminés, du fait de l'utilisation importante par le foie et l'intestin de certains acides aminés.

D'autres études réalisées chez l'Homme sain ont exploré l'effet des acides aminés sur l'insulino-sensibilité périphérique en utilisant une approche plus simple et nutritionnellement plus pertinente, basée sur le suivi des glycémie, amino-acidémie, insulinémie et glucagonémie en réponse à une charge orale d'acides aminés et de glucose. Ces études suggèrent, à l'inverse des études de clamp, un effet bénéfique de certains acides aminés sur la captation périphérique du glucose. Ainsi, l'ingestion simultanée de glucose et de proline, de glycine ou d'arginine améliore la tolérance orale au glucose sans modifier la réponse insulino-sécrétrice, suggérant une modification de l'utilisation périphérique du glucose (Gannon *et al.*, 2002a; Gannon *et al.*, 2002b; Nuttall *et al.*, 2004).

3.2. Mécanismes de la modulation du transport de glucose par les acides aminés

3.2.1. Acides aminés et voie de signalisation de l'insuline

La protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) est une cible de la PI 3-kinase. Son activation module l'activité d'effecteurs proximaux dont les plus connus sont la p70 S6 kinase et 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1), impliqués dans l'initiation de la synthèse protéique (Hara *et al.*, 2002). La voie de signalisation de mTOR intègre des stimuli hormonaux (notamment l'insuline) et nutritionnels. Les acides aminés en sont d'importants modulateurs : *in vitro*, ils induisent l'activation de la p70 S6 kinase et de 4E-BP1 en l'absence d'insuline, une réponse qui peut être prévenue par un inhibiteur spécifique de mTOR, la rapamycine (Hara *et al.*, 1998). Plusieurs mécanismes d'activation de la voie de signalisation de mTOR par les acides aminés sont envisagés, dépendants ou non de l'activation de la PI 3-kinase (Patti *et al.*, 1998; Hinault *et al.*, 2004), et qui pourraient faire

intervenir l'aminoacylation des ARN de transfert par les acides aminés (Iiboshi *et al.*, 1999) (Fig. 37).

L'activation de mTOR semble participer au mécanisme de rétroinhibition physiologique de la voie de signalisation de l'insuline, puisque l'activation de la phosphorylation des résidus sérines des protéines IRS1 et de leur dégradation par le protéasome en réponse à une stimulation prolongée à l'insuline est inhibée par la rapamycine dans des cultures d'adipocytes ou de myocytes (Li *et al.*, 1999; Haruta *et al.*, 2000). Plusieurs études suggèrent que les acides aminés inhibent le transport de glucose induit par l'insuline par l'intermédiaire de leur interaction avec la voie de signalisation de mTOR. La co-incubation d'hépatocytes avec de l'insuline, du glucose et un mélange d'acides aminés inhibe le transport de glucose (Traxinger *et al.*, 1989; Patti *et al.*, 1998). En présence de rapamycine, l'inhibition par les acides aminés de l'entrée de glucose est levée (Patti *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 2001). L'étude des mécanismes associés à ces observations a suggéré que l'activation de mTOR par les acides aminés amplifie la dégradation des protéines IRS par le protéasome (Takano *et al.*, 2001) et la diminution de la phosphorylation d'IRS1 sur ses résidus tyrosine, en favorisant à l'inverse sa phosphorylation sur les résidus sérine (Tremblay *et al.*, 2001). Ces résultats, obtenus dans un contexte d'hyperinsulinémie prolongée (de 30 min à 6 h), suggèrent que les acides aminés participent à la désensibilisation de la voie de transduction menant au transport de glucose. Cette hypothèse est confirmée par l'observation qu'une exposition de courte durée de cellules musculaires à un excès d'acides aminés ne perturbe pas le transport de glucose stimulé par l'insuline, tandis-qu'à partir de 20 min d'exposition, la captation de glucose diminue progressivement (Tremblay *et al.*, 2001) (Fig. 38).

Une étude récente réalisée chez l'Homme suggère que ces mécanismes pourraient expliquer l'IR induite par les acides aminés lors des expériences de clamp euglycémique hyperinsulinémique (Tremblay *et al.*, 2005). Dans cette étude, l'activation de mTOR et de ses effecteurs par les acides aminés perfusés au cours du clamp s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation des protéines IRS sur leurs résidus sérine et d'une diminution de l'activation de la PI 3-kinase. Toutefois, l'activation de la PKB n'est pas réduite chez les sujets recevant la perfusion d'acides aminés, un résultat déjà observé lors d'une expérience de perfusion de leucine chez l'Homme (Greiwe *et al.*, 2001), et qui confirme qu'une activation partielle des PI 3-kinases est suffisante pour une activation totale de la PKB (Tremblay *et al.*, 2001). Une étude réalisée chez le rat a confirmé que l'ingestion d'une dose nutritionnelle de leucine inhibait significativement l'activation de la PI 3-kinase en réponse à une charge de glucose, mais cette inhibition ne se répercutait pas sur le transport

de glucose et la tolérance orale au glucose (Baum *et al.*, 2005) (Fig. 39). Ces données suggèrent que dans un contexte nutritionnel, l'effet désensibilisateur de la voie de signalisation de l'insuline exercé par les acides aminés a peu d'impact négatif sur l'utilisation du glucose en réponse à l'insuline.

Certains travaux suggèrent à l'inverse l'existence de voies, dépendantes ou non de l'activation de mTOR ou de la PI 3-kinase, par lesquelles les acides aminés pourraient favoriser le transport de glucose. Sur des adipocytes isolés incubés en présence d'un inhibiteur de la PI 3-kinase, les acides aminés restaurent l'activation de la PKB et le transport de glucose induits par l'insuline (Hinault *et al.*, 2004) et sur des adipocytes isolés de rats insulino-résistants, ils améliorent le transport de glucose (Hinault *et al.*, 2006). D'autres études ont mis en évidence que la leucine et l'isoleucine peuvent activer la PKB et le transport de glucose sur muscle isolé de rat par un mécanisme indépendant de mTOR, dépendant de la PI 3-kinase, et qui ferait intervenir l'activation de la PKC et l'inhibition de l'AMP kinase par les acides aminés (Nishitani *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 2003; Doi *et al.*, 2005) (Fig. 40). Ces mécanismes seraient responsables de la diminution de l'excursion glycémique observée en réponse à l'ingestion d'isoleucine 30 minutes avant une charge orale de glucose (Doi *et al.*, 2003).

3.2.2. Acides aminés et utilisation métabolique du glucose

L'utilisation intracellulaire du glucose contribue à la captation du glucose par les tissus périphériques au cours de la période postprandiale, puisqu'elle permet le maintien d'un gradient de glucose nécessaire à son entrée dans la cellule (Randle *et al.*, 1963; Shulman, 2000). Plusieurs auteurs ont exploré l'influence des acides aminés sur l'oxydation du glucose et son stockage sous forme de glycogène. Bien que les résultats obtenus diffèrent en fonction des conditions expérimentales, des modèles utilisés et des acides aminés étudiés, les données obtenues chez l'Homme dans des conditions physiologiques suggèrent que l'influence des acides aminés sur le métabolisme intracellulaire du glucose a un impact négligeable sur la captation de glucose au cours de la phase postprandiale.

Sur muscle isolé incubé en l'absence d'insuline, les AAR inhiberaient l'oxydation du glucose et du pyruvate par l'intermédiaire d'une inhibition de la pyruvate déshydrogénase (Chang *et*

al., 1978) (Fig. 41) qui requiérerait le métabolisme préalable des AAR en cétoacide (Walajtys-Rode *et al.*, 1980). La corrélation inverse observée entre l'oxydation du pyruvate et celle des AAR suggère l'existence d'une compétition entre les acides aminés et le glucose comme substrat énergétique de la cellule (Buse *et al.*, 1972; Wagenmakers, 1998). Mis en évidence sur des tissus prélevés sur des animaux à jeun, et indépendant de la présence d'insuline, ce mécanisme pourrait être associé à un mécanisme d'épargne du glucose. Il s'accompagne d'une augmentation de libération de lactate et de pyruvate et favorise ainsi la néoglucogenèse (Chang *et al.*, 1978).

L'effet inhibiteur des acides aminés sur la captation de glucose par un mécanisme de compétition de substrat énergétique a été également suggéré *in vivo* lors d'expériences de perfusions intraveineuses d'acides aminés et de glucose chez le chien (Ferrannini *et al.*, 1988) et chez l'Homme (Schwenk *et al.*, 1987) à jeun. De nouveau, dans ces études, l'effet inhibiteur des acides aminés sur l'oxydation du glucose est mis en évidence dans des conditions de jeûne et en l'absence d'insuline, et son existence au cours de la phase postprandiale n'est pas démontrée.

En présence d'insuline, une étude de clamp euglycémique hyperinsulinémique réalisée chez l'Homme à jeun depuis 4 jours suggère qu'une perfusion d'acides aminés induit une diminution du taux d'oxydation du glucose et de son stockage (Flakoll *et al.*, 1992), mais ces résultats n'ont pas été confirmés après un jeûne plus court (12 heures) (Tappy *et al.*, 1992). L'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique, méthode qui permet une mesure des concentrations de métabolites intracellulaires (glucose, trioses phosphates, glycogène etc..) *in vivo* de façon non invasive, a également infirmé l'hypothèse de l'inhibition de l'oxydation du glucose par les acides aminés en présence d'insuline (Krebs *et al.*, 2002). Cependant, cette étude suggère que les acides aminés inhibent la synthèse de glycogène, puisque celle-ci était de de 64% moins importante chez les sujets recevant une perfusion d'acides aminés comparés aux sujets recevant une perfusion de sérum physiologique, tandis que l'entrée de glucose ne l'était que de 25 %.

D'autres travaux suggèrent à l'inverse que certains acides aminés activent le métabolisme intracellulaire du glucose et son stockage.

Une perfusion de glutamine chez le chien augmente l'oxydation du glucose et cet effet est associé à une augmentation de la sensibilité à l'insuline, mesurée lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (Borel *et al.*, 1998). L'effet de la glutamine a été confirmé chez l'Homme. L'ingestion d'un repas supplémenté en glutamine induit une augmentation de

l'utilisation du glucose et de l'oxydation des glucides au cours de la phase postprandiale chez le sujet sain au repos, ainsi-que lors d'un exercice et en période post-exercice (Iwashita *et al.*, 2006).

Par ailleurs, certains auteurs rapportent que les AAR activent la synthèse de glycogène musculaire, ce qui pourrait favoriser la captation de glucose par le muscle. Sur des cultures de cellules musculaires, les acides aminés stimulent la synthèse de glycogène, en inactivant de façon transitoire un inhibiteur de la glycogène synthase, la glycogène synthase kinase 3, par l'intermédiaire d'une voie de signalisation dépendante de l'activation de mTOR et de la PI 3-kinase (Peyrollier *et al.*, 2000; Armstrong *et al.*, 2001) (Fig. 42). Cependant, une administration d'acides aminés par perfusion intraveineuse ou par voie orale chez l'Homme ne modifie pas l'état d'activation de la glycogène synthase kinase 3 et ne modifie pas l'activité de la glycogène synthase (Liu *et al.*, 2004; Blomstrand *et al.*, 2006).

3.2.3. Acides aminés et microcirculation périphérique

Le rôle du NO dans l'activation de la microcirculation et de la perfusion musculaire est bien établi. L'arginine, acide aminé précurseur de ce médiateur, pourrait par son intermédiaire favoriser l'utilisation périphérique du glucose au cours de la phase postprandiale, en réponse à l'insuline. Plusieurs études ont exploré cet aspect chez l'Homme ou l'animal, en utilisant cependant le plus souvent des doses d'arginine 2 à 16 fois supérieures à l'apport moyen en arginine chez l'Homme (90 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$. L'utilisation de doses supra-nutritionnelles limite la signification des effets observés dans certaines de ces études.

Dans l'ensemble, les données obtenues chez le sujet sain suggèrent qu'une augmentation aiguë ou chronique de l'apport en arginine ne modifie pas la fonction endothéliale et la captation périphérique de glucose. Si une amélioration de la tolérance orale au glucose en réponse à l'ingestion d'une dose de 174 $mg.kg^{-1}$ d'arginine chez des sujets sains a été rapportée dans une étude (Gannon *et al.*, 2002b), ce résultat n'a pas été retrouvé dans une seconde expérience utilisant la même dose d'arginine et explorant la fonction endothéliale et la régulation de la glycémie (glycémie, insulinémie et taux d'oxydation du glucose) en réponse à une l'ingestion de glucides à fort index glycémique(Robinson *et al.*, 2003). A moyen terme, l'augmentation de l'apport en arginine chez le rat sain (125 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ pendant 8 semaines) ne modifie pas la fonction endothéliale et la sensibilité à l'insuline (Tay *et al.*, 2002). A dose supra-physiologique (1,4 $g.kg^{-1}.j^{-1}$), un apport supplémentaire en arginine chez

le rat sain pendant 2 semaines induit une augmentation de la synthèse endothéliale de NO et une amélioration de la fonction endothéliale (Kohli *et al.*, 2004), mais ne modifie pas la sensibilité à l'insuline.

En revanche, plusieurs études indiquent que chez les sujets insulino-résistants ou diabétiques, un apport supplémentaire en arginine améliore la sensibilité à l'insuline. Chez le rat ou le hamster insulino-résistant, une supplémentation en arginine (entre 300 et 600 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$) améliore à moyen terme la fonction endothéliale, réduit l'IR, l'intolérance au glucose, l'insulinémie et la glycémie à jeun (Popov *et al.*, 2002; Tay *et al.*, 2002). L'effet bénéfique d'un apport supplémentaire en arginine sur la fonction endothéliale et la sensibilité à l'insuline a été confirmé chez l'Homme diabétique de type II (Piatti *et al.*, 2001) (Tab. 3). Dans cette étude, une supplémentation en arginine pendant 1 mois (150 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$) était associée à une augmentation du débit sanguin et de la captation de glucose lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique.

En conclusion, une augmentation de l'apport en arginine n'a pas d'effet sur la captation de glucose chez le sujet sain, tandis-qu'à dose élevée, elle l'augmente chez le sujet insulino-résistant.

3.3. Régimes hyperprotéiques et sensibilité à l'insuline

3.3.1. Effet d'une alimentation HP normo-énergétique sur la sensibilité à l'insuline

A l'heure actuelle, on dispose de très peu de données obtenues chez l'Homme concernant l'effet à moyen ou long terme d'une alimentation HP normo-énergétique sur l'insulino-sensibilité. Malgré quelques données contradictoires, la majorité des études suggère qu'une alimentation HP normo-énergétique améliore la sensibilité à l'insuline et favorise une meilleure régulation de la glycémie, notamment pendant la phase postprandiale.

Quelques études réalisées chez l'Homme et l'animal rapportent que la consommation d'un régime HP serait associée à une hyperinsulinémie à jeun, un indicateur de l'IR (Usami *et al.*, 1982; Rossetti *et al.*, 1989; Linn *et al.*, 2000). De plus, chez des sujets sains adaptés à la consommation d'un régime HP, le débit de glucose perfusé lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique est légèrement plus faible que chez des sujets adaptés à la consommation d'un régime NP, tandis que la production hépatique de glucose ne varie pas entre les groupes,

ce qui indique que les régimes HP induisent une IR périphérique (Linn *et al.*, 2000). Cependant, dans cette dernière étude l'apport en fibres des sujets adaptés à la consommation du régime NP est supérieur à celui des sujets consommant le régime HP, ce qui peut constituer un biais important dans l'interprétation des résultats. Une expérience de clamp euglycémique hyperinsulinémique réalisée chez des rats adaptés à la consommation d'un régime HP pendant dix jours suggère également qu'une alimentation HP induit une IR hépatique et périphérique : l'insuline semble avoir une moindre capacité à inhiber la PHG et à augmenter la captation du glucose par les tissus (Rossetti *et al.*, 1989). Selon les auteurs, la faible teneur en glucides des régimes HP et l'hypoinsulinémie qui en résulte, et non l'excès de protéines, serait à l'origine de la baisse de sensibilité périphérique à l'insuline. L'ensemble des études ayant montré une relation positive entre la consommation d'une alimentation hypoglucidique et l'IR sont en faveur de cette hypothèse (Bessesen, 2001).

Ces travaux sont toutefois contredits par d'autres observations, chez l'Homme sain et chez l'animal, ne mettant pas en évidence d'augmentation d'insulinémie à jeun après adaptation à une alimentation HP, ou montrant même une réduction de l'insulinémie à jeun (Pacy *et al.*, 1994; Forslund *et al.*, 2000; Lacroix *et al.*, 2004). Ainsi, l'étude de Lacroix *et al.* rapporte une amélioration de la tolérance orale au glucose et une réduction de l'insulinémie à jeun chez des rats consommant pendant 6 mois un régime HP par rapport à des animaux consommant un régime NP (Lacroix *et al.*, 2004).

La différence de temps d'adaptation à l'alimentation HP (dix jours vs. 6 mois) pourrait expliquer la divergence des résultats de Lacroix *et al.* et de ceux de Rossetti *et al.*, mentionnée précédemment. Dans cette dernière étude, aucune différence de composition corporelle n'a été rapportée entre les animaux recevant le régime NP et ceux recevant le régime HP, tandis que dans l'étude de Lacroix *et al.*, les animaux ayant reçu l'alimentation HP présentaient un ratio masse maigre/masse grasse significativement supérieur à celui des animaux alimentés avec le régime NP. Ce résultat pourrait s'expliquer à la fois par la réduction de l'ingéré énergétique, dû au fort pouvoir satiétogène des protéines (Bensaid *et al.*, 2002), par une augmentation de la thermogenèse postprandiale (Petzke *et al.*, 2005) et par une diminution de la lipogenèse résultant de la moindre consommation de glucides (Parks, 2002). Le tissu adipeux de type viscéral jouant un rôle important dans le développement de l'I - notamment au travers de la libération d'acides gras non estérifiés et de cytokines inflammatoires (Shulman, 2000; Schaffler *et al.*, 2005) -, son moindre développement chez les rats adaptés à un régime HP, tel rapporté par Lacroix *et al.*, pourrait expliquer une plus forte insulino-sensibilité chez ces animaux. Cette hypothèse est en accord avec les résultats

d'une étude ayant mis en évidence que l'augmentation de l'apport protéique limite le dépôt adipeux et le développement de l'IR chez des animaux alimentés avec un régime hyperlipidique (Klaus, 2005).

Par ailleurs, il a été montré que l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie postprandiales chez des sujets sains adaptés à une alimentation HP (1,8 $g.kg^{-1}.j^{-1}$) sont moins importantes que celles mesurées chez des sujets adaptés à une alimentation NP (0,7 $g.kg^{-1}.j^{-1}$) (Linn *et al.*, 2000), confirmant des observations précédentes réalisées chez l'animal (Blazquez *et al.*, 1970; Rossetti *et al.*, 1989) et suggérant que la consommation d'un régime HP améliore la gestion des excursions glycémiques postprandiales. La moindre teneur en glucides du régime HP expliquerait en grande partie ce résultat (Wolever, 2000) en limitant les challenges postprandiaux du système de régulation de la glycémie (Layman *et al.*, 2003).

De la même manière, deux études réalisées chez le sujet diabétique de type 2 suggèrent qu'une alimentation HP normo-énergétique améliore la sensibilité à l'insuline et induit une diminution du taux d'hémoglobine glyquée (Gannon *et al.*, 2003; Gannon *et al.*, 2004).

3.3.2. Effet d'une alimentation HP hypoénergétique sur la sensibilité à l'insuline

Si l'on ne dispose que de très peu d'études réalisées dans un contexte normo-énergétique, plusieurs travaux ont été réalisés chez des sujets insulino-résistants obèses ou diabétiques, afin d'évaluer l'effet de régimes HP hypoénergétiques sur la sensibilité à l'insuline et ainsi d'apprécier leur intérêt potentiel dans les cures d'amaigrissement et la prise en charge de l'IR. Les résultats de ces différentes études ne sont pas entièrement unanimes mais la majorité d'entre elles sont en faveur d'un effet favorable des régimes hypoénergétiques hyperprotéiques sur l'insulino-sensibilité.

Plusieurs études rapportent une amélioration de la sensibilité à l'insuline accompagnée d'une perte de poids significative, chez les sujets insulino-résistants ou obèses nourris avec un régime HP hypoénergétique comparés à des sujets recevant un régime NP hypoénergétique (Piatti *et al.*, 1994; Baba *et al.*, 1999; Skov *et al.*, 1999; Samaha *et al.*, 2003; Layman *et al.*, 2004) (Fig. 43). Plusieurs hypothèses ont été formulées quant aux mécanismes de l'amélioration de l'insulino-sensibilité observée chez ces sujets. Elle serait due à l'augmentation du ratio protéines/glucides, à l'origine d'une baisse de la glycémie et de l'insulinémie postprandiale. La perte de poids observée chez les sujets pourrait également y contribuer. Cette perte de poids est principalement due à la restriction énergétique, mais elle

est plus importante chez les sujets recevant le régime HP que chez ceux recevant le régime NP. L'augmentation du métabolisme de base et de la thermogenèse alimentaire, plus importante dans le cadre du régime HP (Baba *et al.*, 1999; Westerterp *et al.*, 1999; Brehm *et al.*, 2003; Samaha *et al.*, 2003), et la moindre prise alimentaire (Skov *et al.*, 1999), contribuent à cet effet. De plus, la perte de masse grasse est plus importante chez les sujets recevant l'alimentation HP, tandis que la masse maigre est préservée (Skov *et al.*, 1999; Layman *et al.*, 2004). Piatti *et al.* observent une augmentation des concentrations circulantes d'acides gras libres et une augmentation de l'oxydation des lipides chez les sujets recevant un régime NP, ce qui pourrait contribuer à une moindre amélioration de l'insulino-sensibilité. Selon ces auteurs, les régimes HP hypoénergétiques seraient donc favorables à l'amélioration de l'insulino-sensibilité des sujets diabétiques.

A l'inverse, d'autres auteurs n'observent aucune différence entre régimes NP et HP en terme de sensibilité à l'insuline et de perte de poids dans des conditions hypoénergétiques (Luscombe *et al.*, 2002; Parker *et al.*, 2002). D'après ces auteurs, les régimes HP et NP permettent tous deux une perte de poids similaire, une amélioration de la sensibilité à l'insuline et une baisse de la glycémie et de l'insulinémie à jeun. Tous ces bénéfices seraient attribuables à la restriction énergétique et non à la teneur des régimes en protéines ou en glucides. Il faut cependant remarquer que ces deux dernières études se distinguent des précédentes par des niveaux d'apport en protéines inférieurs (régime HP : 28% de l'énergie fournie sous forme de protéines contre 45% dans les études de Baba *et al.* et Piatti *et al.*), ou une restriction énergétique plus importante (apport énergétique de 6,5 $MJ.j^{-1}$ contre un apport de 7,1 $MJ.j^{-1}$, ou un apport ad libitum dans les études de Laymann *et al.* et Skov *et al.*, respectivement). Ces différences pourraient expliquer les divergences de résultats.

3.3.3. Effet de la qualité des protéines alimentaires sur l'insulino-sensibilité

Quelques auteurs ont mis en évidence chez l'animal une influence de la qualité des protéines alimentaires sur l'insulino-sensibilité.

Chez le rat rendu insulino-résistant par la consommation d'un régime hyperlipidique, la consommation d'un régime HP à base de protéines de lactosérum réduit la croissance pondérale, le développement du tissu adipeux de type viscéral et l'IR, tandis-qu'un régime HP à base de viande rouge ne modifie pas significativement ces paramètres (Belobrajdic *et*

al., 2004) (Tab. 4). Une autre étude suggère également que les protéines de lactosérum réduisent la lipogenèse par l'intermédiaire d'un effet inhibiteur de l'activité et/ou de l'expression d'enzymes de cette voie métabolique (Morifuji *et al.*, 2005). Les auteurs de ces études suggèrent que les AAR, dont les teneurs sont particulièrement importantes dans les protéines de lactosérum, modulent le métabolisme des acides gras, un mécanisme qui pourrait expliquer l'effet bénéfique des protéines de lactosérum sur l'insulino-sensibilité.

Les protéines de soja et les protéines de morue présenteraient également un intérêt spécifique dans la prévention de l'IR. Chez des rats recevant une alimentation HS pendant 3 semaines, autre modèle d'induction de l'IR, l'insulinémie à jeun est moins importante si le régime contient des protéines de soja ou des protéines de morue plutôt que des protéines de lait (Vahouny *et al.*, 1985; Lavigne *et al.*, 2000). Les animaux recevant les régimes HS à base de protéines de soja ou de morue présentent également une meilleure tolérance au glucose, une meilleure sensibilité à l'insuline périphérique et de moindres excursions glycémiques et insuliniques postprandiales que les animaux recevant les régimes à base de protéines de lait, sans que la source protéique n'influence la croissance pondérale (Lavigne *et al.*, 2000). Une augmentation de l'expression du récepteur à l'insuline au niveau hépatique et du tissu adipeux pourrait expliquer ces résultats (Iritani *et al.*, 1997). Les effets bénéfiques des protéines de morue dans la prévention de l'IR ont été confirmés sur d'autres modèles. Chez le rat recevant un régime hyperlipidique, la consommation de protéines de morue prévenait la diminution de l'association entre les protéines IRS et la PI 3-kinase, de l'activation de la PKB et de la translocation de GLUT4 en réponse à une stimulation à l'insuline (Lavigne *et al.*, 2001; Tremblay *et al.*, 2003) (Fig. 44). *In vitro*, la captation de glucose par des cellules musculaires en culture en réponse à l'insuline était plus importante lorsque ces cellules étaient incubées avec une solution d'acides aminés présentant le même profil que les protéines de morue que lorsque la solution d'acides aminés présentait le profil des protéines de soja ou de lait (Lavigne *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que les protéines de morue modulent l'action de l'insuline sur le transport de glucose par l'intermédiaire de l'action d'un ou de plusieurs acides aminés, mais les mécanismes sous-jacents restent à identifier. L'arginine, présente en quantité plus importante dans les protéines de morue et de soja que dans les protéines de lait, est un candidat pour expliquer ces effets, car l'effet bénéfique des protéines de soja sur l'insulinémie à jeun de rats recevant un régime HS peut être mimé par la supplémentation par de l'arginine d'un régime à base de caséines (Vahouny *et al.*, 1985).

Ces résultats confirment les effets bénéfiques des régimes HP dans la prévention de l'IR et suggèrent un rôle direct de la fraction protéique du régime dans ces effets. Cependant, à notre

connaissance, il n'existe pas de données obtenues chez l'Homme pour confirmer l'effet qualitatif de l'apport protéique sur l'insulino-sensibilité. De plus, l'identification des acides aminés candidats pouvant intervenir dans ces effets et des mécanismes associés n'est que partielle.

CONCLUSIONS ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX.

Malgré l'abondance des études expérimentales, cliniques et épidémiologiques ayant exploré les relations entre l'apport protéique et la régulation de la glycémie, il n'existe pas de consensus à l'heure actuelle quant à la nature et l'amplitude de l'effet des acides aminés et des protéines alimentaires sur l'homéostasie du glucose. Plusieurs résultats sont en faveur d'un effet bénéfique d'une augmentation de la fraction protéique de l'alimentation sur l'homéostasie du glucose, en particulier sur la fonction insulino-sécrétrice et la gestion des hyperglycémies postprandiales. A l'inverse, d'autres résultats suggèrent que les régimes hyperprotéiques augmentent la production endogène de glucose, favorisant ainsi l'hyperglycémie, et inhibent la voie de signalisation de l'insuline au niveau périphérique, mais l'existence de ces mécanismes in vivo dans des conditions physiologiques n'est pas établie.

Dans des situations physiopathologiques associées à l'IR, plusieurs études indiquent que l'augmentation de l'apport protéique améliore le contrôle glycémique. Dans ce contexte, l'importance de l'aspect qualitatif de l'apport protéique est de plus en plus considéré. Le rôle de la leucine a particulièrement été exploré, et plusieurs études suggèrent qu'elle favorise la captation de glucose par le muscle et le maintien de l'homéostasie du glucose par l'intermédiaire de sa participation au cycle alanine-glucose. Parmi les autres acides aminés candidats susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de l'homéostasie du glucose, la cystéine pourrait exercer une action favorable au contrôle glycémique en tant que précurseur du glutathion. C'est ce que suggèrent plusieurs arguments indirects, ayant mis en relation d'une part, l'apport alimentaire en cystéine et le statut en glutathion, et d'autre part le statut en glutathion et l'homéostasie du glucose. Cependant, la relation directe entre l'apport alimentaire en cystéine et la régulation de la glycémie n'est pas démontrée.

L'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'effet d'une augmentation de l'apport protéique, en particulier de l'apport en cystéine, sur l'homéostasie du glucose chez le rat. Nous avons exploré l'hypothèse selon laquelle un apport accru en cystéine pourrait améliorer le statut redox de l'organisme en favorisant la synthèse de glutathion et contribuer à une meilleure régulation de la glycémie.

Régimes hyperprotéiques, composition corporelle et régulation de la glycémie

Dans un premier temps, nous avons comparé les effets de la consommation à moyen terme d'un régime normoprotéique standard (14% de l'énergie fournie sous forme de protéines totales de lait, NP) et d'un régime hyperprotéique (55% de l'énergie fournie sous forme de protéines totales de lait, HP) sur la prise alimentaire, la composition corporelle et la régulation de la glycémie chez le rat sain. Il est établi que la consommation d'un régime hyperprotéique est associée à une réduction de 10% de la prise énergétique, comparée à la consommation d'un régime normoprotéique (Jean *et al.*, 2001), ce qui représente un biais important dans l'observation des effets du régime HP sur l'homéostasie du glucose. Nous avons donc également étudié un groupe de rats recevant le régime NP mais restreints à l'apport énergétique spontané des animaux HP (groupe NPr). Ce groupe de rats nous a permis d'évaluer l'effet direct d'une augmentation de l'apport protéique sur la régulation de la glycémie indépendamment de la diminution de l'apport énergétique.

L'amélioration de la régulation de la glycémie observée chez les rats adaptés à la consommation du régime HP était associée à une moindre adiposité et un rapport masse maigre/masse grasse plus important que chez les animaux NP, des facteurs qui modulent l'insulino-sensibilité. Bien que l'analyse statistique des résultats de cette première étude indiquait que la diminution spontanée de l'apport énergétique des rats HP était responsable des effets de ce régime sur la composition corporelle, la comparaison du groupe HP et du groupe NPr suggérait l'existence d'un effet des protéines sur la composition corporelle. Nous avons donc exploré l'effet de la qualité des protéines alimentaires sur la consommation alimentaire, la croissance pondérale et la composition corporelle.

Dans la deuxième partie de ce premier volet de nos travaux, nous avons comparé les effets de la consommation du régime HP et d'un régime hyperprotéique similaire où les protéines totales de lait étaient substituées par des protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine (HPL). Les protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine (αLAC) présentent une teneur en cystéine particulièrement élevée, environ 4 fois supérieure à celle des protéines totales de lait, et sont également riches en AAR. Nous avons comparé les effets de ces deux sources protéiques sur la prise alimentaire, la croissance pondérale et la composition corporelle.

Apport en cystéine, statut en glutathion et régulation de la glycémie

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets d'une augmentation spécifique de l'apport en cystéine sur le statut en glutathion et la régulation de la glycémie. Afin de faciliter la mise en évidence des effets de l'apport en cystéine, nous avons travaillé sur des animaux placés dans un contexte nutritionnel connu pour favoriser l'apparition rapide d'un stress oxydant (Busserolles *et al.*, 2002a), d'une intolérance au glucose et d'une IR chez le rat sédentaire (Melancon *et al.*, 2006), en utilisant le saccharose comme source exclusive de glucides. Dans ce modèle d'induction alimentaire de l'IR, les rats sont confrontés à des pics hyperglycémiques postprandiaux importants qui perturbent le statut redox.

Après avoir validé ce modèle d'induction de l'IR, nous avons évalué les conséquences à court et moyen terme d'une augmentation de l'apport en cystéine sur la régulation de la glycémie et le statut en glutathion dans un contexte normoprotéique (14 % de l'énergie fournie sous forme de protéines). Nous avons modulé l'apport en cystéine en utilisant comme source protéique des protéines totales de lait (HS_0) ou une source protéique naturellement riche en cystéine, l'αLAC (HSa). Le régime HSa fournissait environ 4,5 fois plus de cystéine que le régime témoin HS_0 (1,2 g vs. 5,5 g de cystéine par kg d'aliment). Pour valider le rôle d'une augmentation spécifique de l'apport en cystéine, nous avons également travaillé sur deux régimes similaires au régime standard (14% de l'énergie fournie sous forme de protéines totales de lait) supplémentés avec 5,8 (HS_1) ou 20 (HS_2) g de NAC, un donneur de cystéine, par kg d'aliment. Le régime HS_1 fournissait une dose équivalente en cystéine égale à celle du régime HSa et permettait d'apprécier le rôle spécifique de la cystéine en comparaison du régime HSa. Le régime HS_2, témoin positif des effets de la cystéine, fournissait 14 fois plus de cystéine que le régime témoin et permettait de préciser l'effet dose de l'apport en cystéine.

Dans notre troisième étude, nous nous sommes intéressés au statut en glutathion et à la régulation de la glycémie au cours de la période postprandiale, l'excursion glycémique postprandiale étant un critère pertinent pour évaluer l'importance de la provocation alimentaire et la capacité préventive du régime vis-à-vis des effets délétères du régime (Sies *et al.*, 2005). Les animaux étaient opérés après leur réception pour la mise en place d'un cathéter veineux. Ce cathéter était introduit par la veine jugulaire gauche, descendu au niveau de la veine cave et sa partie proximale fixée au niveau cranial où elle était sécurisée en place à l'aide d'un ciment, une technique qui permet des prélèvements de sang répétés, en quantité voulue sur animal vigile.

Afin de confirmer le rôle du glutathion dans l'effet de l'apport en cystéine sur la régulation de la glycémie, nous avons ensuite travaillé sur un modèle de rat déplété en glutathion, en utilisant un inhibiteur spécifique de la γ-GCS, le D,L-buthionine sulfoximine (BSO) (Griffith, 1999). Nous avons validé ce modèle et précisé les cinétiques d'évolution de l'activité enzymatique de la γ-GCS et des concentrations sanguines et hépatiques en glutathion total et oxydé suite à une administration sous-cutanée de 4 $mmol.kg^{-1}$ de BSO, dose suffisante pour inhiber la synthèse de glutathion à plus de 80% (Guarino *et al.*, 2003). Cette étude pilote nous a permis de déterminer que l'activité de la γ-GCS était minimale 1 heure après l'administration de BSO. Dans une quatrième étude, nous avons testé l'effet en aigu des régimes expérimentaux HS_0, HS_1, HS_2 et HSa sur le statut en glutathion et la régulation de la glycémie au cours de la période postprandiale chez des animaux traités au BSO.

Enfin, nous avons précisé l'effet des régimes expérimentaux sur la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline à moyen terme, en les comparant à un régime NP standard à base d'amidon. Nous avons précisé les mécanismes d'action de la cystéine sur l'état d'activation de la voie de signalisation de l'insuline en mesurant notamment le niveau de phosphorylation de la protéine IRS1 et de la protéine PKB (ou Akt) au niveau musculaire et hépatique. Dans cette étude, les différents paramètres biochimiques et fonctionnels associés à la régulation glycémique ont été mis en relation avec le statut redox vu au travers du statut en glutathion, exploré de façon approfondie.

Dans cette même étude, nous nous sommes également intéressés à l'impact du régime HS et d'un apport supplémentaire en cystéine sur la production endothéliale de NO, une fonction sensible au statut redox (Melancon *et al.*, 2006). Nous avons exploré les relations entre les variations d'insulino-sensibilité induites par notre modèle et les modulations de différents marqueurs de la production et de la biodisponibilité du NO.

TRAVAUX PERSONNELS

ARTICLE 1

The reduced energy intake of rats fed a high protein low carbohydrate diet explains the lower fat deposition but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. The Journal of Nutrition, 2006 Jul;136(7):1849-54.

Clémence Blouet, François Mariotti, Dalila Azzout-Marniche, Cécile Bos, Véronique Mathé, Daniel Tomé et Jean-François Huneau

Introduction et objectifs

Chez l'Homme, la consommation d'un régime hyperprotéique (HP) est associée à une diminution de la croissance pondérale, du dépôt adipeux, un maintien de la masse musculaire et une amélioration de la régulation de la glycémie (Baba *et al.*, 1999; Farnsworth *et al.*, 2003). Cependant, la plupart des études ayant exploré les effets métaboliques des régimes hyperprotéiques chez l'Homme ont été réalisées (1) chez des sujets obèses, insulino-résistants ou diabétiques et (2) dans un contexte de restriction énergétique importante, ce qui rend difficile l'analyse des contributions respectives des modifications de la composition en macronutriments du régime et de la restriction calorique.

Très peu d'études ont évalué les effets de régimes hyperprotéiques chez le sujet sain recevant un apport énergétique adéquat. Les études réalisées chez le rat sain nourri ad libitum confirment l'amélioration de la composition corporelle et de la régulation glycémique en réponse à la consommation d'un régime hyperprotéique (Lacroix *et al.*, 2004). Cependant, dans ces modèles, la consommation d'un régime hyperprotéique induit une réduction spontanée de la prise énergétique (Jean *et al.*, 2001), dont l'impact sur les résultats relatifs à la régulation glycémique n'a pas été évalué à ce jour.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer les bénéfices métaboliques associés à la consommation d'un régime hyperprotéique. La consommation de protéines serait associée à une thermogenèse postprandiale et un effet satiétogène plus importants que ceux observés en réponse à l'ingestion des autres macronutriments (Westerterp *et al.*, 1999; Boden *et al.*, 2005). Une étude récente a mis en évidence une corrélation positive significative entre le niveau de l'apport protéique et les quantités d'ARN messagers des protéines UCP (protéines découplantes de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, qui diminuent le potentiel membranaire de la mitochondrie) dans le foie et le tissu adipeux brun chez le rat (Petzke *et*

al., 2005). L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un effet direct des protéines sur la diminution de la prise alimentaire et de la croissance pondérale. Cependant, les mécanismes pouvant expliquer une amélioration de la régulation de la glycémie en réponse à une augmentation de l'apport protéique ne sont pas établis. Si plusieurs études suggèrent un rôle direct des protéines dans les mécanismes de la régulation glycémique - notamment celles ayant mis en évidence l'effet particulier de certaines protéines sur l'insulino-sensibilité, comme les protéines de morue ou les protéines de lactosérum (Tremblay *et al.*, 2003; Belobrajdic *et al.*, 2004) -, des données obtenues chez l'Homme dans le cadre de perfusions d'acides aminés couplées à un clamp euglycémique hyperinsulinémique suggèrent au contraire que les acides aminés inhibent la captation de glucose périphérique.

Dans cette étude, nous avons exploré chez le rat sain les effets de l'augmentation de la fraction protéique de l'alimentation sur la consommation alimentaire, la croissance pondérale, la composition corporelle et la régulation de la glycémie. Nous avons déterminé les contributions respectives de l'augmentation de l'apport protéique et de la diminution de l'apport énergétique aux effets métaboliques associés à la consommation d'un régime hyperprotéique.

Méthodes

Deux groupes de rats Wistar ont reçu pendant 8 semaines une alimentation ad libitum contenant 14% (NP) ou 55% (HP) de protéines totales de lait. Un troisième groupe (NPr) a reçu l'alimentation NP, rationnée à l'apport énergétique spontané des rats HP tel qu'il avait été déterminé précédemment lors d'une expérience pilote. L'inclusion de ce groupe a permis d'évaluer les contributions respectives de la composition en macronutriments des régimes et du niveau d'apport énergétique aux modifications de la composition corporelle et de la régulation glycémique. La composition corporelle a été évaluée après 5 et 7 semaines de régime par la mesure de l'eau corporelle totale (dilution d'eau deutérée) et déterminée après le sacrifice des animaux par dissection post-mortem et pesée des organes. En complément, la distribution de la taille des adipocytes a été évaluée à l'abattage sur un prélèvement de tissu adipeux rétropéritonéal. La tolérance orale au glucose a été mesurée après 4 et 7 semaines, et la sensibilité à l'insuline après 5 et 8 semaines de régime par l'utilisation d'un test de sensibilité à l'insuline et le calcul de l'index HOMA d'insulino-sensibilité. L'expression hépatique de la fatty acid synthase (FAS) et du sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) et l'expression musculaire de l'hexokinase II (HKII) et de SREBP-1c, protéines

impliquées dans le métabolisme du glucose et des acides gras, ont été mesurées par PCR en temps réel et utilisées comme indicateur de la lipogenèse et de l'utilisation périphérique du glucose.

Résultats et conclusions

La consommation alimentaire spontanée des rats HP était significativement inférieure à celle des rats NP, un effet attribuable à l'important effet satiétogène des protéines alimentaires (Bensaid *et al.*, 2002). Chez les rats NPr et HP, comparés aux rats NP, la moindre prise énergétique s'accompagnait d'une réduction significative de la croissance pondérale et du dépôt adipeux. Bien que les masses corporelles moyennes des rats HP et NPr étaient similaires après 8 semaines de régime, leurs compositions corporelles différaient. L'augmentation du ratio masse maigre/masse grasse, la réduction de la taille moyenne des adipocytes du tissu adipeux rétropéritonéal et de l'expression hépatique de la FAS et de SREBP-1c chez les rats HP comparés aux rats NP et NPr, indiquent que la lipogenèse était réduite dans le groupe HP. La croissance pondérale, la composition corporelle et la cellularité du tissu adipeux rétropéritonéal étaient affectées simultanément par l'apport protéique et l'apport énergétique.

La consommation du régime HP s'accompagnait également d'une réduction de la glycémie à jeun, d'une meilleure tolérance orale au glucose et d'une meilleure sensibilité à l'insuline, telle qu'évaluée par l'index HOMA. Ces améliorations étaient indépendantes de la réduction de l'apport énergétique puisque ces paramètres étaient identiques chez les rats NP et les rats NPr. L'augmentation de l'expression musculaire de SREBP1c et de HKII suggère que l'utilisation périphérique du glucose était accrue chez les animaux HP. Toutefois, lors du test de sensibilité à l'insuline, la réponse glycémique à l'hyperinsulinémie provoquée ne différait pas entre les groupes, mais ce résultat pourrait traduire une meilleure contre-régulation hormonale chez les rats adaptés au régime HP, qui présentent une plus grande capacité néoglucogénique (Peret *et al.*, 1975).

Notre étude ne met pas en évidence l'implication directe de l'augmentation de l'apport en protéines sur l'amélioration de la composition corporelle, de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les rats HP. Ces résultats pourraient plutôt être la conséquence de la diminution de l'apport en glucides. En particulier, la diminution de niveau d'expression de

SREBP-1c et de la FAS au niveau hépatique chez les rats HP pourrait être directement liée à la diminution de l'apport en glucides et à la réduction de la sécrétion d'insuline associée (Kabir *et al.*, 1998; Wolever, 2000; Parks, 2002). Cependant, la diminution de l'apport en glucides n'explique pas l'augmentation des niveaux d'expression de SREBP-1c et de HKII au niveau du muscle chez les rats HP, et un rôle spécifique de la fraction protéique de l'alimentation ne peut pas être exclu.

Cette étude confirme que la consommation d'un régime hyperprotéique induit une diminution du dépôt adipeux et une amélioration de l'homéostasie du glucose chez le rat, et indique que l'augmentation de l'apport protéique favorise l'homéostasie du glucose indépendamment de la réduction spontanée de l'apport énergétique.

The Reduced Energy Intake of Rats Fed a High-Protein Low-Carbohydrate Diet Explains the Lower Fat Deposition, but Macronutrient Substitution Accounts for the Improved Glycemic Control[1–3]

Clémence Blouet, François Mariotti, Dalila Azzout-Marniche, Cécile Bos, Véronique Mathé, Daniel Tomé, and Jean-François Huneau[4]

UMR 914 INRA/INA P-G Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France

ABSTRACT The metabolic effect of high-protein low-carbohydrate (HP) diets on body composition and glucose homeostasis remains incompletely understood. This study assesses the respective roles of the increased protein:carbohydrate ratio (P:C) and the resulting moderate decrease in energy intake in the metabolic effects of HP diets. Rats had free access to normal (NP; 14%) or high (HP; 53%) total milk protein isoenergetic diets, or were fed the NP diet but restricted to the energy intake of HP rats (NPr), which was 89.1 ± 9.3% that of NP rats. After 8 wk, body weight was lower in HP and NPr rats than in NP rats. In HP rats, the lower body weight was associated with a lower adipose tissue mass and a reduced proportion of large adipocytes. HP rats also had an improved oral glucose tolerance and insulin sensitivity, as assessed by the homeostatic model assessment index, compared with NPr and NP rats, and these effects were related solely to the increased P:C. These data suggest that the reduced energy intake of rats fed a high-protein, low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition but an increased P:C per se improves glucose homeostasis. J. Nutr. 136: 1849–1854, 2006.

KEY WORDS: • *protein:carbohydrate ratio* • *body composition* • *glucose tolerance* • *insulin sensitivity*

Downloaded from jn.nutrition.org by Daniel Tome on October 3, 2006

Low-carbohydrate, high-protein, low-energy diets are widely used in weight management programs. Compared with other diets, high-protein low-carbohydrate (HP)[5] diets are reported to be effective in inducing fat loss, while sparing lean body mass (1). A growing body of evidence shows that these diets also improve glycemic control in hyperinsulinemic, obese, or diabetic subjects (2–4). However, because most of these studies were set in the context of intense energy restriction, it is difficult to analyze the respective contributions of an elevated protein:carbohydrate ratio (P:C) and energy restriction to fat loss and various metabolic benefits.

Very few studies have addressed the effects of HP diets on healthy subjects consuming regular energy levels. Increasing the P:C while maintaining a normal energy level was shown to enhance the thermic effect of food (5), decrease energy efficiency (5), and increase satiety (6), which may facilitate long-term weight loss. Data concerning the effects of HP diets on glucose homeostasis are more controversial. On the one hand, the use of euglycemic clamps with amino acid infusion suggested that amino acids reduce glucose disposal, promote insulin secretion, and impair insulin sensitivity (IS) (7,8). BCAA were shown to impair insulin signaling in hepatoma and myotubes (9,10). Other investigations, performed in both healthy and type I diabetic subjects, also suggested that the long-term consumption of a HP diet enhances hepatic glucose output and pancreatic insulin secretion, leading to an accelerated impairment of the insulin secretion capacity (7,11).

On the other hand, recent studies suggested that HP diets are beneficial to glucose control in healthy rats and type II diabetic subjects (4,12,13). In humans consuming a HP diet, moderate weight loss, associated with a reduction in visceral adipose tissue, was shown to improve glucose homeostasis (14).

In the current study, we investigated the effects of a HP diet on energy intake, body weight, body composition, and glycemic control in healthy rats. We systematically determined the respective roles of the increased P:C and the decreased energy intake in the metabolic effects associated with the HP diet. For

[1] Presented in abstract form at Experimental Biology 05, April 2005, San Diego, CA [Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Bos C, Mathe V, Tomé D, Huneau JF. Depressed food intake is not the determinant of beneficial effects of high-protein diets on glucose homeostasis (abstract). FASEB J. 2005;19: A440].

[2] Supported by an MRT grant from the French Ministry for Research.

[3] Supplemental Table 1 is available with the online posting of this paper at www.nutrition.org

[4] To whom correspondence should be addressed. E-mail: huneau@inapg.inra.fr.

[5] Abbreviations used: AT%, atom percent; AUC, area under the curve; BW, body weight; FAS, fatty acid synthase; FFM, fat-free mass; FM: fat mass; HOMA: homeostatic model assessment; HKII, hexokinase II; HP, high-protein low-carbohydrate; IS: insulin sensitivity; IST, insulin sensitivity test; NP, normal-protein; NPr, normal-protein food restricted; OGTT, oral glucose tolerance test; P:C, protein to carbohydrate ratio; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; TBW, total body water.

0022-3166/06 $8.00 © 2006 American Society for Nutrition.

Manuscript received 10 February 2006. Initial review completed 9 March 2006. Revision accepted 6 April 2006.

Supplemental Material can be found at:
http://jn.nutrition.org/cgi/content/full/136/7/1849/DC1

this purpose, we fed a group of rats a normal-protein (NP) diet, restricting their energy intake to match the spontaneous energy intake of HP-fed rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets. All experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Committee for Animal Care, using male Wistar rats (Harlan). Rats were adapted to the laboratory conditions for 1 wk, under a reverse light-dark cycle, as previously described (12), and accustomed to the rapid consumption (<1 min) of a glucose solution given orally with a syringe. Free access to tap water was allowed. Growth was measured 3 times/wk. After the adaptation period, rats were randomly assigned on d 1 to receive one of the experimental diets for 8 wk. The composition of the diets was described previously (1). The normal-protein high-carbohydrate (NP) diet contained 140 g total milk protein and 722 g carbohydrate/kg of food. The high-protein low-carbohydrate (HP) diet contained 530 g total milk protein and 332 g carbohydrate/kg of food. NP and HP diets were isoenergetic and contained equal amounts of fat.

Study design. In the pilot experiment, Wistar rats (n = 16; weighing 207 ± 5 g) were randomly assigned to either the NP or HP diet. Fresh food was freely available each day at the beginning of the dark phase (0900). Food intake, corrected for spillage, was monitored daily during wk 1 and then twice each week. At wk 8, the rats were killed [sodium pentobarbital, 30 mg/kg body weight (BW), i.p.].

In the main experiment, Wistar rats (n = 30; weighing 219 ± 10 g) were randomly assigned to 3 groups. NP rats consumed the NP diet ad libitum. NPr and HP rats were fed the NP and HP diets, respectively, and their energy intake was matched to that of HP rats from the pilot experiment, on a daily basis for the first 2 d and then on a weekly basis (**Table 1**). To eliminate experimental week-to-week variation, the food intake data of HP rats in the pilot experiment were smoothed to generate a linear feeding design. Food, moistened to minimize spillage, was provided daily at the beginning of the dark phase. Food intake, corrected for water evaporation, was monitored to ascertain that NPr and HP rats had similar energy intakes. Oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed after 4 and 7 wk and i.v. insulin sensitivity tests (IST) after 5 and 8 wk. Total body water (TBW) was assessed after 5 and 8 wk. Blood samples were collected at wk 5 and 7 after at least 12 h of food deprivation, dropped in prechilled tubes containing 0.7% EDTA and 0.014% aprotinin (Bayer) and then centrifuged for 10 min at 2500 × g. The resulting plasma was stored at −20°C until analysis. The rats were killed after 8 wk, body composition was determined, and tissues samples were collected.

Body composition. At wk 8, after anesthesia, the liver and the right gastrocnemius muscle were collected from anesthetized rats and stored at −80°C until analysis. The interscapular brown fat pad and the epididymal, retroperitoneal, and subcutaneous white fat pads were carefully removed and weighed. The skin and the other abdominal and thoracic organs were discarded and the distal parts of the limbs, head, and tail were severed, to determine the weight of the "stripped" carcass.

TBW was assessed using deuterated water dilution as follows. Blood was withdrawn before and 120–170 min after an injection of 40 mg ^2H_2O/kg i.p. [1 mL/kg ^2H_2O, 4.064 atom percent (AT%)] (15). Plasma deuterium enrichment was determined using a multiflow system (Micromass) coupled to an isotope ratio MS (Isoprime, Micromass). TBW was calculated on the basis of simple isotopic dilution, without any correction factor (16). The fat-free mass (FFM) was estimated from TBW by assuming a constant coefficient of hydration of 72%. Fat mass (FM) was calculated as body weight minus FFM.

The size distribution of adipocytes was measured on osmium-fixed retroperitoneal fat pads as described by Hirsch (17), using a 116-class (40 nm–2 mm) laser granulometer (Beckman Coulter LS 230). Because it was shown previously that many of the particles smaller than 20 μm consisted of cellular debris, osmium-fixed free lipid droplets, and collagen particles (18), and because particles larger than 410 μm were seldom detected, only particles in the 20–410 μm range were selected for subsequent analysis.

Glucose homeostasis. The OGTT was performed after at least 12 h of food deprivation. Glucose (1 g/kg BW, 50% solution in water) was administered orally and blood glucose concentrations were measured at indicated time points. Blood was taken with a 26-gauge needle from the veins of the paw, while rats were lightly restrained. This sampling method induced little or no stress and did not affect blood glucose per se (data not shown).

The IST was performed after at least 12 h of food deprivation. Plasma glucose decay was monitored over 20 min after an insulin injection into a lateral tail vein (0.7 nmol/kg BW, i.v. bolus) (19). Blood samples were collected from the veins of the paw.

Biochemical measurements. Unless otherwise noted, all chemicals were obtained from Sigma (France). Blood glucose concentrations were measured using a portable refractometer (Glucometer, Bayer Diagnostics). Plasma insulin was detected using a solid phase 2-site enzyme immunoassay (Mercodia Rat Insulin). The homeostatic model assessment (HOMA) index was calculated as follows (20): HOMA = Insulin (pmol/L)·Glucose (mmol/L)/22.5. Plasma triglycerides levels were determined using an enzymatic assay (Triglycerides kit, BioMérieux) on a Mascott Plus robot (Lisabio).

Measurement of gene expression. We measured the hepatic expression of fatty acid synthase (FAS), the rate-limiting enzyme of hepatic lipogenesis, and that of the transcription factor sterol

TABLE 1

Daily energy intake of NP, HP, and NPr rats in the pilot and main experiments[1]

	Pilot experiment Energy intake		Energy ration[2]	Main experiment Energy intake		
	NP	HP	HP and NPr	NP	NPr	HP
d			*kJ/d*			
1	351 ± 37[a]	226 ± 18[b]	224	ND	224 ± 0	223 ± 0
2	345 ± 30[a]	279 ± 19[b]	253	331 ± 22[a]	253 ± 0[b]	250 ± 5[b]
3–6	335 ± 35[a]	296 ± 45[b]	298	321 ± 21[a]	288 ± 15[b]	282 ± 19[b]
7–13	356 ± 53[a]	287 ± 61[b]	298	334 ± 34[a]	292 ± 18[b]	295 ± 4[b]
14–20	341 ± 43[a]	304 ± 44[b]	313	350 ± 30[a]	308 ± 9[b]	296 ± 7[b]
21–27	348 ± 40[a]	310 ± 41[b]	313	332 ± 37[a]	302 ± 16[b]	302 ± 14[b]
28–33	350 ± 23[a]	318 ± 52[b]	328	287 ± 37	282 ± 42	281 ± 41
34–56	320 ± 13	288 ± 10	328	341 ± 32[a]	312 ± 23[b]	307 ± 23[b]

[1] Values are means ± SD, n = 8 (pilot) or 10 (main). Within an experiment, means in a row with superscripts without a common letter differ, $P \leq 0.05$.

[2] To eliminate experimental week-to-week variation, the food intake data of HP rats in the pilot experiment were smoothed to generate a linear feeding design.

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org by Daniel Tome on October 3, 2006

regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), a key mediator of insulin action on FAS expression (21). We investigated muscle tissue expression of hexokinase II (HKII), the first enzyme involved in muscle glucose utilization, and that of SREBP-1c, because it was recently reported to regulate HKII expression (22).

Total muscle and liver RNA were extracted using TRIzol® reagent (Invitrogen,). The total RNA content was determined by a fluorimetric assay (Ribogreen RNA Quantification kit, Molecular Probes). Gene expression analysis was performed with a light-Cycler (MyiQ Real-Time PCR Detection System, Roche Diagnostics) using SYBR GreenI DNA binding dye (Eurogentec, RT-SN10–05NR). cDNA was synthesized from 2 μg RNA using a PTC-200 thermocycler (MJ research). Each PCR reaction was performed in a final volume of 20 μL, containing 5 μL of the RT reaction product and 15 μL of reaction buffer, which included 8 pmol of the specific forward and reverse primers for the genes of interest (Supplemental Table 1). Ribosomal 18S RNA amplifications were used to account for variability in the initial quantities of cDNA.

Statistical analysis. The data are shown as means ± SD. Cell-size distributions were compared using the χ^2 test (Freq procedure, SAS/STAT version 8; Statistical Analysis Systems Institute). Pearson correlations were calculated using the SAS Corr procedure. All kinetics were analyzed using SAS mixed models for repeated measurements, with diet and time as independent fixed factors. Other data were analyzed using mixed models with diet as the independent fixed factor. Orthogonal contrasts were used for multiple comparisons between diets. To customize the hypothesis tests for the energy effect and the P:C effect, 2 levels of treatment were contrasted together against the third (HP and NPr vs. NP for the energy effect; NP and NPr vs. HP for the P:C effect). Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Energy intake, growth and body composition. In the pilot experiment, the HP diet induced a 30% decrease in food intake during the first 2 d after the introduction of the diets (Table 1, $P < 0.05$), but values returned to 90% of those measured in NP rats as early as d 3. In the main experiment, food intake was similar in NPr and HP rats and lower than in NP rats ($P < 0.05$) (Table 1). At wk 8, body weight was lower in HP and NPr rats than in NP rats (**Fig. 1**). Based on TBW, body composition did not differ among the groups at wk 5. However, we found a correlation between FFM at wk 5 and the postmortem weight of the stripped carcass ($r = 0.6$, $P < 0.01$) and between FM at wk 5 and the postmortem weight of the retroperitoneal adipose tissue ($r = 0.4$, $P < 0.05$), suggesting that the differences in fat deposition were already beginning at wk 5. At wk 8, FM tended to be lower in HP rats than in NP rats ($P = 0.08$), and this

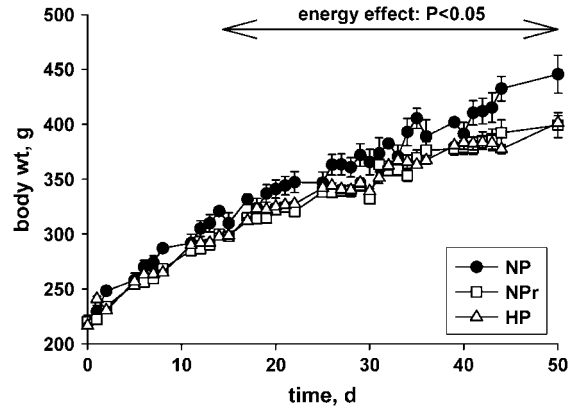


FIGURE 1 Body weights of NP, NPr, and HP rats during the 8-wk study. Values are means ± SD, $n = 10$.

difference was clearly confirmed postmortem by lower white adipose tissue weights in NP than in HP rats ($P < 0.05$) (**Table 2**). In NPr rats, the adipose tissue weight did not differ from the other groups. The stripped carcass weight, an indicator of lean body mass, did not differ between NP and HP rats, whereas it was lower in NPr rats than in NP rats. The retroperitoneal fat pad was the main contributor to the higher body weight of NP rats, whereas the subcutaneous fat pad weight did not differ among the groups.

The cell-size distribution of retroperitoneal fat pads clearly showed 2 cell subpopulations, with stromal cells, preadipocytes, and small adipocytes (diameter <60 μm) constituting the principal subpopulation (60–70% of cells) and larger adipocytes (diameter >60 μm) comprising the remaining 30–40% (**Fig. 2**). The overall cell-size distribution differed among the 3 groups ($P < 0.05$). The proportion of adipocytes in the 120–200 μm range was lower in HP rats than in NP and NPr rats.

Glucose homeostasis. At wk 5, blood glucose and insulin measured did not differ among the groups (data not shown). At wk 7, plasma glucose was lower in HP rats than in NP and NPr rats ($P < 0.05$), and although plasma insulin did not differ among the groups, IS (as assessed by the HOMA index) was markedly higher in HP rats than in NP and NPr rats ($P < 0.05$) (**Table 3**). Plasma triglycerides (wk 8), did not differ among the groups (data not shown).

After 4 wk, the glucose peak after the oral glucose challenge was lower in both NPr and HP rats than in NP rats (**Fig. 3A**)

TABLE 2

Body weights and post-mortem body composition of NP, HP and NPr rats at wk 8[1]

	NP	NPr	HP	Statistical effects P:C	Statistical effects Energy
BW, *g*	431.0 ± 29.7[a]	392.2 ± 28.7[b]	388.7 ± 21.1[b]	$P < 0.05$	$P < 0.01$
Energy efficiency, *kJ feed/g gain*	97.3 ± 14.5	97.9 ± 14.9	97.6 ± 12.6	NS	NS
Stripped carcass, *g*	175.8 ± 11.5[a]	161.3 ± 14.1[b]	166.9 ± 12.4[ab]	NS[2]	$P < 0.05$
White adipose tissue, *g*	70.6 ± 17.5[a]	60.5 ± 12.4[ab]	54.1 ± 10.7[b]	$P < 0.05$	$P < 0.05$
Epididymal	15.5 ± 3.7[a]	13.42 ± 3.2[ab]	11.3 ± 2.5[b]	$P < 0.05$	$P < 0.05$
Retroperitoneal	21.6 ± 3.4[a]	18.1 ± 3.7[ab]	16.1 ± 3.2[b]	$P < 0.05$	$P < 0.05$
Subcutaneous	33.4 ± 11.5	28.9 ± 6.8	26.7 ± 6.9	NS	NS
Brown adipose tissue, *g*	0.9 ± 0.2[a]	0.8 ± 0.1[ab]	0.7 ± 0.1[b]	$P < 0.05$	$P < 0.05$

[1] Values are means ± SD, $n = 10$. Means in a row with superscripts without a common letter differ, $P \leq 0.05$.
[2] NS, $P > 0.05$.

Downloaded from jn.nutrition.org by Daniel Tome on October 3, 2006

TABLE 3

Blood glucose and insulin concentrations and the HOMA index of NP, HP, and NPr rats at wk 7[1]

	NP	NPr	HP	Statistical effects	
				P:C	Energy
Glucose, *mmol/L*	5.5 ± 0.3[a]	5.4 ± 0.2[a]	5.2 ± 0.4[b]	$P < 0.05$	NS
Insulin, *nmol/L*	0.33 ± 0.19	0.27 ± 0.19	0.18 ± 0.08	NS	NS
HOMA	75.4 ± 52.4[a]	66.2 ± 44.1[a]	42.1 ± 20.9[b]	NS	NS

[1] Values are means ± SD, $n = 10$. Means in a row with superscripts without a common letter differ, $P \leq 0.05$.

[2] NS, $P > 0.05$.

and blood glucose concentrations returned to baseline earlier in HP rats than in NP rats. At wk 4, both P:C and energy intake affected glucose kinetics ($P < 0.05$). However, the area under the glucose curve (AUC) did not differ among the groups (data not shown). In contrast, after 7 wk, glucose kinetics no longer differed among the groups (Fig. 3*B*), but the glucose AUC was lower in HP (85.1 ± 21.7 mmol·min/L) than in NPr (118.2 ± 25.7 mmol·min/L) and NP rats (117.1 ± 34.4 mmol·min/L). The P:C, but not energy intake, affected the glucose AUC.

Blood glucose kinetics in response to i.v. insulin injection, measured during the main experiment, did not differ among the groups at either 5 or 8 wk (data not shown).

Expression of SREBP1c, FAS, and HKII genes. The expression of SREBP1c, FAS, and HKII genes was investigated in liver and/or muscle tissue collected at wk 8 (**Table 4**). Hepatic SREBP1c and FAS expression were lower in HP rats than in NPr and NP rats. Muscle SREBP1c and HKII expressions did not differ among the groups but the P:C effect on HKII expression was significant.

DISCUSSION

In the context of the rising incidence of obesity and diabetes, research has focused on the role of the macronutrient balance in the diet. Although several studies have shown that diets with an increased P:C may be effective in reducing body fat and improving glucose homeostasis under various conditions (3,4,11,23,24), little is known about the underlying mechanisms. The aim of this work was to investigate the metabolic effect of a HP diet on body composition and glucose homeostasis in healthy rats and to assess the respective roles of a moderately decreased energy intake (10%) and an 800% increase in the dietary P:C in these effects.

After 8 wk, HP and NPr rats weighed 10% less than NP rats. This difference was attributable mainly to the 11% lower energy intake in HP and NPr rats because the energy efficiency did not differ between rats fed the NP and HP diets. The initial 30% reduction in food intake after the introduction of the HP diet was ascribed to both its poor palatability and the satiating effect of proteins (1,25). However, after a few days, as rats become accustomed to this new diet, the higher satiating effect of proteins accounted for the lower food intake of HP rats, as previously shown (25). Body weight was similar among HP and NPr rats, but post-mortem body compositions were qualitatively affected by the P:C. The lower body weight in HP rats was associated mainly with a reduced adiposity compared with

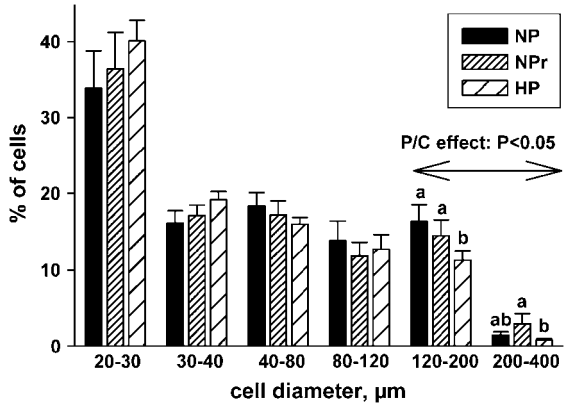


FIGURE 2 Retroperitoneal adipocytes size distribution of NP, NPr, and HP rats at wk 8. Values are means ± SD, $n = 9$. Means in a size range without a common letter differ, $P \leq 0.05$.

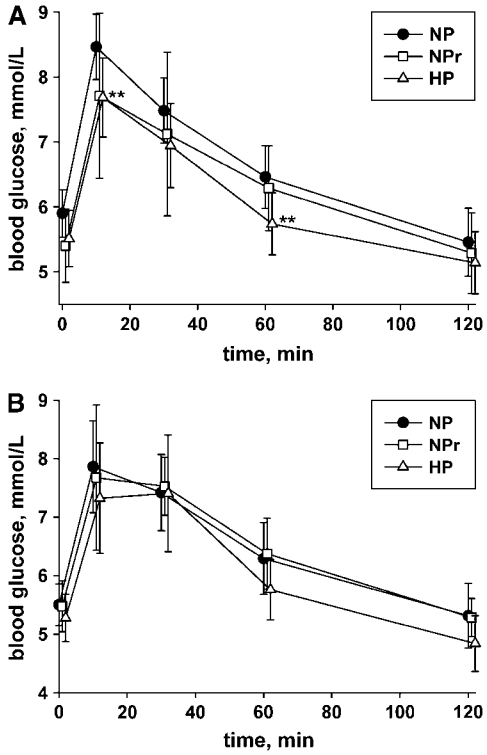


FIGURE 3 Oral glucose tolerance tests of NP, NPr, and HP rats at wk 4 (*A*) and wk 7 (*B*). Values are means ± SD, $n = 10$. **Different from NP, $P \leq 0.05$.

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org by Daniel Tome on October 3, 2006

TABLE 4

Genes expression in NP, HP, and NPr rats at wk 8[1]

	NP	NPr	HP	Statistical effects	
				P:C	Energy
		Arbitrary units			
Liver SREBP1c	2.1 ± 0.6[a]	1.8 ± 0.7[a]	0.7 ± 0.05[b]	$P < 0.001$	$P = 0.05$
Liver FAS	0.9 ± 0.3[a]	0.8 ± 0.3[a]	0.3 ± 0.1[b]	$P < 0.05$	NS
Muscle SREBP1c	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.4	1.8 ± 0.3	NS	NS
Muscle HKII	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.8	1.9 ± 0.8	$P = 0.05$	NS

[1] Primers were designed using Oligo Explorer 1.1.0 software. The sense and antisense primers of each target gene were placed in 2 different exons of the gene.

NP rats. In NPr rats, lean body mass, as assessed by postmortem body composition, was lower than in NP rats. This resulted in a higher lean:fat mass ratio in HP rats, as previously reported (1). An increase in the diet-induced thermogenesis that was previously associated with HP diets may be responsible for the lower adiposity in HP rats compared with NPr rats (5,26). In addition, retroperitoneal adipocytes were smaller in HP rats than in NP and NPr rats, indicating a lower level of replenishment of adipose cells in HP rats. Reduced hepatic lipogenesis, as suggested by a lower hepatic gene expression of FAS and SREBP-1c, may account for the lower adiposity and the smaller proportion of large adipocytes in the retroperitoneal fat pad of HP rats. Because glucose and insulin exert similar regulatory actions on FAS in liver and adipose tissue (21), we speculate that FAS expression was also lower in the adipose tissue of HP rats, although it was not measured.

Overall, our results are in line with the data obtained during short- and long-term studies of HP diets, with or without moderate energy restriction, in both noninsulin-dependent and obese subjects (3,13,23,24). This study confirms that proteins, when substituted for carbohydrates, lower fat mass and lipogenesis levels, and preserve lean body mass.

One major outcome of the current study was the improved glycemic control in HP rats. At wk 5, there was no difference in glucose and insulin levels measured after an overnight food deprivation. Glucose tolerance (as assessed by the glucose AUC) did not differ among the groups. In contrast, after 7 wk, glucose homeostasis was markedly improved in HP rats compared with NP and NPr rats, as evidenced by OGTT and the HOMA index. The better glucose tolerance of HP rats seems to be due to a more rapid glucose clearance during the later stages of the OGTT, suggesting a higher IS. However, IST did not differ among the groups. This apparent discrepancy could be explained by a relative lack of sensitivity of this test. Indeed, the high i.v. insulin dose may have not been appropriate for discerning slight differences in sensitivity to physiological insulin. This kind of hypoglycemic test also triggers a counterregulatory response that may vary according to the diet (27). Together, these results suggest that the higher P:C is the principal contributor to the improved glycemic control in HP rats. Although the higher muscle expression of HKII in HP rats suggests that insulin action on genes involved in glucose utilization was greater in this group (22), further investigations are required to elucidate whether the improved glucose tolerance is explained mainly by a higher peripheral uptake and/or a higher suppression of hepatic glucose production.

The present results are in agreement with a previous long-term study, which demonstrated improved glucose tolerance and lower fat mass in rats fed a HP diet over a 6-mo period (12), whereas they contrast with a short-term, 10-d study that reported lower hepatic and peripheral IS and higher hepatic glucose production in rats fed the HP diet (7). The discrepancy may arise from the duration of HP feeding, because the rats may have adapted differently to the high P:C after 10 d or 6 mo. Indeed, Rossetti and co-workers (28) reported no changes in body weight and body composition. It was postulated that visceral tissue may play a key role in the onset of insulin resistance because excess visceral adipose tissue releases FFA and adipocytokines into the bloodstream, both of which are deeply involved in insulin resistance (14,29). The reduced visceral adipose tissue weight measured in HP rats at the end of the current study may explain in part the improved glucose homeostasis observed. On the other hand, HP rats preserved lean body mass, as assessed by postmortem body composition, and this may have also contribute to a better glycemic control.

Although human studies are not easily comparable to rat studies, most have reported a positive effect of HP diets on glycemic control, together with lowered body fat levels (4,13,24).

The benefits of HP diets in terms of adiposity and IS have often been linked to their lower carbohydrate content (30,31). The phenotype observed in HP rats regarding adipose tissue deposition may indeed be related to the lower carbohydrate content of the HP diet and the associated lower insulin secretion. This could explain, to some extent, the lower liver SREBP-1C and FAS expression measured in HP rats and the lower level of lipogenesis (32) (33). In examining the effects of the HP diet on glycemic regulation, the effect of a lower carbohydrate intake is less clear, and the lower insulin secretion associated with the lower carbohydrate intake does not explain the higher muscle expression of HKII. A specific role played by the protein fraction of the diet cannot be ruled out, although our study did not address this hypothesis. This would be in line with several data reports supporting a specific role of some proteins or amino acids in glycemic control. In healthy humans, long-term supplementation with an amino acid mixture improved IS (34,35), and the acute addition of a specific amino acid (glycine, arginine, or proline) improved oral glucose tolerance (36–38). Moreover, glycemic regulation in rats was shown to be affected by the nature of dietary proteins (39–41). Therefore, we cannot exclude that our results are to some extent related to the nature of the protein used in the diet formulation and that different results might have been obtained with other protein sources such as meat or soybeans.

This study provides a contribution to the debate on the influence of the macronutrient composition of a diet on body composition and glucose tolerance. Our overall findings showed

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org by Daniel Tome on October 3, 2006

that feeding a high-protein/low-carbohydrate diet to rats reduces adipose tissue deposition, and that this effect is related both to lower energy intake and diet composition, and improves glucose homeostasis independently of energy intake. Further studies are required to confirm the suggestion that this improved blood glucose control originates from a higher peripheral IS and to address the role of candidate amino acids in insulin signaling.

ACKNOWLEDGMENTS

The assistance of Magali Lacroix and Patrick Even for animal experiments is gratefully acknowledged. We thank INSERM U 671 for the use of LightCycler.

LITERATURE CITED

1. Jean C, Rome S, Mathe V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, Achagiotis CL, Tomé D. Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. J Nutr. 2001;131:91–8.

2. Farnsworth E, Luscombe ND, Noakes M, Wittert G, Argyiou E, Clifton PM. Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. Am J Clin Nutr. 2003;78:31–9.

3. Baba NH, Sawaya S, Torbay N, Habbal Z, Azar S, Hashim SA. High protein vs high carbohydrate hypoenergetic diet for the treatment of obese hyperinsulinemic subjects. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999;23:1202–6.

4. Gannon MC, Nuttall FQ, Saeed A, Jordan K, Hoover H. An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. Am J Clin Nutr. 2003;78:734–41.

5. Westerterp KR, Wilson SA, Rolland V. Diet induced thermogenesis measured over 24h in a respiration chamber: effect of diet composition. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999;23:287–92.

6. Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. Ann Intern Med. 2005;142:403–11.

7. Rossetti L, Rothman DL, DeFronzo RA, Shulman GI. Effect of dietary protein on in vivo insulin action and liver glycogen repletion. Am J Physiol. 1989;257:E212–9.

8. Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhausl W, Roden M. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. Diabetes. 2002;51:599–605.

9. Patti ME, Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR. Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. J Clin Invest. 1998;101:1519–29.

10. Tremblay F, Marette A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. J Biol Chem. 2001;276:38052–60.

11. Linn T, Santosa B, Gronemeyer D, Aygen S, Scholz N, Busch M, Bretzel RG. Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. Diabetologia. 2000;43:1257–65.

12. Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, Tomé D, Huneau JF. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004;287:R934–42.

13. Gannon MC, Nuttall FQ. Effect of a high-protein, low-carbohydrate diet on blood glucose control in people with type 2 diabetes. Diabetes. 2004;53:2375–82.

14. Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. Diabetes. 1999;48:839–47.

15. Blanc S, Geloen A, Pachiaudi C, Gharib C, Normand S. Validation of the doubly labeled water method in rats during isolation and simulated weightlessness. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;279:R1964–79.

16. Culebras JM, Moore FD. Total body water and the exchangeable hydrogen. I. Theoretical calculation of nonaqueous exchangeable hydrogen in man. Am J Physiol. 1977;232:R54–9.

17. Hirsch J, Gallian E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. J Lipid Res. 1968;9:110–9.

18. Mersmann HJ, MacNeil MD. Variables in estimation of adipocyte size and number with a particle counter. J Anim Sci. 1986;62:980–91.

19. Monzillo LU, Hamdy O. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. Nutr Rev. 2003;61:397–412.

20. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28:412–9.

21. Foufelle F, Girard J, Ferre P. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. Adv Enzyme Regul. 1996;36:199–226.

22. Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H, Lefai E. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. J Lipid Res. 2005;46:697–705.

23. Skov AR, Toubro S, Ronn B, Holm L, Astrup A. Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. Int J Obes Relat Metab Disord. 1999;23:528–36.

24. Layman DK. The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. J Nutr. 2003;133:261S–7.

25. Bensaid A, Tomé D, L';Heureux-Bourdon D, Even P, Gietzen D, Morens C, Gaudichon C, Larue-Achagiotis C, Fromentin G. A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. Physiol Behav. 2003;78:311–20.

26. Bensaid A, Tomé D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gausseres N, Fromentin G. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. Physiol Behav. 2002;75:577–82.

27. Frizzell RT, Hendrick GK, Brown LL, Lacy DB, Donahue EP, Carr RK, Williams PE, Parlow AF, Stevenson RW, Cherrington AD. Stimulation of glucose production through hormone secretion and other mechanisms during insulin-induced hypoglycemia. Diabetes. 1988;37:1531–41.

28. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. J Clin Invest. 1994;93:2438–46.

29. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science. 1996;271:665–8.

30. Wolever TM, Mehling C. Long-term effect of varying the source or amount of dietary carbohydrate on postprandial plasma glucose, insulin, triacylglycerol, and free fatty acid concentrations in subjects with impaired glucose tolerance. Am J Clin Nutr. 2003;77:612–21.

31. Pawlak DB, Kushner JA, Ludwig DS. Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homoeostasis, and plasma lipids in animals. Lancet. 2004;364:778–85.

32. Parks EJ. Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. Br J Nutr. 2002;87:Suppl 2:S247–53.

33. Klein S, Wolfe RR. Carbohydrate restriction regulates the adaptive response to fasting. Am J Physiol. 1992;262:E631–6.

34. Solerte SB, Gazzaruso C, Schifino N, Locatelli E, Destro T, Ceresini G, Ferrari E, Fioravanti M. Metabolic effects of orally administered amino acid mixture in elderly subjects with poorly controlled type 2 diabetes mellitus. Am J Cardiol. 2004;93:23A–9A.

35. Manzella D, Grella R, Esposito K, Cacciapuoti F, Arciello A, Giugliano D, Paolisso G. Oral amino acid administration decreases oxidative stress and improves brachial reactivity in elderly individuals. Am J Hypertens. 2005;18:858–63.

36. Nuttall FQ, Gannon MC, Jordan K. The metabolic response to ingestion of proline with and without glucose. Metabolism. 2004;53:241–6.

37. Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. Oral arginine does not stimulate an increase in insulin concentration but delays glucose disposal. Am J Clin Nutr. 2002;76:1016–22.

38. Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. The metabolic response to ingested glycine. Am J Clin Nutr. 2002;76:1302–7.

39. Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. Diabetes. 2003;52:29–37.

40. Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H, Marette A. Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;281:E62–71.

41. Belobrajdic DP, McIntosh GH, Owens JA. A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in Wistar rats. J Nutr. 2004;134:1454–8.

JN THE JOURNAL OF NUTRITION

Downloaded from jn.nutrition.org by Daniel Tome on October 3, 2006

RESULTATS COMPLEMENTAIRES DES EXPERIENCES DE L'ARTICLE 1.

1. Effet du niveau d'apport protéique sur le statut en glutathion et le statut redox

L'effet d'une augmentation de l'apport protéique sur le statut redox de l'organisme est controversé. La consommation d'un régime hyperprotéique est associée à une augmentation de l'oxydation des acides aminés (Morens *et al.*, 2001). Ce processus catabolique implique une activité accrue de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, source de radicaux libres. Ainsi, selon certains auteurs, la consommation d'un régime hyperprotéique altérerait le statut redox de l'organisme (Youngman *et al.*, 1992). Cependant, une augmentation de l'apport protéique serait associée à une augmentation de l'expression des protéines UCP dans le foie et le tissu adipeux brun chez le rat (Petzke *et al.*, 2005), une adaptation favorable à la réduction du potentiel membranaire mitochondrial et par conséquent, une moindre production de radicaux libres par la mitochondrie. De plus, l'augmentation de la fraction protéique de l'alimentation implique une augmentation de l'apport en AAS, favorable à la synthèse de glutathion et au maintien du statut redox.
Les régimes expérimentaux NP et HP contenaient respectivement 0,12 et 0,47 % de cystéine, 0,43 et 1,7% d'AAS. Nous avons donc voulu évaluer leurs effets sur le statut en glutathion et le statut redox de l'organisme. Au cours de la même l'expérience de l'article 1, les concentrations hépatiques en glutathion, l'activité et l'expression hépatique de la γ-GCS et la carbonylation des protéines – un marqueur du stress oxydant - ont été mesurées chez les rats NP, HP et NPr à l'issue de 8 semaines de régime.

Méthodes

Après 8 semaines de régime, les rats des groupes NP, HP et NPr ont été sacrifiés après un jeûne d'au moins 12h et différents prélèvements tissulaires ont été réalisés. Les concentrations en glutathion ont été mesurées sur des tissus homogénéisés dans l'acide trichloracétique d'après la méthode spectrophotométrique décrite par Anderson (Anderson, 1985). Les niveaux d'expression hépatique de la sous-unité régulatrice (GCSr) et de la sous-unité catalytique (GCSc) de la γ-GCS ont été mesurés par PCR en temps réel (technologie SYBRGreen). Les détails du protocole expérimental et les amorces utilisées sont présentés dans l'article 3. L'activité hépatique de la γ-GCS a été mesurée en utilisant la technique

fluorimétrique décrite par White (White *et al.*, 2003). Les concentrations hépatiques et plasmatiques en protéines carbonylées ont été mesurées par la technique spectrophotométrique décrite par Levine (Levine *et al.*, 1994).

Résultats et conclusions

Les résultats sont présentés dans le tableau 5. Les concentrations hépatiques en glutathion total, glutathion oxydé et le statut en glutathion ne différaient pas selon le niveau d'apport en protéines du régime. L'activité hépatique de la γ-GCS tendait à être réduite chez les rats HP comparés aux rats NP ($P<0,1$). Les niveaux moyens d'expression hépatique de la GCSc étaient significativement réduits chez les rats HP comparés aux rats NP et NPr, tandis que ceux de la GCSr ne différaient pas entre les groupes. Le niveau d'apport énergétique tendait à affecter l'expression hépatique de la GCSc ($P<0,1$).

Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Stipanuk, qui indiquent qu'un apport en protéines supérieur aux besoins n'a pas d'effet sur le statut en glutathion hépatique en période postabsorptive et diminue l'activité et l'expression hépatique de la γ-GCS (Bella *et al.*, 1999b), mais ne concordent pas avec ceux d'une étude qui a mis en évidence une corrélation entre le niveau d'apport protéique et les concentrations hépatiques en glutathion chez le rat sain (Petzke *et al.*, 2000). Par ailleurs, nos résultats ne permettent pas de conclure quant à l'effet du régime HP sur la synthèse de glutathion en période postprandiale, un aspect qu'il serait intéressant d'explorer.

Nos résultats indiquent que les concentrations plasmatiques et hépatiques en protéines carbonylées ne différaient pas significativement entre les groupes, ce qui infirme l'hypothèse selon laquelle la consommation d'un régime hyperprotéique serait associée à un stress oxydant. Les concentrations hépatiques en protéines carbonylées étaient plus faibles chez les rats HP que chez les rats NP mais cette différence n'était pas significative. Ces résultats sont en accord avec d'autres études réalisées chez le rat nourri pendant plusieurs semaines avec un régime hyperprotéique, qui suggèrent que l'augmentation de la teneur en protéines du régime améliore le statut redox de l'organisme (Petzke *et al.*, 1999; Petzke *et al.*, 2000).

2. Effets de la consommation ad libitum d'un régime hyperprotéique formulé avec des protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine sur la composition corporelle et la sensibilité à l'insuline

Les résultats de l'article 1 indiquent que chez les rats HP, l'augmentation du ratio protéines/glucides joue un rôle dans la diminution du dépôt adipeux et l'amélioration de l'insulino-sensibilité, mais le protocole utilisé ne permettait pas de mettre en évidence un rôle direct de la fraction protéique dans ces effets.

Dans plusieurs études, la mise en évidence d'un effet qualitatif de l'apport protéique sur la lipogenèse et l'insulino-sensibilité suggère pourtant un rôle direct de la fraction protéique du régime dans les effets bénéfiques des régimes hyperprotéiques (Tremblay *et al.*, 2003; Belobrajdic *et al.*, 2004; Morifuji *et al.*, 2005). Les protéines de lactosérum semblent particulièrement efficaces, comparées à d'autres protéines comme les protéines de totales de lait ou les protéines de viande rouge, à réduire la croissance pondérale, le développement du tissu adipeux de type viscéral et l'IR (Belobrajdic *et al.*, 2004) et une étude suggère que ces protéines réduisent la lipogenèse par l'intermédiaire d'un effet inhibiteur de l'activité et/ou de l'expression d'enzymes de cette voie métabolique (Morifuji *et al.*, 2005).

Dans une étude complémentaire, nous avons donc exploré l'aspect qualitatif de l'apport protéique et ses effets sur la composition corporelle et la sensibilité à l'insuline. Nous avons comparé des rats nourris avec le régime HP à des rats recevant un régime hyperprotéique similaire contenant des protéines αLAC (HPL). Cette source protéique est particulièrement riche en AAR et en cystéine.

Méthodes

Trois groupes de 8 rats ont reçu pendant 8 semaines les régimes NP, HP et HPL (Tab. 6). Les consommations alimentaires et la croissance pondérale ont été suivies pendant toute la durée de l'étude. A 7 semaines, les concentrations plasmatiques en acides aminés ont été mesurées à jeun et à l'état nourri, afin d'identifier les acides aminés candidats possibles pour expliquer les effets observés. Après 8 semaines de régime, les animaux ont été sacrifiés et leur composition corporelle a été déterminée post-mortem par pesée des organes.

Résultats et conclusions

La consommation alimentaire et la croissance pondérale moyenne des rats HPL étaient similaires à celles des rats HP (Fig. 45), mais leur composition corporelle différait (Tab.7). Le tissu adipeux blanc total était significativement moins développé chez les rats HPL que chez les rats HP, tandis que leurs masses maigres, évaluées par le poids de la carcasse, étaient similaires.

La plus forte réduction du dépôt adipeux observée chez les rats HPL ne peut pas s'expliquer par une réduction de la consommation énergétique dans ce groupe, puisque cette-dernière était similaire dans les groupes HP et HPL. Ce résultat ne confirme pas les conclusions d'une étude réalisée chez l'Homme, qui suggère que les protéines de lactosérum ingérées au sein d'un repas mixte hyperprotéique sont plus satiétogènes que les caséines (Hall *et al.*, 2003). Selon ces auteurs, l'ingestion du repas contenant les protéines de lactosérum serait associée à des excursions postprandiales du GIP, du GLP-1 et de la CCK plus importantes, des hormones impliquées dans les mécanismes de la satiété. Dans notre étude, les régimes hyperprotéiques utilisés sont très riches en protéines (55% de l'énergie fournie sous forme de protéines) et l'effet satiétogène du régime HP est déjà très important, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet supplémentaire du régime HPL.

La mise en évidence d'une réduction plus importante de dépôt adipeux chez les rats HPL comparés aux rats HP est un résultat en accord avec ceux de deux autres études ayant comparé des protéines de lactosérum à d'autres sources protéiques. Chez des rats insulino-résistants, la consommation d'un régime à 32% de protéines de lactosérum était associée à une croissance pondérale et un dépôt adipeux inférieurs à ceux mesurés chez des rats nourris avec un régime à 32% de protéines de viande rouge (Belobrajdic *et al.*, 2004). Une autre étude a mesuré une réduction de l'expression et de l'activité hépatique des enzymes de la lipogenèse (acétylCoA carboxylase, FAS) chez des rats nourris pendant 2 semaines avec un régime contenant des protéines de lactosérum (25% de l'énergie fournie sous forme de protéines), comparés à des rats recevant un régime contenant des caséines (Morifuji *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent un effet direct de l'apport protéique sur la composition corporelle et la lipogenèse et suggèrent que certains acides aminés présents à forte teneur dans les protéines de lactosérum pourraient moduler le métabolisme des acides gras.

Chez les animaux adaptés aux régimes HP et HPL, les concentrations plasmatiques en acides aminés à jeun différaient peu de celles des rats adaptés au régime NP (Tab. 8). En revanche, à

l'état nourri, elles étaient supérieures, notamment celles des acides aminés indispensables et des AAR. Les AAR seraient de bons candidats pour expliquer l'effet des régimes HP et HPL sur la composition corporelle (Layman, 2003). En effet, ils ne sont pas métabolisés par le foie et sont captés majoritairement par le muscle, où ils stimulent la synthèse des protéines. Ils favorisent ainsi le maintien de la masse musculaire. De plus, ils jouent un rôle important dans le recyclage du glucose par l'intermédiaire du cycle alanine-glucose. D'après les travaux de l'équipe de Laymann *et al.*, ce cycle jouerait un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du glucose, notamment dans des conditions hyperprotéiques, et l'une de ses conséquences serait la moindre disponibilité du glucose pour la lipogenèse au niveau du tissu adipeux (Baum *et al.*, 2006). Cependant, cette hypothèse est à confirmer et les mécanismes possibles sont à préciser.

ARTICLE 2

Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. The Journal of Nutritional Biochemistry, in press.

Clémence Blouet, François Mariotti, Takashi Mikogami, Daniel Tomé et Jean-François Huneau.

Introduction et objectifs

Le glutathion joue un rôle central dans le maintien du statut redox de l'organisme, et le statut en glutathion est reconnu comme un bon marqueur de la capacité de l'organisme à contrer un challenge pro-oxydant (Schafer *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004). L'apport alimentaire en AAS fournit la cystéine, précurseur limitant de la synthèse de glutathion, et la teneur en AAS du régime influence la synthèse et le statut en glutathion de l'organisme à court et à moyen terme (Morand *et al.*, 1997).

Plusieurs études récentes ont mis en évidence que la période postprandiale représente un challenge pro-oxydant, dont le rôle serait central dans l'initiation des mécanismes précoces conduisant à l'IR et aux maladies cardio-vasculaires (Sies *et al.*, 2005). En particulier, l'hyperglycémie postprandiale induirait un déséquilibre du statut redox (Marfella *et al.*, 2001; Ceriello *et al.*, 2002; Ling *et al.*, 2003), susceptible d'entraîner un stress oxydant et d'affecter les mécanismes de régulation de la glycémie, une fonction très sensible au statut redox.

Par conséquent, une augmentation de la teneur en cystéine du repas pourrait prévenir ces altérations en modulant le statut en glutathion de l'organisme. Plusieurs études ont mis en évidence que des modulations du statut en glutathion induisaient des modulations parallèles des mécanismes de régulation de la glycémie. Chez le rat, la déplétion des stocks de glutathion induit une IR et une altération de la voie de signalisation de l'insuline. A l'inverse, une amélioration du statut en glutathion est associée à une augmentation de l'insulino-sensibilité chez l'Homme. Cependant, les effets de l'augmentation de la teneur du régime en AAS sur les mécanismes de la régulation glycémique dans des conditions physiologiques n'ont pas été explorés.

Pour ce faire, les protéines de lactosérum, en particulier l'α-lactalbumine, sont un bon outil car elles sont riches en cystéine. De plus, elles sont très digestibles et leur score chimique est élevé (Hall *et al.*, 2003).

Dans cette étude, nous avons exploré les effets de l'ingestion de protéines αLAC au cours d'un repas HS sur le statut en glutathion et la régulation de la glycémie postprandiale. Pour vérifier que les effets de l'αLAC étaient dus à leur forte teneur en cystéine, nous les avons comparés à ceux d'un apport supplémentaire en cystéine libre, fournie sous forme de NAC. Puis, nous avons évalué l'implication de la néosynthèse de glutathion dans ces effets par l'intermédiaire de l'utilisation du BSO, un inhibiteur spécifique de la synthèse de glutathion.

Méthodes

Les animaux ont tous été opérés une semaine avant le début de l'expérience pour la mise en place d'un cathéter veineux permettant le recueil d'échantillons de sang pendant la période postprandiale. Dans une première expérience, quatre groupes de 10 rats Wistar ont reçu un repas de 3 g contenant 72% de saccharose, 14% de protéines, et dont la source protéique était de l'αLAC (HSa) ou des protéines totales de lait seules (HS_0) ou supplémentées avec 17 mg (HS_1) ou 59 mg (HS_2) de NAC. La teneur en cystéine était 3,6 fois plus importante dans les repas HSa et HS_1 et 12 fois plus importante dans le repas HS_2 que dans le repas HS_0. Différents paramètres postprandiaux ont été suivis au cours des 3 heures suivant l'ingestion du repas. La glycémie a été mesurée à l'aide d'un réfractomètre portable (GlucoTrend, Roches). L'insulinémie a été évaluée par dosage ELISA (Rat insulin ELISA, Mercodia, Biovalley, France). Les concentrations en glutathion total et oxydé ont été déterminées par la méthode spectrophotométrique décrite par Anderson (Anderson, 1985).

La même expérience a été répétée sur quatre nouveaux groupes de rat en présence d'un inhibiteur de la synthèse de glutathion, le BSO, administré 1 heure avant le repas (4 $mmol.kg^{-1}$ s.c.). La cinétique d'inhibition de l'activité γ-GCS hépatique et l'évolution des statuts en glutathion hépatique et sanguin à cette dose de BSO avaient été préalablement étudiées afin de déterminer l'heure optimale d'injection.

Résultats et conclusions

En l'absence de BSO, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie postprandiales des animaux ayant reçu les repas HS_1 et HS_2 et HSa étaient inférieures à celles des rats ayant reçu le repas HS_0. L'effet dose de la teneur en cystéine du repas sur l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie postprandiales était significatif. Ces résultats suggèrent que la substitution de protéines totales de lait par de l'αLAC dans un repas HS améliore l'homéostasie du glucose pendant la période postprandiale, de même que l'ajout d'un donneur de cystéine.

L'inhibition de la synthèse de glutathion annulait les effets bénéfiques du NAC sur la régulation de la glycémie postprandiale, mais ne modifiait pas ceux de l'αLAC. Bien que le statut sanguin en glutathion mesuré au cours de la période postprandiale ne différait pas entre les groupes HS_0, HS_1 et HS_2, ces résultats indiquent que le NAC améliore la régulation de la glycémie par l'intermédiaire d'une augmentation de la disponibilité de la cystéine et de la synthèse de glutathion. En revanche, nos résultats indiquent que contrairement aux effets du donneur de cystéine, les effets bénéfiques de l'αLAC ne sont pas entièrement associés à la synthèse de glutathion, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes.

MEAL CYSTEINE IMPROVES POSTPRANDIAL GLUCOSE CONTROL IN RATS FED A HIGH-SUCROSE MEAL.

CLEMENCE BLOUET[1,2], FRANÇOIS MARIOTTI[1], TAKASHI MIKOGAMI[3], DANIEL TOME[1] AND JEAN-FRANÇOIS HUNEAU[1,4]

[1]UMR 914 INRA/INA P-G Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 75231 Paris, France.
[2]supported by an MRT grant from the french ministry for research.
[3]Armor Protéines SAS, 35460 Saint-Brice-en-Coglès, France.
[4]to whom correspondence should be addressed is Jean-François Huneau, at UMR 914 INRA/INA P-G Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France. E-mail: huneau@inapg.inra.fr.

running title: cysteine intake and glucose control

Keywords: α-lactalbumin; cysteine; N-acetylcysteine; glutathione; glucose homeostasis.

ABSTRACT

Whey proteins, particularly the α-lactalbumin fraction, are rich in cysteine and could therefore favour postprandial glucose homeostasis by a glutathione-mediated effect. This work investigates the effects of the ingestion of an α-lactalbumin-rich whey concentrate (α-LAC) during a high-sucrose meal on postprandial glucose homeostasis in healthy rats. In the first experiment, rats received a high-sucrose meal containing 14% protein, in which the protein source was either an α-LAC (HSa) or total milk proteins, alone (HS_0) or supplemented with 17 mg (HS_1) or 59 mg (HS_2) N-acetylcysteine (NAC). This resulted in a total cysteine content 3.6-fold higher in the HS_1 and HSa meals and 12-fold higher in the HS_2 meal, when compared to the HS_0 meal. Postprandial parameters were monitored for three hours after ingestion of the meal. The same measurements were performed on rats injected with 4 mmol/kg buthionine sulfoximine, a specific inhibitor of glutathione synthesis. Increasing the meal's cysteine content dose-dependently reduced both postprandial glucose and insulin ($p<0.05$). The inhibition of glutathione synthesis with BSO injection abrogated the beneficial effects of NAC supplementation on postprandial glucose response, but did not affect those of α-LAC. These results show that (1) the substitution of α-LAC for total milk protein reduces glucose response, as does the addition of a cysteine-donor to the meal (2) but, contrary to those of a simple cysteine donor, the beneficial effects of α-LAC are not entirely mediated by glutathione synthesis, suggesting additional mechanisms.

INTRODUCTION

Whey proteins have recently attracted a growing interest because of their promising nutritional properties associated with their high chemical score and good digestibility [1, 2]. Compared to many protein sources, whey proteins, particularly the α-lactalbumin fraction, are also rich in cysteine (cys), a precursor of the tripeptide glutathione (GSH, γ-glutamyl-cysteinyl-glycine), which plays a key role in body redox status [3]. Several experimental and clinical studies have reported an improvement in GSH status in response to whey protein ingestion under acute or chronic conditions of oxidative stress [4, 5].

A growing body of evidence suggests that GSH status could modulate glucose homeostasis. GSH depletion has been reported to decrease insulin sensitivity and impair insulin signalling in rats [6]. Conversely, intravenous GSH infusion has been shown to increase total body glucose disposal in healthy humans [7] and glucose-induced β cells insulin release in rats [8]. Because the postprandial increase in blood glucose has been shown to induce oxidative stress in diabetics and also in healthy subjects [9], the ingestion of cys-rich protein may help to maintain GSH status during the postprandial oxidative challenge and this may result in a better postprandial glycaemic regulation.

In the current study, we investigated in healthy rats the effects of the ingestion of an α-lactalbumin-rich whey concentrate (α-LAC) on postprandial glucose regulation during a high-sucrose meal (HS), a condition that challenges the oxidative balance. To ascertain that the effects of α-LAC were due to its high cys content, we compared the effects of α-LAC with those of N-acetylcysteine (NAC) supplementation, an effective cys donor [5]. Then, we examined the implication of GSH synthesis on the effects of α-LAC on glycaemic regulation using a specific inhibitor of the rate-limiting step of GSH synthesis, buthionine sulfoximine (BSO)[10].

METHOD AND MATERIALS

Experimental Design.

All experiments (Exp) fully complied with the guidelines of the French Committee for Animal Care. Male Wistar rats (Harlan, France), 6-weeks old and weighing 192 ± 4 g at the beginning of each experiment, were adapted to the laboratory conditions for the first week, housed in individual cages at 22 ± 2°C under a reverse light-dark cycle (lights on at 2100).

During Exp 1, the rats (n=40) were implanted with a soft catheter (Silastic, Perouse, France), fitted in the right jugular vein, that enabled the collection of large blood samples from conscious and unrestrained animals [11]. Rats were allowed a one week recovery and fed a standard AIN-93M diet [11]. During this week, they were adapted to semi-liquid food (water:powder 1:1) and fed two meals per day, one meal between 09:00 and 09:15 (6 g of moistened diet) and one large meal in the afternoon to complete their daily energy intake. This feeding schedule ensured the prompt

consumption of a calibrated meal in the morning. On the experimental day, rats were randomly assigned to a 6 g experimental meal. All meals were AIN-93M modified meals, isoenergetic, and contained 2.1 g sucrose and 420 mg protein. The protein source was either α-lactalbumin-rich whey protein (HSa) or total milk protein enriched with 17 mg NAC (HS_1), 59 mg NAC (HS_2) or not enriched (HS_0) (Table 1). After the usual 15 min, most rats had completed the meal, and those that had not finished by that time were fed the remaining food with a syringe. Blood samples were collected over the 3 hours following the ingestion of the meal.

During Exp 2, the kinetics of the inhibitory activity of BSO (Sigma Aldrich, France) on liver glutamate-cysteine ligase (GCL) and the subsequent kinetics of liver and blood GSH status were analysed. 16 rats were injected with 4 mmol/kg body weight BSO sc (dissolved in 0.9% sodium chloride, with the aid of 0.1 N sodium hydroxide, final pH 8.5), the optimum dose for GCL inhibition [12], and killed immediately (t=0) or 1, 2 or 4 hours after BSO injection (sodium pentobarbital, 30 mg/kg BW). Blood and liver samples were collected.

During Exp 3, the protocol used in Exp 1 was repeated on a new set of 40 rats. On the experimental day, rats were injected with 4 mmol/kg BSO 1 hour before the morning meal, the optimum time for GCL inhibition as determined during Exp 2, and fed their experimental meal as described in Exp 1. Blood samples were collected at time points indicated in figures 1-3.

Processing of blood and tissue samples and biochemical measurements.

Blood samples were collected in pre-chilled tubes (10% EDTA in Trasylol, Bayer), centrifuged and the resulting plasma was stored at -20°C until analysis. Blood glucose concentrations were measured using a refractometer (Glucometer, Bayer Diagnostics). Plasma insulin was detected using an ELISA assay (Mercodia Insulin ELISA, Biovalley). The insulin sensitivity index (ISI) was calculated using the following formula, derived from the Belfiore formula [13]: 2/[(Insp•Glyp)+1][1]. Oxidized (GSSG) and total GSH concentrations were measured in samples homogenized in 5% trichloroacetic acid using a spectrophotometric method [14]. The GSSG:GSH ratio (GSHr) was used as an indicator of blood and tissue redox status [3]. Glutamate-cysteine ligase activity was assessed using a fluorimetric assay [15].

Statistical analysis.

Data are given as mean values and standard errors (± SEM). All kinetics were analysed using mixed models for repeated-measure analysis (SAS Institute, Cary, NC). In a first model, time and meal were used as independent fixed factors. In an alternative model, the meal variable was subdivided into the protein source and the meal's cys content. Multiple comparisons were made using orthogonal

[1] Insp : area under the insulin curve above baseline ; Glyp : area under the glucose curve above baseline

contrasts under mixed models. The threshold of statistical significance was set at $P<0.05$ and the statistical trend at $P<0.1$.

RESULTS

Effects of α-LAC and NAC supplementation on postprandial glucose control and GSH status.

The nature of the meal significantly influenced postprandial blood glucose response (meal effect, $P<0.05$; time effect, $P<0.05$; time×meal effect, $P<0.1$)(Fig. 1A). In the HS_1 and HS_2 groups, blood glucose levels at 15 min were lower than in the HS_0 group. Blood glucose returned to baseline earlier in the HS_2 and HSa groups than in the HS_0 group, and was significantly lower at 75 min or 135 min. Glucose AUC (area under the curve) values were significantly lower in HS_2 rats than in HS_0 rats ($P<0.05$) and tended to be lower in HS_1 and HSa rats than in HS_0 rats ($P<0.1$)(Fig. 1C). The effect of the meal's cys content on postprandial AUC values was significant. Posprandial insulin response was also influenced by the type of meal (meal effect, NS; time effect, $P<0.05$; time×meal effect, $P<0.05$). Insulin peaks at 15 min were lower in HSa and HS_2 rats than in HS_0 rats ($P<0.05$)(Fig. 1B). Insulin AUC values were significantly lower in HS_2 rats than in HS_0 rats ($P<0.05$), tended to be lower in HS_1 rats ($P<0.1$), while they did not differ between HSa and HS_0 rats (Fig. 1D). The effect of the meal's cys content on postprandial insulin AUC values was significant. The postprandial ISI was lower in HS_2 rats than in HS_0 rats ($P<0.05$)(Fig. 1E), and was significantly affected by the meal's cys content, indicating higher postprandial insulin sensitivity. Blood GSH concentrations, measured at three time points (at 0, 75 and 195 min), did not vary after the meal ingestion (data not shown). The blood GSHr was not affected by the meal either, but tended to be lower in HS_2 rats than in HS_0 rats 195 min after the meal ($P<0.1$) (Fig. 1D).

Effects of BSO injection on liver GCL activity and liver and blood GSH concentrations.

One hour after the BSO injection, liver GCL activity decreased dramatically to 37% of the initial activity ($P<0.001$), but tended to recover thereafter, reaching 80% of initial activity 4 hours after the BSO injection (Fig. 2A). In the liver, total GSH concentrations declined persistently after the BSO injection ($P<0.05$), leading to a significantly lower GSH level 2 hours after the injection (Fig. 2B). In parallel, the liver GSHr was significantly increased 2 hours after the BSO injection (Fig. 2B). Conversely, blood total GSH levels increased significantly between 0 and 2 hours, and the blood GSHr significantly decreased between 0 and 1 hour (Fig. 2C).

Effects of α-LAC and NAC supplementation on postprandial glucose control during the inhibition of GSH synthesis.

Following the BSO injection, neither postprandial glucose and insulin responses, nor glucose or insulin AUC values or postprandial ISI differed between HS_1, HS_2 and HS_0 groups (Fig. 3). In contrast, postprandial blood glucose kinetics in HSa rats significantly differed from that of HS_0 rats. Blood glucose levels at 15 min were lower in HSa than in HS_0 rats ($P<0.05$), and glucose AUC was lower in HSa rats than in HS_0 rats, although the difference did not reach statistical significance. The protein source affected blood glucose kinetics ($P<0.05$) and tended to alter AUC values ($P<0.1$). Postprandial insulin response did not significantly differ according to the meal. Blood GSH concentrations were measured at four time points (before the BSO injection and at 0, 75 and 135 min). After an initial 30% decrease during the first hour following the BSO injection, blood total GSH levels remained stable throughout the study period (data not shown). Blood GSHr significantly decreased over time in HS_1, HSa and HS_2 rats, but remained stable in the HS_0 rats, resulting in a lower GSHr in HS_2 rats than in HS_0 rats at 135 min ($P<0.05$) (Fig. 3).

DISCUSSION

The major outcome of this work was that increasing the cys content of a HS meal, either by substituting α-LAC for total milk protein or by adding a cys donor, reduced postprandial blood glucose response. However, although the effect of α-LAC can be mimicked by the addition of cys to the meal, our data suggest that the underlying mechanisms are not entirely mediated by GSH synthesis.

NAC supplementation, which was used to control the effect of meal cys, dose-dependently improved postprandial glucose regulation following a HS meal through a mechanism that involves GSH synthesis. The latter point is mainly supported by the observation that the substantial impacts of NAC-supplementation on glucose control were abrogated after inhibition of GSH synthesis. When comparing the results of the third experiment with those of the first experiment, it was possible to speculate that BSO injection per se lowered postprandial blood glucose and insulin responses. Although such an effect can not be completely ruled out, it is unlikely that this effect could account for the lack of difference between groups during the third experiment, in view of the substantial effect of NAC evidenced in the first experiment. Although we did not observe any modification of postprandial total GSH concentrations and GSHr corresponding to the meals, an effect of NAC supplementation on GSH turnover and hepatic efflux can not be precluded, though these data were not obtainable in the current study. Indeed, liver and blood GSH pools are not interrelated simply. The liver is the main site of GSH synthesis and storage, and hepatic GSH turnover and output are high in order to maintain extra-hepatic GSH levels, that are tightly regulated. Therefore, liver GSH levels are

an indication of body GSH stores whereas blood GSH values reflect GSH delivery to peripheral tissues [16, 17].

Previous studies have suggested the beneficial effects of NAC on glucose homeostasis. NAC infusion has been reported to improve insulin sensitivity in healthy subjects during a hyperglycaemic clamp [18], and, more recently, the infusion of 0.35 mg/kg/min NAC during a hyperglycaemic clamp was shown to lower insulin concentrations and C-peptide levels and prevent hyperglycaemia-induced insulin resistance in rats [19]. In both studies, the authors concluded that NAC improved glucose regulation through a direct antioxidant effect. However, because both studies used intravenous NAC delivery, they are indeed more relevant to the direct effects of NAC than to its role as a cys donor when given orally. In the latter physiological context, NAC is known to undergo an extensive first-pass deacylation and has been reported to improve post-meal liver GSH status in rats [5]. It has been suggested that GSH per se could modulate glucose tolerance and favor postprandial peripheral glucose disposal through its contribution to the hepatic insulin sensitising substance (HISS) [20]. According to the HISS hypothesis, the effect of insulin on glucose disposal after a meal is accounted for in approximately equal measures by the direct action of insulin and the action of HISS released from the liver acting on skeletal muscle [21]. Guarino and collaborators suggested that HISS release depends upon the hepatic production of GSH [20]. The positive effects of oral NAC on postprandial glycaemic control could then arise from its contribution to HISS production.

Although previous studies demonstrated that GSH depletion impairs glycaemic regulation [6], our study is the first to demonstrate that increasing meal's cys content promotes postprandial glucose disposal by a GSH-mediated effect.

The current study also suggests that the effect of α-LAC on postprandial glucose regulation can not be solely accounted for by its high cys content, even though a role for α-Lac as a cys donor and GSH precursor has been previously documented [5] and can not be excluded from our results. The observation that inhibition of the GSH synthesis abrogated the effect of NAC but not that of αLac provides support for the involvement of an alternative mechanism. Previous studies have reported the ability of whey, when compared to other protein sources such as milk protein or cod protein, to reduce postprandial glycaemic response in both healthy and type 2 diabetic subjects [22, 23]. They concluded that specific amino acids, in particular leucine and isoleucine, which have been shown to increase skeletal muscle glucose uptake [24, 25], were good candidates to explain this observation.

In conclusion, our results show that increasing the content of cys in the meal dose-dependently decrease postprandial glucose response, in a way similar to a cysteine donor or a cysteine-rich protein. However, in contrast to the effect of a simple cysteine donor, our data suggest that the effect of α-lactalbumin is not entirely mediated by GSH synthesis.

REFERENCES

1. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. Br J Nutr. 2003; 89:239-48.
2. Ha E, Zemel MB. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). J Nutr Biochem. 2003; 14:251-8.
3. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med. 2001; 30:1191-212.
4. Bounous G, Gervais F, Amer V, Batist G, Gold P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. Clin Invest Med. 1989; 12:343-9.
5. Mariotti F, Simbelie KL, Makarios-Lahham L, Huneau JF, Laplaize B, Tome D, Even PC. Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. J Nutr. 2004; 134:128-31.
6. Khamaisi M, Kavel O, Rosenstock M, Porat M, Yuli M, Kaiser N, Rudich A. Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. Biochem J. 2000; 349:579-86.
7. Paolisso G, Di Maro G, Pizza G, D'Amore A, Sgambato S, Tesauro P, Varricchio M, D'Onofrio F. Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. Am J Physiol. 1992; 263:E435-40.
8. Ammon HP, Klumpp S, Fuss A, Verspohl EJ, Jaeschke H, Wendel A, Muller P. A possible role of plasma glutathione in glucose-mediated insulin secretion: in vitro and in vivo studies in rats. Diabetologia. 1989; 32:797-800.
9. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. J. Nutr. 2005; 135:969-72.
10. Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport--selective alteration of glutathione metabolism. Nutr Rev. 1984; 42:397-410.
11. Burvin R, Zloczower M, Karnieli E. Double-vein jugular/inferior vena cava clamp technique for long-term in vivo studies in rats. Physiol Behav. 1998; 63:511-5.
12. Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrova N, Abukhalaf IK, Bayorh MA. Acute inhibition of glutathione biosynthesis alters endothelial function and blood pressure in rats. Eur J Pharmacol. 2002; 454:217-23.
13. Belfiore F, Iannello S. Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods. Mol Genet Metab. 1998; 65:121-8.
14. Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Methods Enzymol. 1985; 113:548-55.
15. White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. Anal Biochem. 2003; 318:175-80.
16. Stipanuk MH. Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. Neurochem Res. 2004; 29:105-10.

17. Richie JP, Komninou D, Leutzinger Y, Kleinman W, Orentreich N, Malloy V, Zimmerman JA. Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. Nutrition. 2004; 20:800-5.
18. Ammon HP, Muller PH, Eggstein M, Wintermantel C, Aigner B, Safayhi H, Stutzle M, Renn W. Increase in glucose consumption by acetylcysteine during hyperglycemic clamp. A study with healthy volunteers. Arzneimittelforschung. 1992; 42:642-5.
19. Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, Giacca A, Fantus IG. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003; 285:E744-53.
20. Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF, Macedo MP. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003; 284:G588-94.
21. Lautt WW. A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. J Pharmacol Sci. 2004; 95:9-17.
22. Calbet JA, MacLean DA. Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. J Nutr. 2002; 132:2174-82.
23. Frid AH, Nilsson M, Holst JJ, Bjorck IM. Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. Am J Clin Nutr. 2005; 82:69-75.
24. Doi M, Yamaoka I, Fukunaga T, Nakayama M. Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 312:1111-7.
25. Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 299:693-6.

FIGURES LEGENDS:

Figure 1. Postprandial glucose (A), insulin (B), glucose AUC (C), insulin AUC (D), insulin sensitivity index (E) and GSHr at 195 min (F) following the ingestion of the HS_0, HS_1, HS_2 and HSa meals. Data are means ± SEM, n=10. *P<0.05 vs. HS_0. Means not sharing a common superscript letter differ, P<0.05. AUC (area under the curve) values, calculated above baseline, are expressed as percentages of the mean in the control group (HS_0).

Figure 2. Kinetics of the inhibitory activity of buthionine sulfoximine (BSO) on liver glutamate-cysteine ligase activity (A) and subsequent evolution of liver (B) and blood (C) GSH status. Data are means ± SEM, n=4. *P<0.05 vs. t=0.

Figure 3. Postprandial glucose (A), insulin (B), glucose AUC (C), insulin AUC (D), insulin sensitivity index (E) and GSHr at 195 min (F) following the ingestion of the HS_0, HS_1, HS_2 and HSa meals with inhibition of GSH synthesis. Data are means ± SEM, n=10. *P<0.05 vs. HS_0. Means not sharing a common superscript letter differ, P<0.05. AUC (area under the curve) values, calculated above baseline, are expressed as percentages of the mean in the control group (HS_0).

TABLE LEGENDS:

Table 1: Protein and amino acid composition of the experimental meals. The protein sources were prepared from bovine milk and provided by Armor Protéines SAS

Figure 1 :

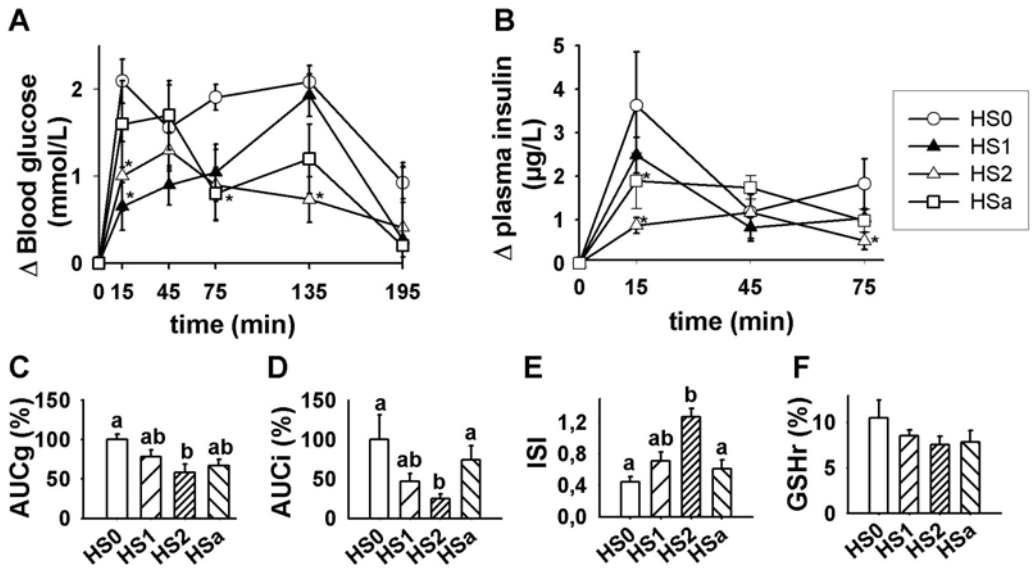

A
Δ Blood glucose (mmol/L)
time (min)
B
Δ plasma insulin (µg/L)
time (min)
HS0
HS1
HS2
HSa
C
AUCg (%)
D
AUCi (%)
E
ISI
F
GSHr (%)

Figure 2 :

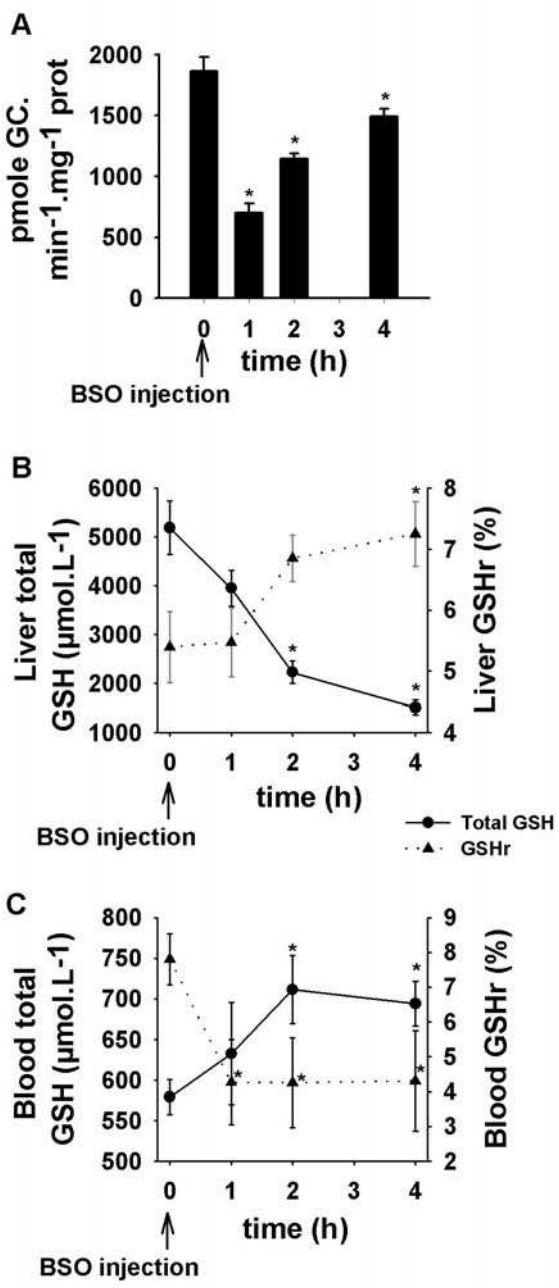

A
pmole GC. min-1.mg-1 prot
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4
time (h)
BSO injection
B
Liver total GSH (µmol.L-1)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
Liver GSHr (%)
8
7
6
5
4
0 1 2 3 4
time (h)
BSO injection
Total GSH
GSHr
C
Blood total GSH (µmol.L-1)
800
750
700
650
600
550
500
Blood GSHr (%)
9
8
7
6
5
4
3
2
0 1 2 3 4
time (h)
BSO injection

Figure 3 :

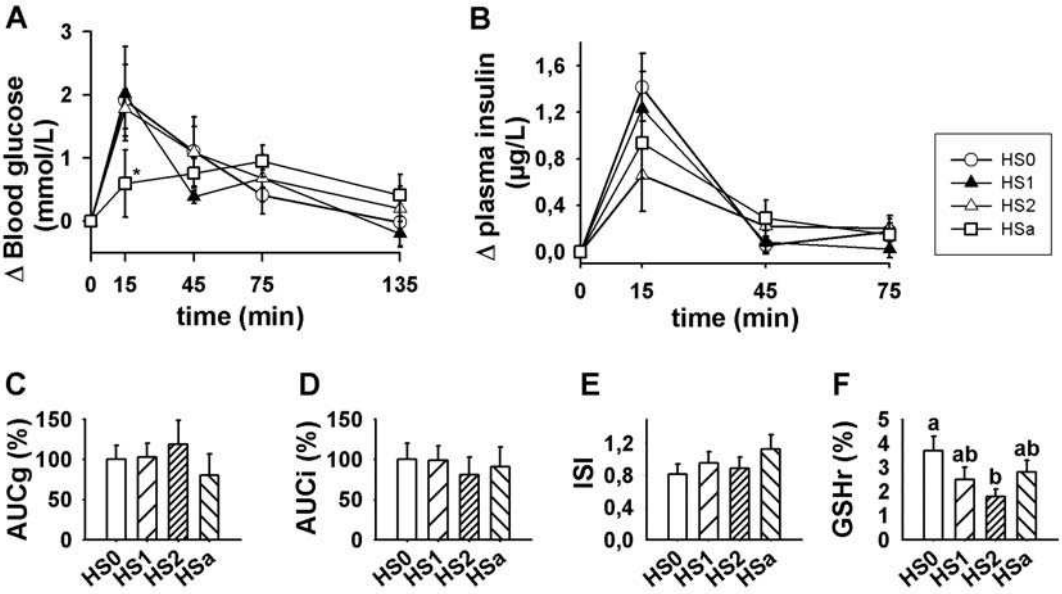

A
Δ Blood glucose (mmol/L)
3
2
1
0
*
0 15 45 75 135
time (min)
B
Δ plasma insulin (µg/L)
1,6
1,2
0,8
0,4
0,0
0 15 45 75
time (min)
HS0
HS1
HS2
HSa
C
AUCg (%)
150
100
50
0
HS0 HS1 HS2 HSa
D
AUCi (%)
150
100
50
0
HS0 HS1 HS2 HSa
E
ISI
1,2
0,8
0,4
0,0
HS0 HS1 HS2 HSa
F
GSHr (%)
5
4
3
2
1
0
a
ab
b
ab
HS0 HS1 HS2 HSa

Table 1:

	HS_0	HS_1	HS_2	HSa
Protein composition[1]	g/100 g protein			
Casein	80	80	80	0
β-lactoglobulin	11	11	11	15.2
α-lactalbumin	4	4	4	59.8
Serum albumin	1	1	1	20
Amino acids content[2]	mg in the experimental 3g meal			
Isoleucine	20.7	20.7	20.7	21.4
Leucine	37.5	37.5	37.5	42.8
Valine	27.5	27.5	27.5	18.9
Methionine	9.3	9.3	9.3	3.6
Cysteine	3.6	3.6	3.6	16.4
N-acetylcysteine	0	17.3	58.8	0
Equivalent total cysteine content	*3.6*	*16.4*	*48.1*	*16.4*

[1] The protein compositions were determined by gel permeation chromatography on a TSK-gel column.

[2] The amino acid compositions were estimated, based on the protein composition.

ARTICLE 3

Increasing the dietary cysteine intake alleviates the adverse effects of a high-sucrose diet on oxidative stress and glucose homeostasis in rats. Free radicals Biology and Medicine, in press.

Clémence Blouet, François Mariotti, Dalila Azzout-Marniche, Véronique Mathé, Takashi Mikogami, Daniel Tomé et Jean-François Huneau.

Introduction et objectifs

Un ensemble d'études épidémiologiques, cliniques et expérimentales indiquent que le stress oxydant joue un rôle important dans la physiopathologie de l'IR. Plusieurs études longitudinales réalisées sur des cohortes de sujets non diabétiques ont observé une corrélation positive entre la glycémie à jeun, l'index HOMA et des marqueurs du stress oxydant (Gopaul *et al.*, 2001; Trevisan *et al.*, 2001). Chez l'Homme insulino-résistant, un apport supplémentaire en antioxydant induit une amélioration du statut redox et de l'insulino-sensibilité (Manning *et al.*, 2004). Enfin, les modèles expérimentaux d'induction de l'IR chez l'animal, en particulier celui du rat nourri avec un régime riche en saccharose ou en fructose, indiquent que le stress oxydant, notamment au cours de la période postprandiale, est impliqué dans l'initiation des mécanismes d'induction de l'IR (Pagliassotti *et al.*, 1997; Busserolles *et al.*, 2002a). Dans ce modèle, l'amélioration du statut redox pourrait prévenir l'altération des mécanismes de régulation de la glycémie et l'IR associée (Faure *et al.*, 1997).

Les données de l'article 2 suggèrent que l'augmentation de l'apport en cystéine au cours d'un repas HS améliore la régulation de la glycémie postprandiale. Cet effet pourrait être médié par une augmentation de la synthèse de glutathion, puisque l'apport en AAS module la synthèse et le turnover du glutathion (Morand *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 2000; Richie *et al.*, 2004). Bien que plusieurs études indiquent que dans des conditions où la balance pro-/antioxydant est altérée, l'augmentation de l'apport en AAS est associée à une amélioration du statut redox (Badaloo *et al.*, 2002; Micke *et al.*, 2002; Mariotti *et al.*, 2004), les effets sur la régulation de la glycémie et l'insulino-sensibilité à long terme ne sont pas établis.

Dans cette étude, nous avons exploré les effets d'une augmentation nutritionnelle de la teneur en cystéine du régime sur le statut en glutathion, le stress oxydant, la sensibilité à l'insuline et l'activation de la voie de signalisation de l'insuline chez le rat nourri avec un régime HS.

Pour ce faire, nous avons utilisé l'αLAC, une source protéique naturellement riche en cystéine. Nous avons comparé les effets de cette source protéique à ceux d'un apport supplémentaire en NAC, un donneur de cystéine.

Méthodes

Cinq groupes de 8 rats ont reçu un régime standard (ST, équivalent au régime NP présenté dans le tableau 6) ou des régimes HS (le saccharose représentait la source exclusive de glucides), dont la source protéique était de l'αLAC (HSa) ou des protéines totales de lait, seules (HS_0), ou enrichies en NAC à 5,5 g (HS_1) ou 16 g (HS_2) par kilogramme d'aliment. Le régime HS_1 apportait la même dose équivalente de cystéine que le régime HSa.
Après 3 et 6 semaines de régime, le stress oxydant a été évalué par la mesure de différents paramètres (carbonylation des protéines plasmatiques, hépatiques et musculaires ; glycation de l'hémoglobine ; défenses antioxydantes totales plasmatiques ; activité de la glutathion peroxidase érythrocytaire). Le statut en glutathion sanguin et tissulaire a été mesuré et le potentiel de demi-cellule du couple redox du glutathion a été utilisé comme indicateur du statut redox. La tolérance au glucose a été mesurée après 5 semaines de régime et l'insulino-sensibilité a été évaluée par la mesure de l'insulinémie et de la glycémie à jeun. De plus, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline en réponse à une stimulation insulinique a été évaluée par la mesure du degré de phosphorylation des protéines IRS_1 et Akt musculaires et hépatiques.
Un second lot d'animaux, préalablement implantés d'un cathéter veineux, a été réparti en quatre groupes et soumis aux régimes HS_0, HS_1, HS_2 et HSa pendant 4 semaines. A l'issu de cette période d'adaptation aux régimes expérimentaux, plusieurs paramètres postprandiaux ont été suivis suite à l'ingestion d'un repas calibré de 3g. La glycémie, l'insulinémie, le statut en glutathion sanguin et les concentrations plasmatiques en acides aminés ont été ainsi suivis au cours de la période postprandiale.

Résultats et conclusions

La consommation du régime HS_0 était associée à une augmentation significative du stress oxydant, comme l'indiquaient les niveaux de carbonylation des protéines plasmatiques et musculaires et le statut en glutathion sanguin, hépatique et musculaire des rats HS_0 comparés aux rats ST. L'augmentation de l'apport en cystéine prévenait la dégradation du statut en glutathion et l'augmentation du stress oxydant de façon dose-dépendante.

La consommation du régime HS_0 était également associée à une dégradation de la tolérance au glucose, de l'insulino-sensibilité, telle qu'évaluée par l'insulinémie à jeun et l'index de sensibilité à l'insuline de Belfiore, de la régulation de glycémie au cours de la phase postprandiale et de l'activation de la voie de signalisation de l'insuline en réponse à une stimulation insulinique. L'augmentation de l'apport en cystéine prévenait de façon dose-dépendante la dérégulation de la glycémie associée à la consommation du régime HS. La diminution du niveau de phosphorylation des protéines IRS1 musculaire sur leurs résidus tyrosine et des protéines Akt musculaires et hépatiques sur leurs résidus sérine, observée chez les rats HS_0, était prévenue partiellement chez les rats HS_2.

Ces résultats montrent qu'une augmentation de l'apport en cystéine prévient les effets délétères de la consommation d'un régime HS chez le rat. Nos données suggèrent que les effets bénéfiques de la cystéine sont associés à une augmentation de l'export de glutathion hépatique, qui améliore le statut redox et protège la voie de signalisation de l'insuline des effets délétères de l'excès de glucose.

Article 3

Original Contribution

Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance

Clémence Blouet[a,*], François Mariotti[a], Dalila Azzout-Marniche[a], Véronique Mathe[a], Takashi Mikogami[b], Daniel Tome[a] And Jean-François Huneau[a,♦]

[a]UMR914, INRA, INAPG Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, France.
[b]Armor Protéines SAS, 35460 Saint-Brice-en-Coglès, France.

[*]supported by an MRT grant from the French Ministry for Research.
♦Corresponding author. UMR 914 INRA/INA P-G Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France. huneau@inapg.inra.fr. Phone: (00.33)1.44.08.17.15. Fax: (00.33)1.44.08.18.25.

Running title: cysteine and glucose control

ABSTRACT

Diets that promote oxidative stress favor impairment in glucose homeostasis. In this context, increasing the cysteine intake may be beneficial by maintaining glutathione status. We have investigated the effects of dietary cysteine on oxidative stress and glucose homeostasis in rats fed a high-sucrose (HS) diet. Rats were assigned for 6 weeks to a standard diet (ST) or to HS diets in which the protein source was either an α-lactalbumin-rich whey concentrate (a cysteine-rich protein, HS_a), or total milk proteins, alone (HS_0) or supplemented with 5.8 g (HS_1) or 20 g (HS_2) N-acetylcysteine per kg of food. Increasing the cysteine intake prevented HS-induced oxidative stress, as assessed by blood and tissue glutathione and carbonyl levels. At the same time, the HS-induced glucose intolerance, impaired postprandial glycemic control and decrease in muscle and liver insulin-induced activation of IRS_1 and Akt were prevented by increasing the level of dietary cysteine, a major original finding. Of great interest was the observation that all beneficial effects of cysteine supplementation were duplicated by the consumption of a cysteine-rich protein. These data show that increasing the cysteine intake limits HS-induced impairment of glucose homeostasis and suggest that these effects are mediated by a reduction in oxidative stress.

Key words: Glucose Control, Oxidative Stress, Antioxidants, Glutathione, Dietary Cysteine

INTRODUCTION

Considerable attention has recently been paid to oxidative stress being a probable initiating event in the pathogenesis of insulin resistance (IR) [1; 2]. Several epidemiological surveys have reported a correlation between oxidative stress and IR [3-5]. A causative link is further suggested by experimental studies, which showed that antioxidant supplementation, with either vitamin E or α-lipoic acid, could prevent or reduce IR [6-8]. In addition, various experimental models of IR induction indicate that oxidative stress plays a critical role in the onset of this condition [9], particularly high-sucrose (HS) or high fructose diets [10]. In these latter models, hyperglycemia, especially during the postprandial period, is acknowledged as a direct source of oxidative stress through various mechanisms that could be related to the overproduction of superoxide by the mitochondrial electron-transport chain [11]. The resulting impairment in the cellular redox state was reported to decrease the tyrosine phosphorylation of IRS1 and increase its the serine phosphorylation, two events which lead to inactivation of the insulin signaling pathway [2; 12].

Glutathione (GSH, γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) is a tripeptide involved in a variety of physiological functions. GSH is a major determinant of the intracellular redox balance and is involved in protection against free-radical induced oxidative injuries [13]. GSH synthesis and turnover are modulated by dietary protein [14; 15] and particularly by dietary sulfur amino acids (SAA) [16-18], because they provide cysteine, the limiting amino acid for GSH synthesis. Although several experimental and clinical studies have reported an improvement in GSH status (i.e. total GSH and its redox state) in response to an increase in the dietary SAA content [19; 20], the potential benefits regarding glycemic control are unknown.

The purpose of the current work was to investigate whether an increase in dietary cysteine intake could prevent the impairment of glucose homeostasis induced by a 6-weeks consumption of an HS diet. We modulated dietary cysteine intake using either a cysteine-rich protein (an α-lactalbumin-rich whey concentrate, αLAC) or cysteine per se, given as N-acetylcysteine (NAC), which is an effective cysteine donor [19].

MATERIALS AND METHODS

All experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Committee for Animal Care, using male Wistar rats (Harlan, France) which were 6 weeks old at the beginning of the study. The rats were adapted to laboratory conditions under a reverse light-dark cycle, as previously described [21]. Five AIN-93M modified isocaloric diets were used (Table 1): a standard starch diet (ST) and HS diets in which the protein source was either an α-lactalbumin-rich whey concentrate (HS_a) or total milk protein enriched with 5.8 g (HS_1) or 20 g (HS_2) NAC per kg of food, or not enriched (HS_0). The HS_a diet provided the same amount of cysteine as the HS_1 diet. The animals were allowed free access to tap water.

Forty rats were randomly assigned to five dietary groups (ST, HS_0, HS_1, HS_2 and HS_a) for 6 weeks. Body weight and food intake were monitored weekly. An oral glucose tolerance test was performed at week 5 as follows. Overnight fasted rats received glucose orally (1 g/kg BW) and blood was collected from the tail vein at the indicated time. Fasting blood samples were collected during week 3. At week 6, overnight fasted rats were anesthetized (sodium pentobarbital, 30 mg/kg BW, i.p.), and blood and tissue samples were collected. The retroperitoneal adipose tissue was isolated and weighted.

Because postprandial hyperglycemia has been reported to play a critical role in glucose-induced oxidative stress and insulin resistance [1; 22], a postprandial study was also performed on a separate group of rats, to investigate the effects of the experimental diets on postprandial oxidative stress and glucose homeostasis. Rats (n=40) were surgically implanted with a soft heparin-locked catheter chronically fitted in the right jugular vein, as previously described [23]. Rats were allowed to a 1-week recovery, fed the ST diet and adapted to semi-liquid food (water:powdered diet, 1:1) and to a feeding schedule consisting in a 6 g calibrated morning meal given between 09:00 and 09:15, and an afternoon meal ad libitum to complete their daily energy intake. This schedule ensured prompt consumption of the calibrated morning meal. Rats were then assigned to four groups (HS_0, HS_1, HS_2, HS_a) and fed the corresponding diets for 5 weeks. After 4 weeks, blood samples were withdrawn twice at baseline (t=-15 and t=0 min) and at the indicated time after the meal to determine blood postprandial glucose, insulin, GSH and amino acids.

Analytical procedures. Unless specified otherwise, all chemicals were obtained from Sigma (France). Blood samples were dropped into prechilled tubes containing 0.7% EDTA and 0.014% aprotinin and the resulting plasma was stored at -20°C. Glucose concentrations were measured using a Glucometer (Roche Diagnostics, France). Insulin was detected by a solid phase two-site enzyme immunoassay (Mercodia Rat Insulin ELISA, Biovalley, France). The insulin sensitivity index (ISI) was calculated as follows [24]: 2/[(Insp•Glyp)+1][*]. Amino acid concentrations were determined by HPLC with postcolumn ninhydrin derivatization (Biotek Instruments), as previously described [25]. Protein carbonyl concentrations were measured using a spectrophotometric assay described by Levine [26]. Oxidized (GSSG) and total GSH concentrations were measured using the enzymatic recycling method described by Anderson [27]. Briefly, blood and tissue samples were deproteinized at 4°C using 5 % trichloracetic acid immediately after collection and glutathione assay occurred within four hours following sample preparation, in order to minimize glutathione auto-oxidation. The rate of 5-thio-2-nitrobenzoic acid production from 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid in the presence of glutathione reductase and NADPH was monitored spectrophotometrically at 405 nm and was proportional to the concentration of total GSH in the sample. To determine GSSG concentration, reduced GSH was first derivatized with 2-vinyl-pyridine at slightly acidic pH. The reduction potential of the GSSG/2GSH half-cell (GSH Ehc), an indicator of intracellular redox status, was calculated using the following formula [13]: GSH Ehc (mV) = -264-(59.1/2)·log (GSH^2/GSSG). We also quantified glycated hemoglobin (HbA1c, BioSystems, Biocade, France), triglycerides (Triglycérides, Biomérieux, France) and free fatty acids (NEFA-C, Wako, Oxoid, France) using biochemical kits. The plasma oxygen radical absorbent capacity (ORAC) was determined using a fluorimetric assay [28]. Liver glutamate-cysteine ligase (GCL) and erythrocyte GSH-peroxidase activities were assessed according to the methods described by White [29] and Paglia [30], respectively.

Activation of the insulin signaling pathway. After anesthesia (sodium pentobarbital, 30 mg/kg BW, i.p.), rats received a bolus of insulin (30 µg/kg BW) injected into the vena cava. Liver and muscle fragments were collected 5 min later and homogenized in ice-cold buffer (1% Triton, 20 mmol/L Tris (pH=7.4), 137 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L

---

[*] different from t=0, P<0.05

sodium fluoride, 1 mmol/L phenylmethylsulfonic fluoride and antiprotease cocktail). 2 mg of total proteins were immunoprecipitated with IRS_1 antibody (Upstate) at 4°C overnight, followed by SDS-PAGE, transfer to PVDF membranes and blotting with anti-phosphotyrosine (Santa Cruz) antibody. After incubation at 60°C for 30 min in a stripping buffer (Tris-HCl 62.5 mmol/L, SDS 2%), the membrane was re-blotted with anti-IRS_1 (Becton Dickinson). In direct immunoblot experiments, 100 µg of protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, blotted with anti-phospho-Akt antibody (Cell Signaling Technology), stripped and re-blotted with anti-Akt antibody (Cell Signaling Technology). Detection was performed after incubation with horseradish peroxidase-linked secondary antibody, chemiluminescence and quantification using densitometry.

Real time quantitative PCR. Gene expression analysis was performed with a light-Cycler (MyiQ Real-Time PCR Detection System, Roche Diagnostics, France) using SYBR GreenI DNA binding dye (Eurogentec, RT-SN10-05NR). cDNA was synthesized from 2 µg RNA using a PTC-200 thermocycler (MJ Research, USA). The following primers were used: GCL regulatory subunit, forward primer: CAGTGGGCACAGGTAAAAC, reverse primer: GAGCAGTTCTTTTGGGTCA; GCL catalytic subunit, forward primer: TGTTATGGCTTTGAGTGCTG, reverse primer: GATTGTTCTTCAGGGGCTC. Samples contained 0.6 µL SYBR Green Master Mix, 0.2 nmol primers and 125 ng cDNA in a 20 µL final volume. The PCR conditions were as follows: 10 min at 95°C, then 40 cycles of 15 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 1 min at 72°C. Ribosomal 18S RNA was used as the internal standard.

Statistical analysis. Results are means ± standard errors. All kinetics were analyzed using mixed models for repeated-measures analysis (SAS Institute, Cary, NC). In a first model, time and meal were used as independent fixed factors. In an alternative model, the meal variable was subdivided into the dietary saccharose level, the protein source and the dietary cysteine level. Multiple comparisons were made using orthogonal contrasts under mixed models. Pearson correlations were calculated using the SAS Corr procedure. The threshold of statistical significance was set at $P<0.05$ and the statistical trend at $P<0.1$.

RESULTS

Food intake, growth and metabolic characterization of rats.

Average food intake was not modified by the type of diet (319.3 ± 5.5 kJ/day), neither were growth, final body weight and retroperitoneal fat pad weight (data not shown). Fasting blood glucose levels did not differ between groups after 5 weeks (Table 2). Fasting plasma insulin levels increased over time and were higher in HS_0 and HS_1 rats than in ST rats at week 5, whereas they did not differ between ST, HS_a and HS_2 rats (Table 2). Fasting insulin values at week 5 differed significantly as a function of the protein source. Plasma triglyceride levels were higher in HS_0 rats than in ST rats at week 6, whereas they did not differ between ST, HS_1 and HS_2 rats (Table 2). Plasma free fatty acid levels did not differ between the groups after 6 weeks (data not shown).

At week 4, the plasma concentrations of branched-chain amino acids, which did not differ between groups after fasting, increased after the ingestion of αLAC ($P<0.05$), but not after the other meals (supplemental Table 1).

Conversely, plasma proline levels rose after the total milk protein meals but not after the ingestion of αLAC (supplemental Table 1).

GSH-related parameters

Plasma sulfur amino acid concentrations

Fasting plasma taurine concentrations were higher in HS_2 and HS_1 rats than in HS_0 rats (68 ± 13, 94 ± 17, 114 ± 7 and 79 ± 15 µmol/L in HS_0, HS_1, HS_2 and HS_a rats, respectively), being significantly affected by the dietary cysteine content. All other fasting plasma SAA concentrations did not differ between groups. Plasma taurine concentrations did not change during the postprandial period (data not shown). In contrast, plasma cysteine concentrations decreased between 0 and 45 min in HS_0 rats ($P<0.05$), were not modified by the meal in HS_1 and HS_a rats but increased between 0 and 45 min in HS_2 rats ($P<0.05$, Figure 1A), resulting in higher cysteine concentrations in HS_2 rats at 45 min and in HS_a and HS_2 rats at 135 min after the meal. Plasma methionine concentrations increased similarly in HS_1, HS_2 and HS_a rats between 0 and 45 min after meal ingestion ($P<0.05$), but were not modified by the meal in HS_0 rats (data not shown).

Hepatic GCL expression and activity

Hepatic GCL activity at week 6 was similar in ST and HS_0 rats, and was lower in HS_1 and HS_2 rats than in ST and HS_0 rats (Table 3), with a significant effect of the dietary cysteine content. Similarly, the hepatic mRNA concentration of the γ-GCL catalytic subunit did not differ between ST and HS_0 rats and was lower in HS_1, HS_2 and HS_a rats than in ST and HS_0 rats (Table3), the effect of the dietary cysteine content being significant. Expression of the regulatory subunit did not differ between groups (data not shown).

Blood GSH status

Total blood GSH concentrations were higher in HS_a than in ST and HS_0 rats at week 3, but at week 6 they did not differ between the groups (Table 3). At week 3, blood GSH Ehc levels were similar between ST and HS_0 rats and higher than in HS_2 and HS_a rats, whereas at week 6 they were lower in ST, HS_2 and HS_a rats than in HS_0 rats. At week 6, blood GSH Ehc within HS-fed rats significantly correlated with cysteine intake ($r=-0.34$, $P<0.05$). In the postprandial experiment, blood total GSH concentrations decreased in HS_0 rats during the first 75 min following the meal ($P<0.05$), but were not modified over time in the other groups (data not shown). Postprandial blood GSH Ehc values increased over time in HS_0 rats, whereas they decreased in HS_2 rats (Figure 1B). At 75 min after the meal, blood GSH Ehc levels were lower in HS_1, HS_2 and HS_a rats than in HS_0 rats, and at 195 min they were lower in HS_2 and HS_a rats than in HS_0 rats. The dietary cysteine content significantly affected postprandial blood Ehc values.

Tissue GSH status

At week 6, muscle total GSH levels did not differ between the groups. In the liver, they were higher in ST, HS_2 and HS_a rats than in HS_0 and HS_1 rats (Table 3). When compared to HS_0 rats, GSH Ehc was lower in the liver of ST, HS_1, HS_2 and HS_a rats and in the muscle of ST and HS_2 rats. The cysteine content of the diet significantly affected liver total GSH, and liver and muscle GSH Ehc levels (Pearson correlations within HS-fed rats: liver

GSH Ehc vs. dietary cysteine intake, r=-0,51, P<0.01; muscle GSH Ehc vs. dietary cysteine intake, r=-0.35, P<0.05). In addition, the protein source affected liver total GSH and GSH Ehc levels.

Oxidative stress parameters

We assessed the ability of the blood to cope with oxidative stress by measuring plasma ORAC and erythrocyte GSH peroxidase activity. At week 3, plasma ORAC levels were higher in HS_2 rats than in HS_0 and ST rats, and the effect of the dietary cysteine content was significant (Table 3), although it no longer differed between the groups at week 6. Erythrocyte GSH peroxidase activity did not differ between the groups (data not shown). We also measured indicators of the long-term deleterious effects of oxidative stress on proteins by measuring plasma and tissues carbonyls (Table 3) and hemoglobin glycation. At week 3, the carbonylation of plasma proteins was higher in HS_0 rats than in all other groups, and similar results were obtained at week 6. The carbonylation of hepatic proteins was similar between the groups, whereas in the muscle, there were fewer carbonyls in ST, HS_2 and HS_a rats than in HS_0 rats. Hemoglobin glycation did not differ between the groups (data not shown).

Glucose tolerance and postprandial glucose homeostasis.

After 5 weeks, glucose tolerance was significantly impaired in HS_0 rats, both glucose and insulin peaks and AUC values being higher than in ST Rats (Figure 2A and 2B). HS-induced glucose intolerance was partially precluded in HS1 and HS_a rats, and totally prevented in HS_2 rats. ISI was significantly lower in HS_0 than in ST, HS_2 and HS_a rats (Figure 2C). The dietary cysteine content significantly affected post-TOTG glucose and insulin AUC values and ISI (Pearson correlation within HS-fed rats: ISI vs. dietary cysteine intake, r=-0.44, P<0.05). The dietary protein source affected glucose AUC values (P<0.05). At week 4, postprandial blood glucose did not significantly differ between the groups, but postprandial insulin secretion was lower in HS_1 (P<0.1), HS_a and HS_2 (P<0.05) than in HS_0 rats (dietary cysteine content effect: P<0.05) (Figure 1C, 1D).

Insulin signaling

Both muscle insulin-induced IRS_1-tyrosine phosphorylation and Akt-serine phosphorylation were impaired in HS_0 rats when compared to ST rats. This HS-induced impairment in muscle insulin signaling was partially (HS_1 and HS_a diets) and totally (HS_2 diet) prevented by dietary treatments. In the liver, insulin-induced IRS_1-tyrosine phosphorylation did not differ between the groups, but Akt-serine phosphorylation was significantly lower in HS_0 rats than in ST rats. The impairment of Akt-serine phosphorylation associated to the HS diet was partially prevented by the HS_2 diet. The dietary cysteine content and protein source significantly affected both muscle and hepatic Akt-serine phosphorylation (Pearson correlations within HS-fed rats: muscle Akt phosphorylation vs. dietary cysteine intake, r=0.88, P<0.001; liver Akt phosphorylation vs. dietary cysteine intake, r=0.57, P<0.05). In addition, there was a significant correlation between muscle GSH Ehc and muscle Akt-serine phosphorylation, and between liver total GSH concentrations and liver Akt-serine phosphorylation (Figure 3A and 3B).

DISCUSSION

Dietary SAA modulate GSH synthesis, turnover and the body's antioxidant capacity [16; 19; 31], but the potential benefits on glucose homeostasis are unknown, in particular in the context of an HS pro-oxidant diet. During this study, we showed that increasing the level of dietary cysteine in HS fed rats clearly improved body GSH status, decreased oxidative stress and improved glucose homeostasis.

Consumption of the HS diet for 6 weeks impaired body GSH status and induced oxidative stress, as evidenced by higher GSH Ehc levels and increased protein carbonyls in HS_0 rats when compared to ST rats. These results are in line with previous findings that reported oxidative stress in HS-fed rats [10; 32; 33]. Total hepatic GSH levels were lower in HS_0 rats than in ST rats, whereas hepatic GCL activity and catalytic subunit expression did not differ. Because extra-hepatic GSH levels were similar in both groups, this suggests that the hepatic GSH output was higher in HS_0 rats than in ST rats, despite similar rates of GSH synthesis.

In rats fed the cysteine-rich diets, increased postprandial cysteine disposal caused various modifications to SAA metabolism, as supported by lower hepatic GCL mRNAs and activity and increased plasma taurine and methionine levels, confirming previous observations [34; 35]. Increasing the dietary cysteine content dose-dependently prevented the HS-induced decrease in hepatic GSH levels and the increase in extra-hepatic GSH Ehc, and as a consequence prevented HS-induced oxidative stress, as assessed by protein carbonylation. Increasing dietary cysteine also resulted in enhanced plasma total antioxidant defenses at week 3, although this increase was specific to the highest amount of NAC and no longer observed at the time of sacrifice, possibly because blood was collected after anesthesia. These results indicate that hepatic GSH delivery and turnover were increased in rats fed the cysteine-rich diet, as reported after similar increases in dietary SAA under various conditions [14; 16; 19; 31]. However, the current study provides the first demonstration that under sucrose-induced oxidative stress, increasing cysteine intake markedly prevents postprandial deterioration of the redox status, reported as being a key determinant of the detrimental effects of nutrients in the initiation of diabetes and atherosclerosis [1]. Furthermore, we demonstrate that the cysteine effect can be achieved nutritionally by manipulating the protein source.

Consuming the HS diet for 6 weeks increased fasting plasma insulin and triglyceride levels and led to glucose intolerance, insulin resistance and the impairment of muscle and liver insulin signaling, as already documented [36; 37]. No difference was observed in hepatic IRS_1 tyrosine phosphorylation, in contrast to previous observations in rats fed a HS diet for 3 weeks [38], but this finding does not preclude differences in IRS_2 phosphorylation, a parameter that was not measured in the current work. Indeed, Akt phosphorylation was significantly reduced in HS_0 rats, which indicates an impairment of hepatic insulin signaling.

Previous studies reported lower glucose intolerance and hyperinsulinemia in rats fed high levels of fructose or in hyperinsulinemic subjects following thiol or SAA supplementation [7; 39; 40]. The major, original finding of our study is that increasing the level of dietary cysteine prevented the deleterious effects of the HS diet on glucose tolerance and postprandial glycemic control, and alleviated the deterioration of muscle and hepatic insulin signaling, in a dose-dependent fashion. The significant correlations between muscle intracellular redox status and insulin signaling further suggest that the beneficial effects of cysteine-rich diets on glucose homeostasis are mediated by their ability to maintain the peripheral GSH status. Such a relationship has already been suggested in studies that reported improved insulin sensitivity in both healthy and type II diabetic subjects infused with GSH [41; 42], or studies showing that GSH depletion induced insulin resistance [2]. This might involve a modulation of negative regulators of insulin signal transduction by the intracellular redox status, as

previously proposed [2; 12]. In the liver, insulin-induced Akt phosphorylation was correlated with total GSH concentrations, rather than with GSH Ehc. The more reduced redox potential in the liver when compared to other organs, together with the absence of an increase in hepatic protein carbonylation in sucrose-fed rats compared to control rats, suggests that the liver is less exposed to oxidative stress. In this organ, GSH may itself play a role in insulin signaling, independently of its role in redox buffering [43].

Interestingly, the effects of the HS_1 and HS_a diets were not wholly identical, despite similar cysteine contents, which underlines the specific interest of this protein fraction. When compared to the HS_1 diet, αLAC was associated with higher plasma postprandial cysteine concentrations, together with higher hepatic GSH levels and lower muscle protein carbonylation. In parallel, the HS_a diet seemed to be more effective in preventing HS-induced glucose intolerance. This result may be related to the differences observed between αLAC and total milk protein regarding the postprandial increase in branched-chain amino acids, which have been shown to improve insulin signaling [44; 45].

Taken together, our findings demonstrate that in HS-fed rats, increasing dietary cysteine content markedly reduces diet-induced oxidative stress and insulin resistance. Our data support the idea that the effects of cysteine on glucose homeostasis are mediated by an increase in hepatic GSH output, which in turn positively affects body redox status and early events of the insulin signaling pathway. In conditions that challenge the body redox status, we suggest that sulfur amino acid requirements are increased, and that these new requirements can be met, at least in part, by providing cysteine-rich dietary proteins. In this regard, α-lactalbumin is particularly relevant, but other protein sources such as ovalbumin or rapeseed proteins might also be considered.

Acknowledgments.

We would like to thank Maggy Bardoux, Florine Moraes and Sophie Daré for biochemical assays.

List of abbreviations:

αLAC: α-lactalbumin-rich whey concentrate; GCL: glutamate cysteine ligase; GSH: glutathione; GSH Ehc: reduction potential of the GSSG/2GSH half-cell; GSSG: glutathione, oxidized form; HS: high sucrose; IR: insulin resistance; ISI: insulin sensitivity index; NAC: N-acetylcysteine; ORAC: oxygen radical absorbent capacity; SAA: sulfur amino acids.

References

1. Ceriello, A. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia.* 46 Suppl 1:M9-16; 2003.

2. Ogihara, T.; Asano, T.; Katagiri, H.; Sakoda, H.; Anai, M.; Shojima, N.; Ono, H.; Fujishiro, M.; Kushiyama, A.; Fukushima, Y.; Kikuchi, M.; Noguchi, N.; Aburatani, H.; Gotoh, Y.; Komuro, I.;Fujita, T. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia.* 47:794-805; 2004.

3. Gopaul, N. K.; Manraj, M. D.; Hebe, A.; Lee Kwai Yan, S.; Johnston, A.; Carrier, M. J.;Anggard, E. E. Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia.* 44:706-712; 2001.

4. Sugiura, M.; Nakamura, M.; Ikoma, Y.; Yano, M.; Ogawa, K.; Matsumoto, H.; Kato, M.; Ohshima, M.;Nagao, A. The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subjects. *J Epidemiol.* 16:71-78; 2006.

5. Trevisan, M.; Browne, R.; Ram, M.; Muti, P.; Freudenheim, J.; Carosella, A. M.;Armstrong, D. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population
10.1093/aje/154.4.348. *Am. J. Epidemiol.* 154:348-356; 2001.

6. Manning, P. J.; Sutherland, W. H.; Walker, R. J.; Williams, S. M.; De Jong, S. A.; Ryalls, A. R.;Berry, E. A. Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associated parameters in overweight subjects. *Diabetes Care.* 27:2166-2171; 2004.

7. Midaoui, A. E.; Elimadi, A.; Wu, L.; Haddad, P. S.;de Champlain, J. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens.* 16:173-179; 2003.

8. Jacob, S.; Ruus, P.; Hermann, R.; Tritschler, H. J.; Maerker, E.; Renn, W.; Augustin, H. J.; Dietze, G. J.;Rett, K. Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med.* 27:309-314; 1999.

9. Blendea, M. C.; Jacobs, D.; Stump, C. S.; McFarlane, S. I.; Ogrin, C.; Bahtyiar, G.; Stas, S.; Kumar, P.; Sha, Q.; Ferrario, C. M.;Sowers, J. R. Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288:E353-359; 2005.

10. Busserolles, J.; Rock, E.; Gueux, E.; Mazur, A.; Grolier, P.;Rayssiguier, Y. Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br J Nutr.* 87:337-342.; 2002.

11. Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414:813-820.; 2001.

12. Tirosh, A.; Potashnik, R.; Bashan, N.;Rudich, A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 274:10595-10602.; 1999.

13. Schafer, F. Q.;Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30:1191-1212; 2001.

14. Bella, D. L.;Stipanuk, M. H. High levels of dietary protein or methionine have different effects on cysteine metabolism in rat hepatocytes. *Adv Exp Med Biol.* 403:73-84; 1996.

15. Hum, S.; Koski, K. G.;Hoffer, L. J. Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. *J Nutr.* 122:2010-2018; 1992.

16. Morand, C.; Rios, L.; Moundras, C.; Besson, C.; Remesy, C.;Demigne, C. Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. *J Nutr Biochem.* 8:246-255; 1997.

17. Lyons, J.; Rauh-Pfeiffer, A.; Yu, Y. M.; Lu, X. M.; Zurakowski, D.; Tompkins, R. G.; Ajami, A. M.; Young, V. R.;Castillo, L. Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5071-5076.; 2000.

18. Richie, J. P., Jr.; Komninou, D.; Leutzinger, Y.; Kleinman, W.; Orentreich, N.; Malloy, V.;Zimmerman, J. A. Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. *Nutrition.* 20:800-805; 2004.

19. Mariotti, F.; Simbelie, K. L.; Makarios-Lahham, L.; Huneau, J. F.; Laplaize, B.; Tome, D.;Even, P. C. Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. *J Nutr.* 134:128-131; 2004.

20. Bounous, G.; Gervais, F.; Amer, V.; Batist, G.;Gold, P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. *Clin Invest Med.* 12:343-349; 1989.

21. Lacroix, M.; Gaudichon, C.; Martin, A.; Morens, C.; Mathe, V.; Tome, D.;Huneau, J. F. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side-effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 20:20; 2004.

22. Marfella, R.; Quagliaro, L.; Nappo, F.; Ceriello, A.;Giugliano, D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest.* 108:635-636.; 2001.

23. Even, P. C.; Rolland, V.; Feurte, S.; Fromentin, G.; Roseau, S.; Nicolaidis, S.;Tome, D. Postprandial metabolism and aversive response in rats fed a threonine-devoid diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279:R248-254; 2000.

24. Belfiore, F.; Iannello, S.;Volpicelli, G. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol Genet Metab.* 63:134-141; 1998.

25. West, S. G.; Likos-Krick, A.; Brown, P.;Mariotti, F. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *J Nutr.* 135:212-217; 2005.

26. Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.;Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233:346-357; 1994.

27. Anderson, M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113:548-555.; 1985.

28. Davalos, A.; Gomez-Cordoves, C.;Bartolome, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem.* 52:48-54; 2004.

29. White, C. C.; Viernes, H.; Krejsa, C. M.; Botta, D.;Kavanagh, T. J. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem.* 318:175-180; 2003.

30. Paglia, D. E.;Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70:158-169; 1967.

31. Bauman, P. F.; Smith, T. K.;Bray, T. M. The effect of dietary protein and sulfur amino acids on hepatic glutathione concentration and glutathione-dependent enzyme activities in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 66:1048-1052; 1988.

32. Peters, L. P.;Teel, R. W. Effects of high sucrose diet on body and liver weight and hepatic enzyme content and activity in the rat. *In Vivo.* 17:61-65; 2003.

33. El Midaoui, A.;de Champlain, J. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension.* 39:303-307; 2002.

34. Di Buono, M.; Wykes, L. J.; Cole, D. E.; Ball, R. O.;Pencharz, P. B. Regulation of sulfur amino acid metabolism in men in response to changes in sulfur amino acid intakes. *J Nutr.* 133:733-739; 2003.

35. Bella, D. L.; Hahn, C.;Stipanuk, M. H. Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol.* 277:E144-153; 1999.

36. Santure, M.; Pitre, M.; Marette, A.; Deshaies, Y.; Lemieux, C.; Lariviere, R.; Nadeau, A.;Bachelard, H. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol.* 137:185-196; 2002.

37. Pagliassotti, M. J.; Prach, P. A.; Koppenhafer, T. A.;Pan, D. A. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol.* 271:R1319-1326; 1996.

38. Pagliassotti, M. J.; Kang, J.; Thresher, J. S.; Sung, C. K.;Bizeau, M. E. Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282:E170-176.; 2002.

39. Song, D.; Hutchings, S.;Pang, C. C. Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol.* 508:205-210; 2005.

40. Fulghesu, A. M.; Ciampelli, M.; Muzj, G.; Belosi, C.; Selvaggi, L.; Ayala, G. F.;Lanzone, A. N-acetyl-cysteine treatment improves insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 77:1128-1135.; 2002.

41. Paolisso, G.; Giugliano, D.; Pizza, G.; Gambardella, A.; Tesauro, P.; Varricchio, M.;D'Onofrio, F. Glutathione infusion potentiates glucose-induced insulin secretion in aged patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care.* 15:1-7; 1992.

42. De Mattia, G.; Bravi, M. C.; Laurenti, O.; Cassone-Faldetta, M.; Armiento, A.; Ferri, C.;Balsano, F. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 47:993-997; 1998.

43. Guarino, M. P.; Afonso, R. A.; Raimundo, N.; Raposo, J. F.;Macedo, M. P. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284:G588-594.; 2003.

44. Doi, M.; Yamaoka, I.; Fukunaga, T.;Nakayama, M. Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun.* 312:1111-1117; 2003.

45. Nishitani, S.; Matsumura, T.; Fujitani, S.; Sonaka, I.; Miura, Y.;Yagasaki, K. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 299:693-696; 2002.

TABLE 1: Composition of the ST, HS_0, HS_1, HS_2 and HS_a diets.

	ST	HS_0	HS_1	HS_2	HS_a
	g/kg dry matter				
Total milk protein[2]	140	140	139	137	0
αLAC	0	0	0	0	140
Sucrose	100.3	722.7	718.5	708.5	722.7
Cornstarch	622.4	0	0	0	0
N-acetylcysteine		0	5.8	20	0
Equivalent total cysteine	*1.2*	*1.2*	*5.5*	*16*	*5.5*
AIN 93 VX vitamin mix	10	10	10	10	10
AIN 93M mineral mix	35	35	35	34	35
Soybean oil	40	40	40	39	40
Cellulose	50	50	50	49	50
Choline bitartrate	2.30	2.30	2.30	2.27	2.30
Metabolizable energy (kJ)	14.9	15.2	15.2	15.1	15.2

TABLE 2: Blood fasting parameters after 5/6 weeks in ST, HS_0, HS_1, HS_2 and HS_a rats[3].

	week	ST	HS_0	HS_1	HS_2	HS_a
Glucose (mmol/L)	5	5.2 ± 0.2^{a}	5.3 ± 0.3^{a}	5.5 ± 0.2^{a}	5.8 ± 0.1^{a}	5.5 ± 0.2^{a}
Insulin (µg/L)	5	0.5 ± 0.1^{a}	1.0 ± 0.1^{a}	1.1 ± 0.1^{a}	0.6 ± 0.1^{a}	0.4 ± 0.1^{a}
Triglycerides (mmol/L)	6	0.7 ± 0.1^{a}	1.1 ± 0.2^{b}	0.7 ± 0.1^{ab}	0.9 ± 0.1^{ab}	1.1 ± 0.2^{b}

[2] The protein sources were prepared from bovine milk and provided by Armor Protéines SAS

[3] Values are means ± SEM, n=8. Means in a same line not sharing a common superscript letter differ, $P<0.05$.

TABLE 3: Glutathione and oxidative stress-related parameters in ST, HS_0, HS_1, HS_2 and HS_a rats[4].

week			ST	HS_0	HS_1	HS_2	HS_a
3	Blood	GSH (µmol/L)	$533^a \pm 27$	$550^a \pm 55$	$571^{ab} \pm 42$	$624^{ab} \pm 30$	$682^b \pm 43$
		GSH Ehc (mV)	$-190^a \pm 1$	$-191^a \pm 3$	$-195^{ab} \pm 2$	$-200^{bc} \pm 1$	$-202^c \pm 2$
		ORAC (UA)	$1777^a \pm 145$	$1594^a \pm 130$	$1874^{ab} \pm 129$	$2198^b \pm 219$	$1758^{ab} \pm 160$
		PC[5] (nmol/mg)	$0.26^a \pm 0.06$	$0.69^b \pm 0.12$	$0.36^a \pm 0.07$	$0.30^a \pm 0.03$	$0.23^a \pm 0.03$
6	Blood	GSH (µmol/L)	580 ± 36	540 ± 28	550 ± 30	593 ± 37	601 ± 28
		GSH Ehc (mV)	$-197^a \pm 2$	$-192^b \pm 1$	$-195^{ab} \pm 1$	$-196^a \pm 1$	$-197^a \pm 1$
		ORAC (UA[6])	1535 ± 102	1690 ± 157	1699 ± 120	1754 ± 78	1610 ± 74
		PC (nmol/mg)	$0.30^a \pm 0.07$	$0.70^b \pm 0.07$	$0.45^a \pm 0.08$	$0.30^a \pm 0.05$	$0.31^a \pm 0.04$
6	Muscle	GSH (µmol/L)	488 ± 46	436 ± 47	389 ± 44	471 ± 55	444 ± 32
		GSH Ehc (mV)	$-209^a \pm 2$	$-194^b \pm 4$	$-203^{ab} \pm 5$	$-210^a \pm 7$	$-208^{ab} \pm 2$
		PC (nmol/mg)	$4.6^a \pm 0.9$	$11.1^c \pm 1.7$	$10.1^{bc} \pm 0.9$	$7.0^{ab} \pm 1.1$	$4.9^a \pm 0.9$
6	Liver	GSH (µmol/L)	$5322^a \pm 334$	$3910^b \pm 210$	$4125^b \pm 198$	$5118^a \pm 262$	$4871^a \pm 186$
		GSH Ehc (mV)	$-253^a \pm 2$	$-245^b \pm 2$	$-253^a \pm 3$	$-259^a \pm 1$	$-256^a \pm 1$
		PC (nmol/mg)	6.1 ± 0.6	8.6 ± 1.2	6.9 ± 0.9	7.3 ± 1.2	6.7 ± 1.0
		GCL activity[7]	$355^a \pm 109$	$265^{ab} \pm 60$	$52^c \pm 27$	$83^{bc} \pm 36$	$131^{bc} \pm 81$
		GCLc mRNA fv[8]	$1.0^a \pm 0.1$	$1.0^a \pm 0.1$	$0.7^b \pm 0.1$	$0.6^b \pm 0.1$	$0.7^b \pm 0.1$

[4] Values are means ± SEM, n=8 or n=5 for mRNA data. Means in a same line not sharing a common superscript letter differ, $P<0.05$.

[5] protein carbonyls.

[6] arbitrary units.

[7] pmol GC/min/mg protein

[8] fv : fold variation

Figure Legends:

Figure 1: Postprandial study, performed after 4 weeks of receiving the different diets. A, plasma cysteine (the mean value of plasma cysteine at t=0 was 333.8 ± 8.3 µmol/L); B, blood GSH Ehc; C, blood glucose; E, plasma insulin and insulin postprandial AUC values (AUCi, µg.min/L). Values are means ± SEM, n=6-8. For each time point, means not sharing a common superscript letter differ, P<0.05; ** P<0.05 vs. HS_0; *P<0.1 vs. HS_0.

Figure 2: Oral glucose tolerance test at week 5; A, blood glucose and glucose AUC (AUCg, mmol.min/L); B, plasma insulin and insulin AUC (AUCi, µg.min/L); C, ISI. Values are means ± SEM, n=8; ** P<0.05 vs. HS_0; * P<0.1 vs. HS_0. Means not sharing a common superscript letter differ, P<0.05.

Figure 3: Insulin-induced activation of insulin signaling; A, muscle IRS_1 tyrosine phosphorylation (n=2-3) in the muscle (A) and the liver (B); Akt serine 473 phosphorylation (n=3-4) in the muscle (C) and the liver (D). Values are means ± SEM. Means not sharing a common superscript letter differ, P<0.05.

Figure 4: Correlations between (A) Muscle GSH Ehc and muscle Akt serine phosphorylation, (B) liver total GSH concentrations and liver Akt serine phosphorylation. Pearson correlations were calculated; n=3 to 4 rats per group.

Figure 1

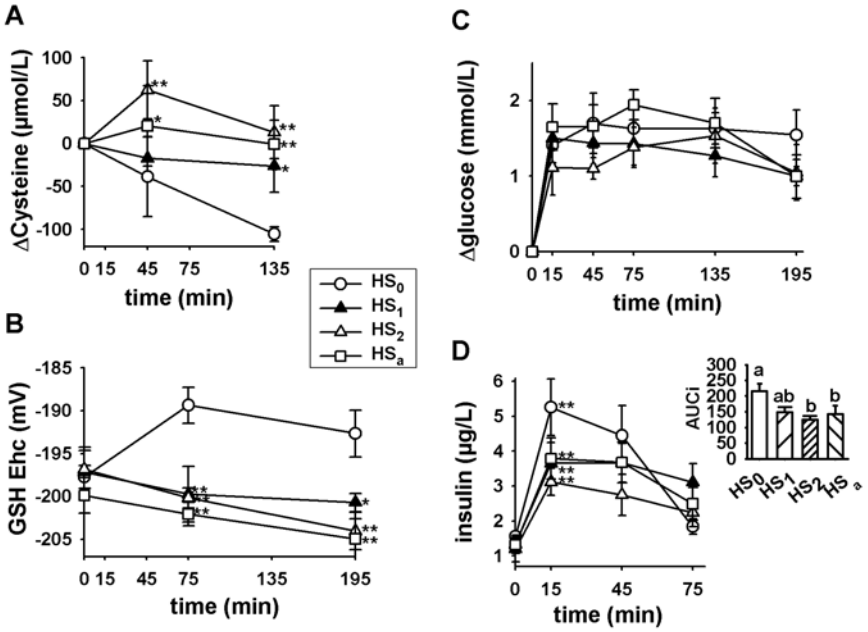


Figure 2

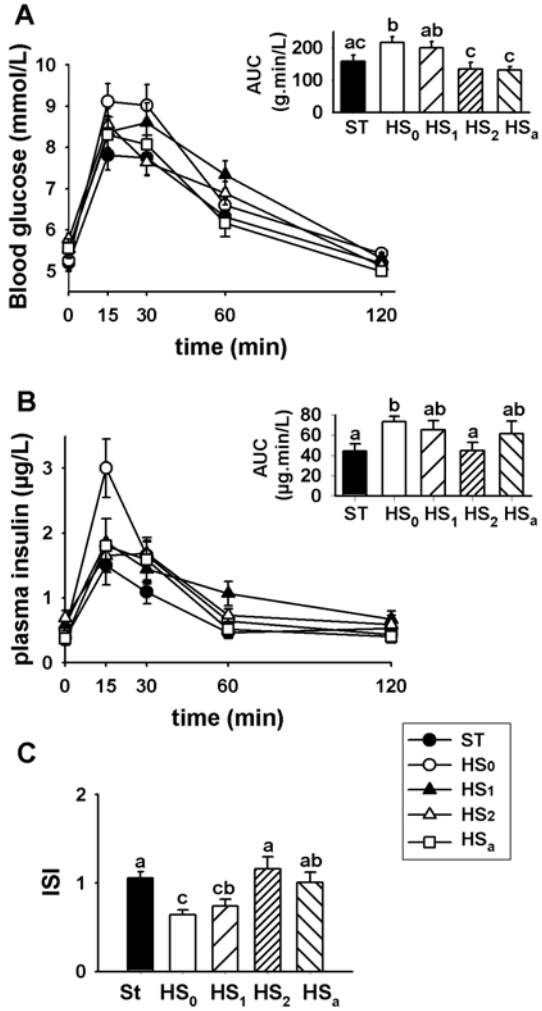


Figure 3

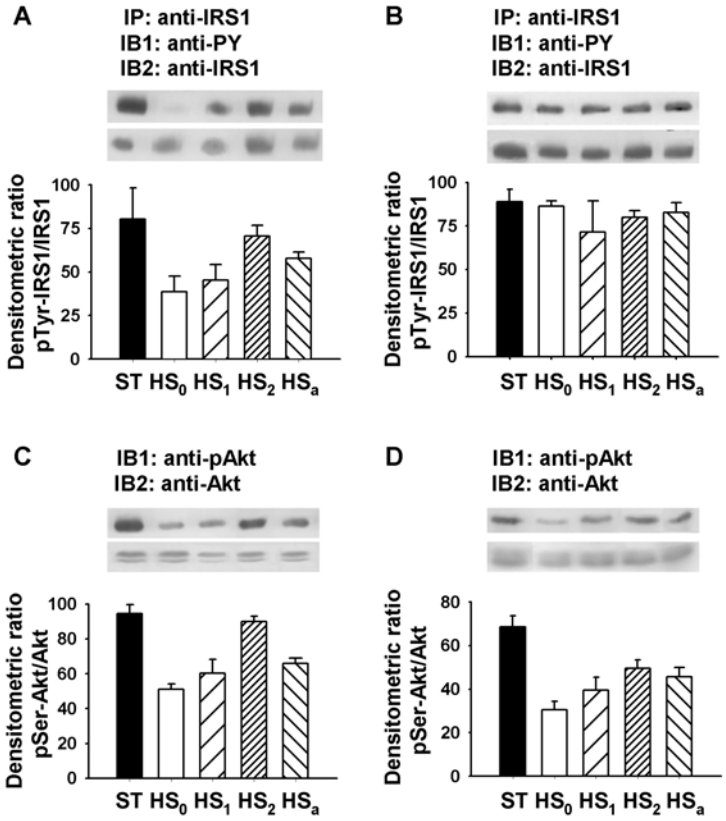
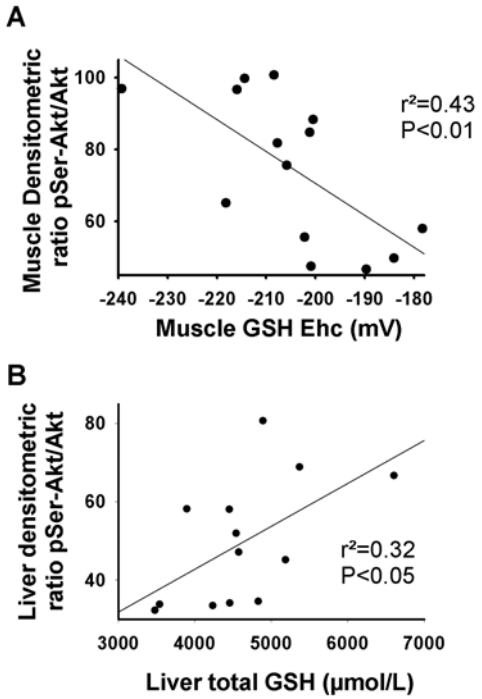


Figure 4 :



Supplemental table 1: Plasma proline and branched-chain amino acid concentrations during the postprandial experiment performed at week 4.

	time	HS_0	HS_1	HS_2	HSa
Proline, µmol/L	**0**	129 ± 28	126 ± 37	115 ± 11	130 ± 29
	45	215 ± 9[9]	198 ± 26[a]	175 ± 39[a]	136 ± 27
	135	203 ± 33[a]	188 ± 62[a]	189 ± 48[a]	138 ± 24
BCAA, µmol/L	**0**	406 ± 53	316 ± 81	348 ± 30	291 ± 61
	45	332 ± 80	260 ± 60	338 ± 143	369 ± 62
	135	343 ± 64	299 ± 74	291 ± 63	396 ± 62[a]

RESULTATS COMPLEMENTAIRES DES EXPERIENCES DE L'ARTICLE 3.

1.Cinétiques de mise à disposition des acides aminés au cours de la phase postprandiale en fonction de la qualité des protéines et de la teneur en cystéine du régime.

Chez des animaux adaptés pendant 4 semaines à la consommation des régimes HS_0, HS_1, HS_2 et HSa, les concentrations plasmatiques en acides aminés ont été suivies au cours de la période postprandiale en réponse à l'ingestion d'un repas calibré. La technique de dosage des acides aminés est décrite dans l'article 3.

Résultats et conclusions

Les résultats complets des cinétiques de mise à disposition des acides aminés au cours de la période postprandiale sont présentés dans le tableau 9.

La qualité des protéines du régime (protéines totales de lait vs. αLAC) influençait la disponibilité postprandiale de la proline et des AAR. Chez les animaux adaptés aux régimes contenant des protéines totales de lait, les concentrations plasmatiques en proline augmentaient au cours de la phase postprandiale, tandis-qu'elles n'étaient pas modifiées par le repas chez les rats HSa. Chez les rats HSa, les concentrations plasmatiques postprandiales en AAR (valine, isoleucine et leucine) augmentaient significativement, tandis-qu'elles n'étaient pas significativement modifiées chez les rats adaptés aux régimes contenant des protéines totales de lait. Ces différences pourraient expliquer certaines différences observées dans l'article 3 entre les groupes HS_1 et HSa en ce qui concerne la tolérance au glucose, bien que ces deux régimes présentaient la même teneur en cystéine.

La teneur en cystéine du régime influençait la disponibilité postprandiale des AAS. Les concentrations plasmatiques en taurine à jeun étaient significativement supérieures chez les rats HS_1 et HS_2 que chez les rats HS_0 et étaient significativement affectées par la teneur en cystéine du régime. Ce résultat indique une dégradation oxydative de la cystéine plus importante dans ces groupes. De plus, au cours de la phase postprandiale, l'évolution de la concentration plasmatique en cystéine était significativement influencée par la teneur en cystéine du régime : elle augmentait chez les rats HS_2, n'était pas modifiée par le repas chez les rats HS_1 et HSa, tandis-qu'elle diminuait chez les rats HS_0.

2. Effets des régimes ST, HS_0, HS_1, HS_2 et HSa sur l'expression hépatique de la FAS et de SREBP-1c.

L'influence de SREBP-1c dans les mécanismes moléculaires des effets métaboliques délétères des régimes riche en fructose a été décrite (Nagai *et al.*, 2002). Nous avons donc exploré l'effet de l'apport en cystéine sur l'expression hépatique de SREBP-1c et de sa cible FAS chez des rats nourris pendant 6 semaines avec les régimes ST, HS_0, HS_1, HS_2 et HSa.

Méthodes

L'expression hépatique de SREBP-1c et de FAS a été mesurée par PCR en temps réel. Les amorces utilisées sont présentées dans l'article 1.

Résultats et conclusions

Les concentrations hépatiques des ARN messagers de SREBP-1c et de FAS étaient supérieures chez les rats HS_0 comparés aux rats ST ($P<0,5$ et $P<0,1$, respectivement) (Fig. 46), mais cela ne se traduisait pas par des différences de croissance pondérale et de dépôt adipeux au niveau rétropéritonéal. Ces augmentations étaient prévenues partiellement par l'apport supplémentaire en NAC mais les différences de niveau d'expression avec le groupe HS_0 n'étaient pas significatives. Chez les rats HSa, le niveau d'expression hépatique de SREBP-1c et de FAS étaient similaires à ceux mesuré chez les rats ST.

L'insuline et le glucose stimulent l'expression de SREBP-1c (Foretz *et al.*, 1999). Chez les animaux nourris par des régimes riches en fructose ou en saccharose, l'hyperinsulinémie à jeun et l'hyperglycémie postprandiale sont susceptibles d'être responsable de l'activation de l'expression hépatique de SREBP-1c. Dans l'étude de Nagai *et al.*, la consommation du régime riche en fructose induit en effet une hyperinsulinémie à jeun, une activation de l'expression hépatique de SREBP-1c, une prise de poids et un dépôt adipeux accrus. Cependant, chez des animaux recevant un régime riche en fructose supplémenté en fénofibrates, un activateur de PPAR α, bien que les désordres métaboliques associés à la consommation du régime riche en fructose ne surviennent pas, l'expression de SREBP-1c est activée, un résultat qui suggère que dans ce modèle l'expression de SREBP-1c est activée directement par le fructose (Nagai *et al.*, 2002).

Nos résultats suggèrent plutôt une activation de l'expression de SREBP-1c par l'insuline. En effet, les différences d'insulinémie à jeun entre les 5 groupes de rats après 5 semaines de régime sont similaires aux différences d'expression hépatique de SREBP-1c et de FAS chez les rats recevant le régime HS_0.

4. Effets d'une préparation commerciale de protéines de lactosérum sur le statut en glutathion et la tolérance au glucose chez des rats recevant un régime hypersaccharosé

Dans les études précédentes, nous avons mis en évidence les effets bénéfiques de l'αLAC sur le statut en glutathion et la prévention du stress oxydant et de l'IR induits par la consommation d'un régime HS. Dans cette étude, nous avons testé les effets d'un autre concentré de protéines de lactosérum, moins riche en α-lactalbumine que celui utilisé dans les études précédentes, mais plus facile à produire et moins onéreux, le P800, sur le statut en glutathion et la tolérance au glucose chez des animaux recevant un régime HS.

Méthodes

Trois groupes de 8 rats ont reçu pendant 6 semaines le régime HS_0 ou des régimes HS contenant 14 ou 30% de protéines P800. La composition des régimes expérimentaux est présentée dans le tableau 10. La croissance pondérale et les consommations alimentaires ont été suivies pendant toute la durée de l'étude. Après 5 semaines de régime, la tolérance orale au glucose des animaux a été mesurée. Après 6 semaines de régime, les animaux ont été sacrifiés, leur composition corporelle a été déterminée et des prélèvements sanguins et tissulaires ont été réalisés pour déterminer le statut en glutathion.

Résultats et conclusions

La nature du régime n'affectait pas significativement la prise alimentaire, la croissance pondérale et la composition corporelle mesurée après 6 semaines par dissection post-mortem (Fig. 47 et Tab. 11).

Les animaux soumis aux régimes contenant du P800 présentaient à 5 semaines une tolérance au glucose significativement meilleure que celle des rats HS_0 (Fig. 48). L'hyperglycémie suivant la charge orale de glucose était significativement plus faible chez les rats P14-800 et les rats P30-800 que chez les rats HS_0, mais l'hyperinsulinémie ne différait pas

significativement entre les groupes (Fig. 49). L'amélioration de la tolérance au glucose chez les rats P14-800 et P30-800 s'accompagnait d'une amélioration du statut en glutathion sanguin, tandis que le statut en glutathion du muscle, du cœur et du foie n'était pas significativement affecté par la nature du régime (Tab.12). Chez les rats recevant les régimes P800, la teneur en protéines de l'alimentation n'affectait pas la tolérance au glucose et le statut en glutathion. L'effet du type de protéines tendait à affecter le rapport glutathion oxydé/ glutathion total musculaire ($P<0,1$).

Ces résultats indiquent que l'effet protecteur de l'α-lactalbumine vis-à-vis de l'intolérance au glucose et le déséquilibre du statut redox induit par le régime HS peut être reproduit avec des préparations commerciales de protéines de lactosérum. Ainsi, la consommation de P800 est associée à une amélioration significative du statut anti-oxydant sanguin, et à une meilleure régulation de la glycémie après 6 semaines par rapport à celle observée chez les rats recevant les protéines totales de lait. Cette amélioration est moindre que celle observée avec la fraction enrichie en α-lactalbumine utilisée lors des expériences précédentes mais reste cependant significative. Il est intéressant de constater que l'effet sur la régulation glycémique observé avec le P800 n'est pas lié à une amélioration de la composition corporelle, l'adiposité des animaux étant équivalente, voire supérieure, à celle de ceux recevant les protéines totales de lait.

ARTICLE 4

NO production correlates with insulin sensitivity but NO bioavailability is first altered during early dietary modulations of insulin sensitivity in rats. The American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, soumis.

Clémence Blouet, François Mariotti, Véronique Mathé, Daniel Tomé et Jean-François Huneau.

Introduction et objectifs

S'il est établi que le NO joue un rôle important dans les mécanismes de la captation périphérique de glucose, la nature des modifications de son métabolisme au cours de l'apparition d'une IR reste controversée. De plus en plus de données suggèrent qu'une altération de la production et/ou de la biodisponibilité du NO survient lors de l'apparition d'une IR. Chez le sujet sain, la sensibilité à l'insuline est significativement corrélée à la vasodilatation endothélium-dépendante, qui traduit la capacité de l'endothélium à produire du NO biodisponible (Petrie *et al.*, 1996; McSorley *et al.*, 2005; Goldfine *et al.*, 2006). Récemment, une étude a mesuré une corrélation entre la sensibilité à l'insuline et l'excrétion urinaire de guanosine 3,5-monophosphate cyclique (GMPc), le second messager du NO (Cui *et al.*, 2006). Plusieurs résultats expérimentaux obtenus chez le rongeur indiquent également que le NO tient une place centrale au carrefour de la fonction endothéliale et de la sensibilité à l'insuline. En particulier, les études démontrant que l'inhibition spécifique de la synthèse endothéliale de NO induit une IR suggèrent qu'une altération de la synthèse et/ou de la biodisponibilité du NO pourrait initier l'IR (Duplain *et al.*, 2001; Guarino *et al.*, 2004). Cette hypothèse est confortée par l'ensemble des études mécanistiques mettant en évidence le rôle du NO dans le recrutement vasculaire et ses conséquences sur la captation de glucose périphérique (Roy *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2003), ainsi-que celles suggérant que dans des conditions d'IR, la réduction de la capacité de l'insuline à activer eNOS induit une diminution de la production de NO (Kuboki *et al.*, 2000; Naruse *et al.*, 2006).

Chez le rat, l'augmentation de la teneur en cystéine de l'alimentation réduit le stress oxydant et prévient l'IR induits par la consommation d'un régime HS. Plusieurs études ayant mis en évidence que le stress oxydant réduit la synthèse et la biodisponibilité du NO (Guzik *et al.*,

2002; Sydow *et al.*, 2003; Channon, 2004), nous avons exploré les effets de l'alimentation HS et ceux de l'apport alimentaire en cystéine dans ce modèle, sur différents paramètres liés à la synthèse et la biodisponibilité du NO.

Méthodes

40 rats Wistar mâles ont reçu pendant 6 semaines un régime prudent (C), un régime riche en saccharose (I), inducteur d'une IR, ou différents régimes également riches en saccharose mais supplémentés en cystéine et protecteurs vis-à-vis de l'induction de l'IR (Ti). Après 5 semaines de régime, la tolérance orale au glucose a été mesurée. La production de NO a été évaluée par la mesure de l'excrétion urinaire de $^{15}NO_3^-$ en réponse à une injection intraveineuse de 6,03 mg [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl par kg de poids corporel. A 6 semaines, les rats ont été sacrifiés et des prélèvements sanguins et tissulaires ont été réalisés pour analyses ultérieures. Les concentrations plasmatiques en nitrotyrosine, ADMA et les concentrations urinaires en GMPc ont été évaluées par ELISA. L'expression aortique de la protéine eNOS et le niveau de phosphorylation musculaire d'eNOS en Ser 1177 en réponse à une provocation insulinique ont été évalués par western blot. Les concentrations musculaires en ARNm d'eNOS et d'iNOS (l'isoforme inductible de la NOS) ont été mesurées par PCR en temps réel (SYBR Green).

Résultats et conclusions

La consommation du régime I pendant 6 semaine était associée à l'apparition d'une IR, caractérisée par une hyperinsulinémie à jeun et une intolérance au glucose, prévenue par l'ajout de cystéine au régime I. Bien que l'excrétion urinaire de GMPc n'était pas affectée par la nature du régime, l'induction d'une IR était accompagnée d'une augmentation des concentrations plasmatiques en nitrotyrosine, indiquant une diminution de la biodisponibilité du NO chez les rats insulino-résistants, tandis que les concentrations plasmatiques en nitrotyrosine étaient partiellement normalisées chez les rats recevant les régimes Ti. L'augmentation de la destruction oxydative du NO chez les rats I comparés aux rats C était associée à une augmentation du ratio iNOS/eNOS des ARNm musculaires, suggérant l'initiation d'un deséquilibre dans le type de production de NO, qui pourrait contribuer à la réduction de la biodisponibilité du NO, tandis que chez les rats Ti le niveau de ce marqueur n'était pas différent de celui des rats C. La production de NO, évaluée par la mesure de

l'excrétion urinaire de $^{15}NO_3^-$ après administration d'une dose intraveineuse de [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine, n'était pas modifiée par les différents traitements, de même que les concentrations plasmatiques en ADMA, l'expression aortique de la protéine eNOS et le niveau de phosphorylation musculaire d'eNOS en réponse à une provocation insulinique. Sur l'ensemble de l'effectif, une régression multiple ascendante a permis d'identifier la production de NO et le ratio d'ARNm musculaire iNOS/eNOS comme seuls prédicteurs (positif et négatif, respectivement) de l'insulino-sensibilité.

Nos résultats suggèrent que dans ce modèle de modulation alimentaire de l'insulino-sensibilité, (1) la production de NO explique une partie des variations naturelles de l'insulino-sensibilité dans l'effectif complet, mais (2) c'est l'altération de la biodisponibilité du NO qui est associée aux variations précoces d'insulino-sensibilité induites par l'alimentation.

Article 4

NO production correlates with insulin sensitivity but NO bioavailability is first altered during early dietary modulations of insulin sensitivity in rats

Clémence BLOUET, François MARIOTTI, Véronique MATHE, Daniel TOME and Jean-François HUNEAU

Running Head: NO production/bioavailability and insulin sensitivity

INRA, INAPG, UMR914 Nutrition physiology and ingestive behavior, Paris, France.

Address for reprint requests and other correspondence: Jean-François Huneau, UMR914 Nutrition physiology and ingestive behavior, Institut National Agronomique, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France. huneau@inapg.inra.fr. Phone: (+33)1.44.08.17.15. Fax: (+33)1.44.08.18.58.

ABSTRACT

Although the role of nitric oxide (NO) in peripheral glucose uptake has been thoroughly described, little is known regarding alterations in NO metabolism during the onset of insulin resistance. During this study, we investigated the alterations in NO synthesis and bioavailability in a previously described model for dietary modulations of insulin sensitivity. For a period of six weeks, rats were fed a standard diet (C), a high-sucrose diet causing insulin resistance (I), or high-sucrose diets supplemented with cysteine, which endowed protection against the high-sucrose-induced insulin resistance (T_i). Several markers of NO synthesis and bioavailability were assessed and confronted with parameters linked to insulin sensitivity. After 5 weeks, although urinary cGMP excretion did not differ between the groups, insulin resistance measured in I rats compared to C rats was associated with a significant increase in NO oxidation, as determined by plasma nitrotyrosine concentrations, and in the iNOS to eNOS mRNA ratio in skeletal muscle. These impairments were prevented in rats fed the cysteine-rich diets. NO production, as assessed by urinary $^{15}NO_3^-$ excretion following a [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl i.v. injection, was independently and significantly correlated with insulin sensitivity but did not significantly differ between C, I and T_i rats, nor did the aortic total eNOS content and muscle insulin-induced eNOS activation. Our results indicate that in this model of early dietary modulations of insulin sensitivity (1) NO production partly accounts for total inter-rat variance in insulin sensitivity, but that (2) early diet-induced alterations in insulin sensitivity are associated with variations in NO bioavailability.

Keywords: endothelial function, glycemic control, oxidative stress, dietary cysteine

INTRODUCTION

An increasing amount of data suggests that some defects in nitric oxide (NO) signaling concur with the onset of insulin resistance (IR). Epidemiological and clinical studies performed in healthy subjects have indicated that IR is closely associated with impaired endothelium-dependent vasodilatation, which means, from a metabolic point of view, impaired ability of the vascular endothelium to produce bioavailable NO (12, 20, 25). Recently, IR has been closely associated with lower urinary cGMP excretion, NO second messenger (5). In addition, several experimental studies have shown that NO is central at the interplay between endothelial dysfunction and insulin resistance. In rodents, targeted disruption of the endothelial NO synthase (eNOS) gene or acute pharmacological eNOS blockade causes insulin resistance, reversed by the administration of a NO donor, suggesting that defective NO synthesis may initiate IR (7, 13). This hypothesis is firmly supported by a series of studies that demonstrated the central role of NO in peripheral microvascular recruitment, promoting early substrate delivery to skeletal muscle and glucose uptake (28, 32). Conversely, under conditions of IR, a decrease in NO synthesis and bioavailability has been reported as a consequence of reduced peripheral reactivity to insulin and/or the decreased ability of insulin to increase endothelial NO release (19, 23), eNOS being a downstream protein of the insulin signaling pathway (9, 18)

Oxidative stress plays an important role in pathophysiological alterations of NO signaling, consisting in decreased NO production and/or bioavailability. Indeed, a reduction in NO production has mainly been documented as originating from either the impairment of NOS activity ("NOS uncoupling") (4) or increased levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) (29, 30), a competitive inhibitor of NOS. Both alterations are directly or indirectly related to oxidative stress, whereas a decrease in NO bioavailabity mainly consists in NO oxidative quenching (14), which generates peroxynitrite, a highly reactive nitrogen specie that nitrates protein tyrosine residues. Both impairments are interconnected in a vicious cycle, so that in clinical pathological conditions, numerous alterations of NO signaling are usually present. However, during the early stages of IR initiation, it is unclear which component of NO signaling is altered first, although this is essential if we are to understand the pathophysiology of this condition and develop preventive strategies.

In a model of diet-induced oxidative stress and IR (the high-sucrose (HS) fed rat), we previously showed that increasing the dietary cysteine intake, using either a cysteine-rich protein or a cysteine donor, alleviated diet-induced oxidative stress and IR (2). In the current study, we investigated the alterations of several markers of NO production/bioavailability in this model of early IR induction/prevention.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

All experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Committee for Animal Care, using 6-week old male Wistar rats (Harlan, France). After a first week of adaptation to the laboratory conditions, the rats (n=40) were randomly assigned to five groups (C, I, T_1, T_2 and T_3) and fed the corresponding diets for 6 weeks, as previously described (2). Briefly, the C diet was a standard starch-based laboratory rodent diet, the I diet was an HS diet (720 g sucrose per kg food), a model of diet-induced insulin-resistance, and the T_i diets were similar HS diets but enriched with cysteine - either with a cysteine donor, N-acetylcysteine (NAC) (T_1, 5.5 and T_2, 16 g NAC/kg food), or with a cysteine-rich protein (whey protein

enriched with α-lactalbumine, T_3) – and protective against HS-induced oxidative stress and IR. The total equivalent cysteine content was 1.2 g/kg food for the C and I diets, 5.5 g/kg food for the T_1 and T_3 diets and 16 g/kg food for the T_2 diet. During week 4, rats were supplied with nitrate/nitrite free water (Wattwiller, France), and then at week 5 they received an i.v. injection of 6.03 mg [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl per kg BW and were placed in metabolism cages for the next 13-14 hours for the collection of urine samples in glass tubes containing antibiotics, as described by Wu (33). An oral glucose tolerance test (OGTT) was performed at week 5 and the insulin sensitivity index (OGTT ISI) was calculated as follows (1): 2/[(Insp·Glyp)+1]*. At week 6, overnight fasted rats were anesthetized (sodium pentobarbital, 30 mg/kg BW, i.p.) and blood, aorta and gastrocnemius muscle samples were collected.

Unless specified otherwise, all chemicals were obtained from Sigma (France). Blood glucose concentrations were measured using a Glucometer (Roche Diagnostics). Commercial assay kits were used to measure insulin (Rat Insulin ELISA, Mercodia), ADMA (ADMA ELISA, DLD Diagnostika GmbH), nitrotyrosine (NWK-NTR01 ELISA, Northwest Life Science), cGMP (cyclic GMP, Assay Designs), nitrate (Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit, Cayman Chemical) and creatinine (Creatinine, Biomérieux) concentrations.

^{15}N enrichment in urinary nitrate was determined by adapting previous methods (10, 16). Urinary nitrate was extracted on a highly selective ion-exchange resin (IMAC-HP-555, Rohm & Hass) by elution with NaCl (25%), before conversion into ammonia using the microdiffusion method. Briefly, the 10 mL eluate was transferred into a glass bottle, added with 800 mg KCl, 50 µL Twin20, 400 mg Devarda's alloy and 200 mg MgO, sealed with a hung 6 mm filter paper disk saturated with 10 µL $KHSO_4$ (2.5 mol/L), and incubated for 7 days at 65°C. The disks were then combusted in an elemental analyzer (EA) coupled with an isotope-ratio mass spectrometer (Micromass). Background contamination was determined with serial blanks, and enrichment levels were corrected using the nitrogen quantity of samples and blanks as determined by the EA. The linearity of the method (R^2=0.995) was checked with urine spiked with $^{15}NO_3^-$. In order to determine whole-body NO production (10), the amount of $^{15}NO_3^-$ recovered from 14-hour urines was calculated, corrected by the excretion of creatinine and expressed as ‰ of the amount of ^{15}N injected as $^{15}N_2$-arginine, as follows: (QxE)/(dxC), where Q and C are the amounts of nitrate and creatinine in the specimen, E the $^{15}NO_3^-$ enrichment (as Atom percent excess) in urine and d the amount of ^{15}N injected as $^{15}N_2$-arginine.

Aorta eNOS protein concentrations and eNOS serine 1177 phosphorylation levels were determined by Western Blot. After anesthesia, rats received a bolus of insulin (30 µg/kg BW) injected into the vena cava. Muscle fragments were collected 5 min later, homogenized in ice-cold buffer and then 2 mg of total proteins were purified using 2',5'-ADP-sepharose (GE Healthcare). After separation by SDS-PAGE, samples were transferred to nitrocellulose membranes and blotted with anti-phospho eNOS antibody (Ser 1177, Cell Signaling Technology). Membranes were stripped and re-blotted with anti-eNOS antibodies (Becton Dickinson). In direct immunoblot experiments, 100 µg of protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to membranes. The upper part of the membrane was blotted with anti-eNOS antibody (Becton Dickinson), and the lower part with anti-actin antibody (Santa Cruz). Detection was performed after incubation with horseradish peroxidase-linked secondary antibody, followed by chemiluminescence and quantification using densitometry.

Muscle eNOS and iNOS gene expression analyses were performed with a light-Cycler (7300, Applied Biosystem) using SYBR GreenI DNA binding dye (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystem). The following primers were used: eNOS sense, TCCTCAGGAGGTCTTGCACATA; eNOS antisense,

GCAGCGTGGAGTGTTTGGA; iNOS sense, GAGGAGAGAGATCCGGTTCACA; iNOS antisense, GCGGGAAGCCATGACCTT. Samples contained 10 µL SYBR Green Master Mix, 600 pmol primers and 50 ng cDNA in a 20 µL final volume. Ribosomal 18S RNA was used as the internal standard.

Results are means ± SD. All statistical analyses were performed using SAS software (SAS for Windows, Version 9.1) and comparisons were made under mixed models using two preplanned orthogonal contrasts. Pearson correlations were calculated using the Corr procedure and multiple linear regressions using the stepwise Reg procedure. The threshold of statistical significance was set at $P<0.05$.

RESULTS

Table 1 summarizes the data collected during the study. Consumption of the I diet for 5 weeks induced IR, as shown by significant differences in fasting plasma insulin concentrations and OGTT ISI, as compared to the control group. T_i diets prevented HS-induced insulin resistance, with a significant dose effect of the dietary cysteine content. After 6 weeks, aortic eNOS protein concentrations standardized to actin concentrations did not vary as a function of diet, nor did muscle eNOS insulin-induced serine 1177 phosphorylation (data not shown). NO production, as assessed by urinary $^{15}NO_3^-$ excretion measured after the i.v. administration of ^{15}N labeled arginine was not affected by the sucrose diet and remained unchanged in the T_i groups. However, within these T_i groups, NO production was significantly higher in T_2 rats than in I rats ($P<0.05$). Plasma ADMA concentrations did not significantly differ between C and I rats and I and T_i rats. The muscle ratio of iNOS to eNOS mRNA concentrations was significantly higher in I rats than in C rats, while it did not differ between T_i and C rats and T_i and I rats. Plasma nitrotyrosine concentrations were significantly lower in C rats than in I rats, and lower in T_i than in I rats, but urinary cGMP excretion did not differ significantly between groups.

Figure 1 presents the most relevant and significant Pearson correlations obtained using the SAS Corr procedure. NO production was positively correlated with OGTT-ISI ($r=0.52$, $P<0.01$) and negatively correlated with fasting plasma insulin concentrations ($r=-0.36$, $P=0.05$). When the variables were analyzed using stepwise multiple regressions, only urinary $^{15}NO_3^-$ excretion and iNOS:eNOS muscle mRNA were independently and significantly correlated with OGTT-ISI ($P<0.001$ and $P<0.01$, respectively)(Table 2).

DISCUSSION

Using rats fed an HS diet for 6 weeks as a model for the early induction of IR, and cysteine donors as effective preventive agents, we showed that (1) NO production could explain part of the total variance of insulin sensitivity in rats, but that (2) decreased NO bioavailability was the main impairment in NO metabolism that was closely associated with the initiation of IR.

Consumption of the HS diet for 5 weeks significantly increased plasma nitrotyrosine concentrations, a stable footprint of NO oxidation. Although urinary cGMP excretion did not vary as a function of the diet, a lack of difference that did not preclude local differences in cGMP levels that we could not assess from measurements of whole body cGMP production, this result indicated a decrease in NO bioavailability in HS-fed rats. This decrease was associated with an increase in the muscle iNOS:eNOS mRNA ratio, indicating the initiation of an imbalance to the type of NO production in I rats that might contribute to a reduction in NO bioavailability.

Indeed, an imbalance in the fine tuning between eNOS and iNOS pathways in favor of the latter has been incriminated in the initiation of numerous pathological conditions, including IR (3, 24), partly by favoring the oxidative degradation of NO to peroxynitrite (8).

The I diet did not affect aortic eNOS protein levels and insulin-induced eNOS activation, which is in line with the findings of a study that measured no change in eNOS expression and phosphorylation in rats fed a high-fructose diet for 8 weeks (11). In addition, the I diet did not affect NO production and plasma ADMA concentrations, the values measured in I rats being remarkably similar to those measured in rats receiving the C diet. This result apparently contrasts with what had previously been reported under conditions of oxidative stress and with other models of diet-induced oxidative stress in rodents. Indeed, oxidative stress has been reported to be associated with tetrahydrobiopterin deficiency and/or to elevated plasma ADMA, both leading to a reduction in NO production (4, 31). In rats fed a high-refined sugar and/or high-fat diet, an impairment of endothelial-dependant vasodilatation was associated with a decrease in eNOS expression, NO production and bioavailability and reduced insulin-induced eNOS activation (6, 27). However, in the latter studies, these observations were made after more than 4 months of treatment. Similarly, an increase in plasma ADMA and an apparent decrease in NO production have mostly been demonstrated in a setting of pathological conditions, or in at-risk subjects who already displayed a cluster of risk factors, such as those associated with the metabolic syndrome (30). Therefore, based on the present pathophysiological model (rats fed an HS diet for 6 weeks), we propose that a decrease in NO bioavailability is the first impairment that affects NO metabolism in the course of IR, and that subsequent impairment in NO metabolism lag behind.

The important role played by the impairment of NO bioavailability in this pathophysiological process is reinforced by the observation that the prevention of IR observed with cysteine-rich diets was associated with a significant reduction in plasma nitrotyrosine, resulting in partial normalization of this marker. Although the iNOS:eNOS muscle mRNA ratio in rats fed cysteine-rich diets did not differ from that of I rats, an observation that could be related to a lack of statistical power, this variable was significantly correlated with plasma nitrotyrosine values ($r=0.46$, $P<0.05$), suggesting that the imbalance in the type of NO production was partly prevented by cysteine supplementation.

As far as the preventive effect of dietary cysteine is concerned, our results may also be helpful to infer any underlying mechanisms. We propose that the positive impact of the cysteine-rich diets on NO bioavailability is mediated by maintenance of the body redox status. Increased glutathione synthesis, as reported after a similar increase in dietary sulfur amino acid intake (21), could favor the formation of S-nitrosothiol, a stable adduct of nitric oxide and glutathione that protects nitric oxide from oxidative destruction (17, 26). Previous studies already reported the beneficial effects of NAC supplementation over the short-term on oxidative stress, glycemic control and NO production/bioavailability in streptozotocin-induced diabetic rats (22, 34). However, in the present study these effects were investigated at the very beginning of the onset of insulin resistance and the effects of NAC supplementation were duplicated by the consumption of a cysteine-rich protein, an original finding. Our results also indicate that high-NAC supplementation increases NO production. This latter effect could be mediated by the direct antioxidant properties of NAC, independently of its role as a cysteine donor, and their beneficial effects on tetrahydrobiopterin stabilization, as reported for α-tocopherol or ascorbic acid (15).

Lastly, in order to gain further insight into the relative importance of NO production vs. NO bioavailability in explaining the total variation of insulin sensitivity in our experimental setting, we analyzed the correlations between NO related markers and insulin sensitivity. The results confirmed the importance of NO bioavailability, the iNOS:eNOS muscle mRNA ratio being negatively correlated with OGTT ISI. However, we also found that NO production significantly explained part of the total variance in both fasting plasma insulin and OGTT ISI, i.e. both the basal and dynamic indicators of insulin sensitivity, and a multiple regression analysis revealed that NO production was the first predictor of OGTT-ISI. This result thus indicates that NO production was the most important contributor to insulin sensitivity within the groups, despite the lack of difference in NO production between groups.

Taken together, our data suggest that in the animal model studied, (1) NO production is a major inherited factor of insulin sensitivity, whereas (2) a decrease in NO bioavailability by NO oxidative scavenging is the first parameter to be altered by dietary factors. Other impairments to NO metabolism, which cluster together in a vicious cycle, may occur later during the progression of IR. Further studies are required to obtain further insights into the importance of early defects in NO bioavailability to the initiation of IR.

TEXT FOOTNOTES

[1] Insp: area under the insulin curve above baseline during OGTT

Glyp: area under the glycemic curve above baseline during OGTT

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Armor Protéines SAS for preparing the protein sources from bovine milk.

GRANTS

Clémence Blouet was supported by an MRT grant from the French Ministry for Research.

REFERENCES

1. **Belfiore F, Iannello S, and Volpicelli G**. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol Genet Metab* 63: 134-141, 1998.

2. **Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathe V, Mikogami T, Tome D, and Huneau JF**. Increasing the dietary cysteine intake alleviates the adverse effects of a high-sucrose diet on oxidative stress and glucose homeostasis in rats. *Free Radic Biol Med* in press: 2006.

3. **Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, and Saad MJ**. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E476-482, 2006.

4. **Channon KM**. Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 14: 323-327, 2004.

5. **Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T, and Shimamoto T**. Metabolic syndrome and urinary cGMP excretion in general population. *Atherosclerosis* 2006.

6. **Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, and Brownlee M**. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 116: 1071-1080, 2006.

7. **Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, and Scherrer U**. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 104: 342-345, 2001.

8. **Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, and Benson H**. Stress-related diseases -- a potential role for nitric oxide. *Med Sci Monit* 8: RA103-118, 2002.

9. **Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, and Sessa WC**. Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90: 866-873, 2002.

10. **Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, and Benjamin N**. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 349: 837-842, 1997.

11. **Fulton D, Harris MB, Kemp BE, Venema RC, Marrero MB, and Stepp DW**. Insulin resistance does not diminish eNOS expression, phosphorylation, or binding to HSP-90. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2384-2393, 2004.

12. **Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, Devlin H, Hurley S, Varo N, Schonbeck U, Patti ME, and Creager MA**. Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 47: 2456-2461, 2006.

13. **Guarino MP, Correia NC, Lautt WW, and Macedo MP**. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G527-532, 2004.

14. **Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, and Channon KM**. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105: 1656-1662, 2002.

15. **Heller R, Werner-Felmayer G, and Werner ER**. Antioxidants and endothelial nitric oxide synthesis. *Eur J Clin Pharmacol* 62 Suppl 13: 21-28, 2006.

16. **Herman F, Smidt S, Englisch M, Feichtinger F, Gerzabek M, Haberhauer G, Jandl R, Kalina M, and Zechmeister-Boltenstern S**. Investigations of nitrogen fluxes and pools on a limestone site in the Alps. *Environ Sci Pollut Res Int* Spec No 2: 46-52, 2002.

17. **Jourd'heuil D, Hallen K, Feelisch M, and Grisham MB**. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med* 28: 409-417., 2000.

18. **Kim JA, Montagnani M, Koh KK, and Quon MJ**. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113: 1888-1904, 2006.

19. **Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, and King GL**. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101: 676-681, 2000.

20. **McSorley PT, Bell PM, Young IS, Atkinson AB, Sheridan B, Fee JP, and McCance DR**. Endothelial function, insulin action and cardiovascular risk factors in young healthy adult offspring of parents with Type 2 diabetes: effect of vitamin E in a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Diabet Med* 22: 703-710, 2005.

21. **Morand C, Rios L, Moundras C, Besson C, Remesy C, and Demigne C**. Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. *J Nutr Biochem* 8: 246-255, 1997.

22. **Nagareddy PR, Xia Z, MacLeod KM, and McNeill JH**. N-acetylcysteine prevents nitrosative stress-associated depression of blood pressure and heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 47: 513-520, 2006.

23. **Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha SW, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JR, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, and King GL**. Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 55: 691-698, 2006.

24. **Perreault M and Marette A**. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-1143, 2001.

25. **Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, Elliott HL, and Connell JM**. Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 93: 1331-1333, 1996.

26. **Prasad A, Andrews NP, Padder FA, Husain M, and Quyyumi AA**. Glutathione reverses endothelial dysfunction and improves nitric oxide bioavailability. *J Am Coll Cardiol* 34: 507-514, 1999.

27. **Roberts CK, Vaziri ND, Ni Z, and Barnard RJ**. Correction of long-term diet-induced hypertension and nitrotyrosine accumulation by diet modification. *Atherosclerosis* 163: 321-327, 2002.

28. **Roy D, Perreault M, and Marette A**. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am J Physiol* 274: E692-699, 1998.

29. **Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP, Reaven GM, and Tsao PS**. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *Jama* 287: 1420-1426, 2002.

30. **Sydow K, Mondon CE, and Cooke JP**. Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med* 10 Suppl 1: S35-43, 2005.

31. **Sydow K and Munzel T**. ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* 4: 41-51, 2003.

32. **Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, and Barrett EJ**. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes* 53: 1418-1423, 2004.

33. **Wu G, Flynn NE, Flynn SP, Jolly CA, and Davis PK**. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr* 129: 1347-1354, 1999.

34. **Xia Z, Nagareddy PR, Guo Z, Zhang W, and McNeill JH**. Antioxidant N-acetylcysteine restores systemic nitric oxide availability and corrects depressions in arterial blood pressure and heart rate in diabetic rats. *Free Radic Res* 40: 175-184, 2006.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Pearson correlations obtained using the SAS Corr procedure between urinary $^{15}NO_3^-$ excretion (‰^{15}N recovered after [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl i.v. bolus /mmol creatinine, n=7 to 8), iNOS:eNOS muscle mRNA (n=6), OGTT-ISI (n=7 to 8) and fasting plasma insulin (n=7 to 8).

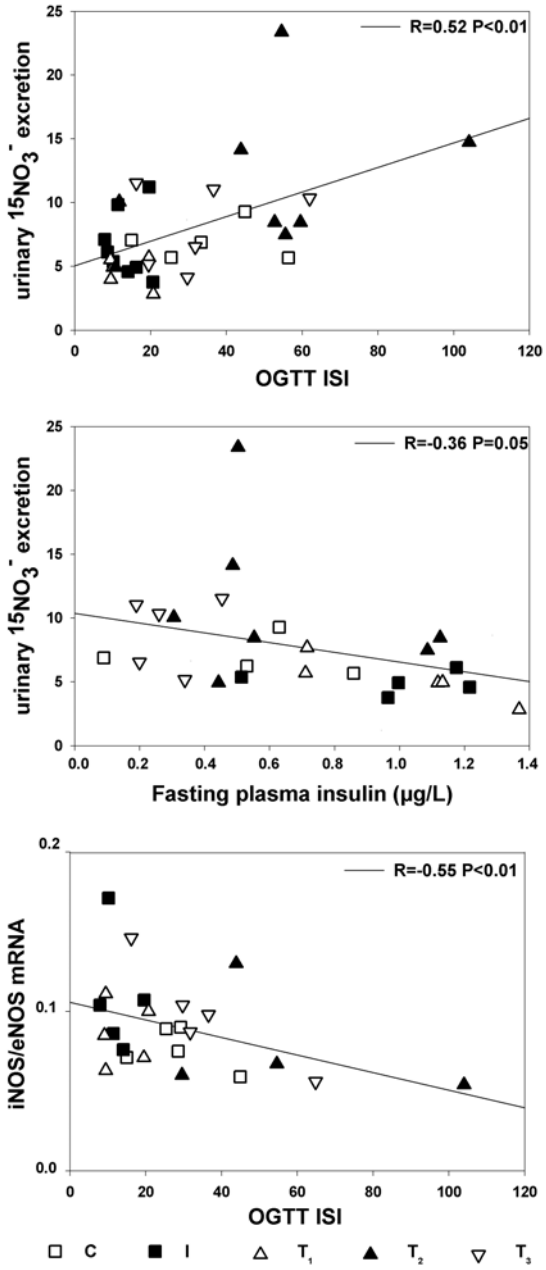


Table 1: Effects of C, I and T_i diets on glucose control and several markers of NO production and bioavailability[†]

	C	I	T_1	T_2	T_3	C vs I	T_i vs I
Blood glucose (mmol/L)	5.2 ± 0.5	5.3 ± 0.8	5.5 ± 0.7	5.8 ± 0.4	5.6 ± 0.6	NS	NS
Plasma insulin (µg/L)	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	<0.05	<0.05
OGTT ISI	33 ± 14	14 ± 5	17 ± 8	49 ± 29	34 ± 20	<0.05	<0.05
NO production[‡]	6.8 ± 1.3	6.6 ± 2.6	5.5 ± 1.9	11.5 ± 5.8	7.9 ± 3.0	NS	NS
Plasma ADMA (µmol/L)	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.2	NS	NS
Muscle inos/enos mRNA	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.03	<0.05	NS
NO production[§]	0.32 ± 0.16	0.35 ± 0.10	0.29 ± 0.11	0.39 ± 0.10	0.39 ± 0.12	NS	NS
Plasma nitrotyrosine (nmol/L)	5.3 ± 2.9	12.5 ± 6.4	8.5 ± 2.9	7.8 ± 3.4	8.2 ± 4.7	<0.05	<0.05

[†] Data are means ± SD, n=7 to 8 except for mRNA data where n=5.

[‡] Urinary $^{15}NO_3^-$ excretion ‰15N recovered after [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl i.v. bolus /mmol creatinine

[§] pmol/mmol creatinine

Table 2: Stepwise multiple regression for OGTT ISI*

	Step	Estimated parameter	Model R^2	P value
Intercept		-25.9		0.075
NO production†	1	2.25	0.38	0.0062
Muscle iNOS/eNOS mRNA	2	-3.04	0.58	0.017

* Variables entered in the model: plasma nitrotyrosine concentrations, plasma ADMA concentrations, muscle iNOS/eNOS mRNA, NO production, urinary cGMP excretion.

† Urinary $^{15}NO_3^-$ excretion ‰^{15}N recovered after [$^{15}N_2$-(guanido)]-arginine:HCl i.v. bolus /mmol creatinine

DISCUSSION GENERALE

REGIMES HYPERPROTEIQUES, COMPOSITION CORPORELLE ET REGULATION DE LA GLYCEMIE

L'impact de l'équilibre en macronutriments du régime sur la composition corporelle et la régulation glycémique est actuellement l'objet de débat dans le contexte de l'augmentation exponentielle de l'incidence de l'obésité et du diabète. Si plusieurs études suggèrent que l'augmentation de la fraction protéique de l'alimentation est associée à une diminution de la prise alimentaire et du dépôt adipeux (Baba *et al.*, 1999; Gannon *et al.*, 2003; Layman, 2003), l'effet sur la régulation glycémique reste controversé (Linn *et al.*, 2000). Les mécanismes sous-jacents sont mal connus et notamment, les contributions respectives de la diminution de l'apport énergétique et de l'augmentation de l'apport protéique dans les effets métaboliques associés aux régimes hyperprotéiques ne sont pas établies. Dans le premier volet de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'impact de modifications quantitatives et qualitatives de l'apport protéique sur la composition corporelle et la régulation de la glycémie chez le rat, en comparant ces paramètres chez des rats recevant un régime NP ad libitum (NP), HP ad libitum (HP), NP restreint à l'apport énergétique spontané des rats HP (NPr), et HP ad libitum en utilisant comme source protéique l'αLAC (HPL).

Régimes hyperprotéiques, satiété et apport énergétique

Nos résultats indiquent que la consommation d'un régime hyperprotéique (HP ou HPL) pendant 8 semaines, comparée à celle du régime NP, induit une réduction de la consommation énergétique spontanée, de la croissance pondérale et du dépôt adipeux, sans modification de la masse maigre

La diminution de 30% de la consommation alimentaire des rats HP et HPL lors de l'introduction des régimes hyperprotéiques et son retour graduel mais incomplet au niveau de celle des rats NP au cours des jours suivants est un résultat en accord avec ceux d'autres auteurs (Jean *et al.*, 2001; Morens *et al.*, 2001). Si la réduction initiale de la prise alimentaire est attribuable à la fois à la moindre palatabilité de l'aliment HP comparé à l'aliment NP (McArthur *et al.*, 1993) et à l'effet satiétogène important des protéines (Bensaid *et al.*, 2003), celle observée après les quelques jours nécessaires à l'adaptation au nouveau régime est entièrement attribuable à l'effet satiétogène des protéines (Bensaid *et al.*, 2003; L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004a). De la même manière, plusieurs études réalisées chez l'Homme

indiquent que l'ingestion d'un repas riche en protéines induit une sensation de satiété plus importante que celle ressentie après l'ingestion de repas riches en glucides ou en lipides ; ces études suggèrent que les protéines alimentaires augmentent la satiété par l'intermédiaire de modifications du profil postprandial de sécrétion d'hormones intestinales : augmentation de la sécrétion des hormones anorexigènes PYY (Batterham *et al.*, 2006), GLP-1 et CCK (Lejeune *et al.*, 2006) et suppression accrue de la sécrétion de ghréline (Tannous Dit El Khoury *et al.*, 2006). A plus long terme, bien que la plupart des études ayant exploré l'effet de l'apport protéique sur la prise énergétique chez l'Homme aient été réalisées dans un contexte de restriction énergétique, une condition qui masque l'effet de la composition en macronutriments du régime, l'effet satiétogène accru des protéines par rapport à celui des autres macronutriments a été confirmé (Weigle *et al.*, 2005; Lejeune *et al.*, 2006). Cet effet impliquerait une augmentation de la sensibilité du système nerveux central à l'action de la leptine (Weigle *et al.*, 2005), tandis que la teneur en protéines de l'alimentation ne modifierait pas significativement la sécrétion de leptine et de ghréline.

Nos travaux n'ont pas mis en évidence d'effet qualitatif de l'apport protéique sur la prise énergétique, puisque la consommation alimentaire des rats HPL ne différait pas de celle des rats HP. Ce résultat ne confirme pas l'effet satiétogène important des protéines de lactosérum, comparées aux caséines ou à d'autres sources protéiques, mis en évidence à court terme par plusieurs études réalisées chez l'Homme (Hall *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004). Cependant, à plus long terme, si la source protéique influence la prise énergétique de rats recevant une alimentation normoprotéique (14% de l'énergie fournie sous forme de protéines) (Faipoux *et al.*, 2006), deux études suggèrent qu'elle ne l'influence pas lorsque plus de 30% de l'énergie est fournie sous forme de protéines (Belobrajdic *et al.*, 2004; L'Heureux-Bouron *et al.*, 2004b). Dans ces conditions, l'effet satiétogène associé à la quantité importante de protéines ingérées pourrait masquer l'effet de la source protéique sur la prise alimentaire.

Contributions respectives de la réduction spontanée de l'apport énergétique et de l'augmentation de l'apport protéique aux effets métaboliques des régimes hyperprotéiques

La réduction de la croissance pondérale des rats HP et HPL comparés aux rats NP est principalement attribuable à la diminution de leur apport énergétique, puisque l'efficacité énergétique du régime HP était similaire à celle du régime NP et que la croissance pondérale des rats NPr était similaire à celle des rats HP. En revanche, la composition corporelle des

rats HP était significativement influencée par le ratio protéines/glucides du régime. Le moindre poids corporel des rats HP à 8 semaines était associé à une réduction du dépôt adipeux, de la lipogenèse et une augmentation du ratio masse maigre/masse grasse tandis que chez les rats NPr, ces paramètres ne différaient pas de ceux des rats NP.
Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études similaires réalisées chez le rat (Jean *et al.*, 2001; Lacroix *et al.*, 2004), ceux d'études réalisées chez l'Homme sain (Weigle *et al.*, 2005) ou ceux d'études cliniques réalisées chez des sujets obèses et/ou insulino-résistants (Baba *et al.*, 1999; Skov *et al.*, 1999; Gannon *et al.*, 2004; Layman, 2004), qui ont mis en évidence une diminution du dépôt adipeux en réponse à une substitution partielle des glucides du régime par des protéines, sans effet sur la masse maigre. Chez les rats HP, une augmentation de la thermogenèse postprandiale contribuerait à la diminution du dépôt adipeux (Petzke *et al.*, 2005), un résultat également rapporté chez l'Homme sain (Westerterp *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 2002). Cependant, l'importance quantitative de ce mécanisme a été récemment remise en question (Scott *et al.*, 2005)(Even P., communication personnelle) et des résultats très récents suggèrent que la moindre adiposité observée chez des animaux adaptés à la consommation de régimes hyperprotéiques serait la conséquence d'une orientation des glucides du régime vers la glycogénogenèse plutôt que vers la lipogenèse (Azzout-Marniche *et al.*, 2006; Baum *et al.*, 2006).

Chez les rats HP, l'amélioration de la composition corporelle s'accompagnait d'une amélioration de la régulation de la glycémie, comme l'indiquent la réduction de la glycémie à jeun, l'amélioration de la tolérance orale au glucose et de la sensibilité à l'insuline, telle qu'évaluée par l'index HOMA. L'augmentation de l'expression musculaire de SREBP-1c et de HKII suggère que l'utilisation périphérique du glucose était accrue chez les animaux HP. Ces améliorations s'expliquaient principalement par l'augmentation du ratio protéines/glucides du régime et étaient indépendantes de la réduction de l'apport énergétique.
Nos résultats sont en accord avec ceux d'autres études ayant mis en évidence les effets bénéfiques à moyen terme d'une augmentation de la fraction protéique du régime sur l'homéostasie du glucose chez la souris nourrie avec un régime hyperlipidique (Klaus, 2005), chez le rat (Lacroix *et al.*, 2004) ou chez l'Homme (Gannon *et al.*, 2003; Layman *et al.*, 2004). Cependant, notre étude n'a pas mis en évidence de différences de sensibilité à l'insuline par l'intermédiaire du test de sensibilité à l'insuline, contrairement à l'étude de Klaus *et al.* Le manque de sensibilité de ce test pourrait expliquer cette contradiction, car la forte dose d'insuline utilisée pourrait ne pas être appropriée pour mettre en évidence de

faibles différences de sensibilité à l'insuline, telles celles attendues entre les rats NP et HP ; dans l'étude de Klaus *et al.*, les différences de sensibilité à l'insuline entre les groupes sont plus marquées ce qui pourrait être la conséquence du contexte hyperlipidique de l'étude, une condition qui favorise l'apparition d'une IR. De plus, l'activation lors de ce test d'une contre-régulation hormonale qui est susceptible de varier en fonction de la teneur en protéines du régime pourrait influencer les résultats obtenus (Wallace *et al.*, 2002).

A l'inverse, une autre étude réalisée chez le rat a mis en évidence que la consommation à court terme d'un régime hyperprotéique (10 jours) induit une IR hépatique et périphérique (Rossetti *et al.*, 1989). Le choix de la méthode d'investigation de l'insulino-sensibilité pourrait expliquer les différences de résultats d'une étude à l'autre. Dans notre étude comme dans celles de Klaus *et al.* et de Lacroix *et al.*, des approches indirectes ont été utilisées pour évaluer la sensibilité à l'insuline (test oral de tolérance au glucose et test de sensibilité à l'insuline). Le test oral de tolérance au glucose présente l'avantage d'explorer la régulation glycémique dans des conditions relativement nutritionnelles, puisque le challenge imposé est celui d'une charge orale de glucose, mais ce test ne permet pas de dissocier les contributions respectives de la sécrétion d'insuline, de la captation périphérique de glucose et de la production hépatique de glucose dans la réponse glycémique obtenue. Ainsi, cette méthode permet une mesure de la capacité à réguler la glycémie, plus qu'une mesure de la sensibilité à l'insuline. Il en est de même pour les différents index d'insulino-sensibilité, Belfiore et HOMA (Belfiore *et al.*, 1998; Wallace *et al.*, 2004). En revanche, l'utilisation dans l'étude de Rossetti *et al.* du clamp euglycémique hyperinsulinémique, méthode de référence pour mesurer l'insulino-sensibilité (Scheen, 2001), permet une meilleure évaluation de la sensibilité à l'insuline, mais ne permet pas d'apprécier la régulation glycémique à l'échelle de l'organisme entier. Cette méthode présente de plus un aspect peu physiologique, l'hyperinsulinémie élevée et prolongée, condition dans laquelle (1) la libération d'acides gras libres, modulateurs de la captation de glucose, est inhibée (Belfiore, 2000) et (2) les acides aminés activent les mécanismes de rétro-inhibition de la voie de signalisation de l'insuline (Tremblay *et al.*, 2001). Par conséquent, si plusieurs études rapportent que les résultats obtenus à l'aide du test oral de tolérance au glucose ou des différents index d'insulino-sensibilité sont bien corrélés aux résultats obtenus lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (Matsuda *et al.*, 1999; Rabasa-Lhoret *et al.*, 2001), la possibilité de divergences n'est pas exclue (Nijpels *et al.*, 1994; Belfiore, 2000).

Par ailleurs, la différence de durée d'adaptation au régime hyperprotéique entre notre étude et celle de Rossetti *et al.* (8 semaines vs. 10 jours) pourrait expliquer les différences de résultat.

En particulier, dans l'étude de Rossetti, aucune différence de poids et de composition corporelle n'est rapportée entre les rats NP et HP après 10 jours de régime. Or, le tissu adipeux joue un rôle dans le développement de l'IR et la masse musculaire est directement impliquée dans la captation du glucose. Ainsi, dans notre étude, l'augmentation du ratio masse maigre/masse grasse des rats HP pourrait jouer un rôle important dans l'amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. Dans cette hypothèse, on pourrait s'attendre à une amélioration de la tolérance au glucose et de la régulation de la glycémie plus marquée chez les rats HPL que chez les rats HP, mais cet aspect n'a pas pu être exploré.
Malgré la mise en évidence par Rossetti *et al.* d'une IR périphérique et hépatique chez les rats nourris avec un régime hyperprotéique, ces auteurs rapportent une réduction significative de l'hyperglycémie postprandiale dans ce groupe, un résultat en accord avec ceux d'autres études (Kettelhut *et al.*, 1980; Baum *et al.*, 2006). Plus que la sensibilité à l'insuline, la capacité de réduire les excursions glycémiques postprandiales est un indicateur pertinent pour évaluer l'effet d'un régime sur l'homéostasie du glucose, les variations de la glycémie au cours des transitions d'état nutritionnel jouant un rôle important dans les mécanismes de la pathogenèse de l'IR (Sies *et al.*, 2005). Ces résultats sont donc en faveur d'un effet bénéfique des régimes hyperprotéiques sur la régulation glycémique.

Influence de l'augmentation de l'apport protéique et de la diminution de l'apport glucidique dans les effets métaboliques des régimes hyperprotéiques

Dans notre approche expérimentale, la modulation de la teneur en protéines des régimes expérimentaux aux dépens de leur teneur en glucides rend difficile l'évaluation des contributions respectives de la diminution de l'apport glucidique et de l'augmentation de l'apport protéique aux bénéfices métaboliques des régimes hyperprotéiques.
La réduction de la fraction glucidique des régimes HP et HPL joue certainement un rôle majeur dans leurs effets sur la composition corporelle et la lipogenèse, puisque la teneur en glucides et l'index glycémique du régime sont les déterminants principaux de la lipogenèse de novo (Parks, 2002; Pawlak *et al.*, 2004). En effet, plusieurs études expérimentales ont mis en évidence que la régulation de l'expression des gènes de la lipogenèse (pyruvate kinase, FAS, Acétyl-CoA carboxylase) est gouvernée par le glucose et l'insuline, par l'intermédiaire de facteurs de transcription dont les plus connus sont SREBP-1c et ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein)(Foretz *et al.*, 1999; Dentin *et al.*, 2004). Chez le rat, la réduction de l'apport glucidique sans modification de l'apport protéique induit une réduction

de l'activité de FAS, de la lipogenèse et du dépôt adipeux (Pichon *et al.*, 2006). A l'inverse, chez l'Homme sain, la consommation d'un régime hyperglucidique active l'expression de SREBP-1c et de FAS (Minehira *et al.*, 2004), réduit la lipolyse et active la lipogenèse (Schwarz *et al.*, 1995). Ainsi, la moindre teneur en glucides des régimes HP et HPL et la réduction des excursions insuliniques et glycémiques qui y est associée seraient responsables de la réduction de l'expression de SREBP-1c et de FAS mesurée chez les rats HP, et de la moindre lipogenèse chez les rats HP et HPL.

Toutefois, une étude suggère que la lipogenèse pourrait également être affectée de façon spécifique par le niveau d'apport protéique du régime. Dans cette étude, l'incubation d'hépatocytes dans un milieu déficient en l'un des acides aminés essentiels induit une diminution des concentrations en ARNm de FAS par l'intermédiaire d'un effet post-transcriptionnel qui ferait intervenir la déacylation des ARN de transfert (Dudek *et al.*, 1995). L'absence de certains acides aminés, comme la lysine, est associée à une réduction plus marquée de l'expression de FAS, ce qui suggère un effet de variations qualitatives de l'apport protéique sur la lipogenèse. La mise en évidence d'un effet de la source protéique sur la composition corporelle des rats HPL comparés aux rats HP est en faveur de cette suggestion et un résultat similaire a été rapporté par d'autres auteurs (Belobrajdic *et al.*, 2004; Morifuji *et al.*, 2005). Ces deux études confirment que la consommation d'un régime hyperprotéique contenant des protéines de lactosérum, comparé à des régimes hyperprotéiques à base de caséines ou de protéines de viande rouge, favorise la diminution du dépôt adipeux, un effet qui serait en partie lié à une moindre expression et activité hépatique des enzymes de la lipogenèse (Acétyl-CoA carboxylase, FAS, enzyme malique, adénosine triphosphate citrate lyase). Cependant, nos résultats, ainsi que ceux de Morifugi *et al.* et Belobrajdic *et al.*, ne permettent pas de déterminer si l'effet particulièrement bénéfique des protéines de lactosérum sur la composition corporelle est la conséquence d'une variation de l'apport en certains acides aminés spécifiques - comme les AAR ou les AAS, dont les teneurs sont importantes dans les protéines de lactosérum – ou celle d'une variation des cinétiques postprandiales de mise à disposition des acides aminés. Si l'influence de ce-dernier paramètre sur l'anabolisme protéique a été mise en évidence chez l'Homme (Dangin *et al.*, 2001), il module surtout le développement de la masse musculaire et son effet est plus marqué chez le sujet âgé (Arnal *et al.*, 1999).

Par conséquent, bien que certains résultats indiquent un rôle de la nature des protéines du régime sur la composition corporelle, la diminution de la lipogenèse dans le cadre de régimes

hyperprotéiques semble être principalement la conséquence de la réduction de l'apport glucidique.

La question des rôles respectifs de l'augmentation de l'apport protéique et de la diminution de l'apport glucidique se pose également lors de l'interprétation des effets bénéfiques du régime HP sur la régulation glycémique. Un nombre croissant de données épidémiologiques et cliniques indique que chez l'Homme sain, une réduction de l'index glycémique et de la charge glycémique du régime, indépendamment de sa composition en macronutriments, améliore la régulation de la glycémie (Wolever *et al.*, 2003; McKeown *et al.*, 2004; Schulze *et al.*, 2004). Les études montrant l'effet bénéfique de la consommation de fibres et de céréales complètes sur la sensibilité à l'insuline sont en faveur de cette hypothèse (Meyer *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2002). Ces études suggèrent que les pics hyperglycémiques, tels ceux observés en réponse à l'ingestion d'un régime à fort index glycémique, représentent un challenge vis-à-vis de l'homéostasie du glucose qui favorise l'altération des mécanismes de régulation de la glycémie (Daly, 2003). Dans le cadre des régimes hyperprotéiques, la réduction de la charge glycémique du régime (Rossetti *et al.*, 1989; Baum *et al.*, 2006), principalement attribuable à la réduction de sa teneur en glucides, participe donc à l'amélioration de la régulation glycémique.

Par ailleurs, une augmentation du ratio protéines/glucides du régime pourrait se traduire par une modification des contributions respectives du foie et des organes périphériques à la régulation glycémique (Baum *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, l'augmentation de l'apport en acides aminés résulterait en une activation du cycle alanine-glucose et de la néoglucogenèse hépatique qui permettrait une réduction des variations de la glycémie au cours des transitions d'état nutritionnel. La réduction parallèle de l'apport glucidique limiterait la contribution des tissus périphériques à la régulation glycémique postprandiale. Cette étude suggère donc que l'augmentation de l'apport protéique et la réduction de l'apport glucidique contribuent tous deux à l'amélioration de la régulation glycémique, en intervenant respectivement sur ses composantes hépatiques et périphériques.

Nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'apport protéique modifie également le métabolisme du glucose au niveau périphérique, puisque chez les rats HP les niveaux d'expression musculaire de SREBP-1C et HK2 sont plus élevées que chez les rats NP et NPr. Ce résultat, en faveur d'une augmentation de l'utilisation du glucose au niveau périphérique, ne peut pas s'expliquer simplement par la réduction de l'insulinémie et de la glycémie postprandiale chez les rats HP, résultant de la diminution de l'apport glucidique, insuline et

glucose étant au contraire des activateurs de l'expression de ces deux gènes (Gosmain *et al.*, 2005). Il suggère un rôle spécifique de la fraction protéique de l'alimentation dans l'utilisation périphérique du glucose. Toutefois, il ne s'agit encore que de résultats parcellaires qui devront être complétés dans l'avenir par la mise en évidence de modifications de la captation de glucose, de son oxydation ou de la synthèse de glycogène par les acides aminés.

D'autres études ont mis directement en évidence l'implication de la fraction protéique de l'alimentation dans la régulation glycémique. Chez l'Homme sain, un apport supplémentaire en acides aminés à long terme améliore la sensibilité à l'insuline (Solerte *et al.*, 2004; Manzella *et al.*, 2005) et l'ingestion de certains acides aminés en aigu (arginine, proline, glycine) améliore la régulation glycémique (Gannon *et al.*, 2002a; Gannon *et al.*, 2002b; Nuttall *et al.*, 2004). La mise en évidence d'un rôle de la nature des protéines du régime dans la régulation glycémique représente un argument supplémentaire en faveur d'un rôle spécifique des protéines dans l'homéostasie du glucose. Chez le rat, la consommation de protéines de lactosérum, de morue ou de soja, comparée à celle de caséines, favoriserait une meilleure insulino-sensibilité (Lavigne *et al.*, 2000; Tremblay *et al.*, 2003; Belobrajdic *et al.*, 2004). Parmi les acides aminés candidats qui pourraient être plus impliqués dans l'effet des régimes hyperprotéiques sur la régulation de la glycémie, le rôle des AAR a été suggéré dans plusieurs études. D'après les travaux de l'équipe de Layman (Layman, 2003; Layman *et al.*, 2004; Baum *et al.*, 2006), les AAR jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du glucose de part leur contribution au cycle alanine-glucose, qui assure un approvisionnement permanent du foie en alanine et glutamine, utilisées pour la néoglucogenèse. De plus, les AAR moduleraient le transport de glucose au niveau musculaire par l'intermédiaire d'interactions avec la voie de signalisation de l'insuline (Doi *et al.*, 2005; Nishitani *et al.*, 2005). L'apport en arginine pourrait également favoriser une meilleure régulation glycémique par l'intermédiaire du NO, qui influence la captation de glucose au cours de la période postprandiale en activant le recrutement vasculaire périphérique (Baron *et al.*, 2000). Ainsi, l'effet bénéfique des protéines de morue et de soja sur la régulation glycémique, comparées aux caséines (Lavigne *et al.*, 2000), pourrait s'expliquer par leur forte teneur en arginine. C'est en effet ce que suggère l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observée chez des rats consommant un régime à base de caséine et supplémenté en arginine (Vahouny *et al.*, 1985).

La question d'un rôle spécifique éventuel des AAS dans la régulation glycémique n'a pratiquement jamais été abordée. Pourtant, les AAS pourraient favoriser l'homéostasie du

glucose au travers de leur rôle de précurseur dans la synthèse de glutathion (Griffith, 1999). Il existe plusieurs arguments en faveur d'un rôle du glutathion dans la régulation glycémique. En aigu et à court terme, le glutathion pourrait contribuer à la formation de la SHSI (Guarino *et al.*, 2003). A plus long terme, il participe au maintien du statut redox de l'organisme (Wu *et al.*, 2004), une fonction qui influence les mécanismes de régulation de la glycémie (Khamaisi *et al.*, 2000; Ogihara *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus chez les rats recevant un régime HP n'apportent pas d'élément spécifique en faveur d'une implication de l'apport en AAS dans les effets bénéfiques du régime HP sur la régulation glycémique, en dépit de l'observation d'un effet de l'apport protéique sur certains paramètres liés au stress oxydant (carbonylation des protéines plasmatiques et hépatiques) en accord avec les travaux de Petzke *et al.* (Petzke *et al.*, 1999). En effet, nous n'avons pas observé d'amélioration du statut hépatique en glutathion chez les rats HP. Ce dernier point est en accord avec les travaux de l'équipe de Stipanuk, qui rapportent également que la teneur en protéines du régime influence peu les concentrations hépatiques en glutathion à jeun (Bella *et al.*, 1999a; Stipanuk *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004). Cependant, ces mesures ont été réalisées chez l'animal à jeun et n'excluent pas la possibilité d'une augmentation des concentrations en glutathion hépatiques et sanguines en phase postprandiale, telles que rapportées par Morand *et al.* (Morand *et al.*, 1997). Ces augmentations, si elles étaient avérées, pourraient contribuer à l'amélioration de la régulation glycémique au travers des mécanismes mentionnés précédemment.

Dans la suite de nos travaux, nous avons voulu explorer le rôle de l'apport en AAS, et particulièrement de l'apport en cystéine, dans la régulation glycémique. Dans ce but, nous avons mis à profit la teneur particulièrement élevé en cystéine de l'αLAC et nous avons comparé l'effet de cette source protéique à celui d'un donneur de cystéine, le N-acétylcystéine. Afin de faciliter la mise en évidence de l'effet de l'apport en cystéine, nous avons travaillé chez le rat sédentaire nourri avec un régime HS, un modèle d'induction nutritionnelle de stress oxydant associé à court terme à une IR, et nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets de l'apport en cystéine sur le métabolisme du glutathion et la régulation de la glycémie au cours de la période postprandiale, une condition favorable à l'activation de la synthèse de glutathion.

APPORT ALIMENTAIRE EN CYSTEINE, STATUT EN GLUTATHION ET REGULATION DE LA GLYCEMIE CHEZ LE RAT NOURRI AVEC UN REGIME HYPERSACCHAROSE

L'apport alimentaire en AAS module la synthèse et le turnover du glutathion, principal antioxydant de l'organisme, car ils fournissent la cystéine, son substrat limitant (Morand *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 2000). Bien que plusieurs études épidémiologiques, cliniques et expérimentales indiquent que le stress oxydant joue un rôle dans la physiopathologie de l'IR (Gopaul *et al.*, 2001; Midaoui *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2004), peu d'études ont exploré le rôle de l'apport en AAS dans la régulation de la glycémie. Les travaux publiés ont exploré cet aspect au travers d'un donneur pharmacologique de cystéine, et il n'existe pas d'étude abordant ce problème au travers de l'utilisation de protéines riches en cystéine. Dans le deuxième volet de nos travaux, nous nous sommes donc intéressés à l'effet à court et moyen terme de modulations de l'apport en cystéine – en utilisant une source protéique riche en cystéine, l'αLAC, ou un donneur de cystéine, le NAC, administré à dose faible ou moyenne - sur l'homéostasie du glucose chez le rat nourri avec un régime HS, une situation pro-oxydante qui induit des altérations des mécanismes de la régulation glycémique.
Nos résultats indiquent que l'augmentation de la teneur en cystéine d'un repas HS améliore la régulation postprandiale de la glycémie. A plus long terme, elle prévient la dégradation du statut en glutathion, l'apparition d'un stress oxydant et les dérégulations des mécanismes de l'homéostasie du glucose induites par un régime HS. Cependant, bien que l'effet de l'αLAC soit en grande partie mimé par un apport supplémentaire en NAC, ce qui suggère un rôle de la forte teneur en cystéine de l'αLAC dans les effets constatés, nos résultats ne permettent pas d'exclure la participation d'autres acides aminés aux effets bénéfiques de cette source protéique.

Effets d'une augmentation en aigu de la teneur en cystéine d'un repas hypersaccharosé sur le statut en glutathion et la régulation de la glycémie

Les résultats de l'étude en aigu montrent clairement l'implication de la synthèse de glutathion dans les effets bénéfiques de l'apport supplémentaire en NAC sur la régulation de la glycémie postprandiale en réponse à un repas HS : l'amélioration de la régulation de la glycémie postprandiale chez les rats HS_1 et HS_2, mise en évidence par la mesure d'une réduction de

l'excursion glycémique et de la sécrétion d'insuline dans ces groupes, comparés au groupe HS_0, était complètement inhibée en présence d'un inhibiteur spécifique de la synthèse de glutathion, le BSO.

Cette étude présente toutefois plusieurs limites qui compliquent son interprétation. Si le traitement au BSO fait disparaître l'effet du NAC sur la régulation glycémique postprandiale, on observe à l'inverse pas ou peu d'effet des repas riches en cystéine sur le statut en glutathion. Le seul marqueur du statut en glutathion que l'on puisse explorer en cinétique, les concentrations sanguines en glutathion, n'était pas significativement influencé par la nature du repas ingéré. Cependant, ce résultat n'exclut pas la possibilité de modifications de la synthèse et/ou du turnover du glutathion au niveau hépatique - des données qu'il n'a pas été possible d'obtenir dans notre étude - ce qui serait en accord avec les résultats d'autres auteurs, qui ont mis en évidence (1) une augmentation des concentrations portales en cystéine en réponse à l'ingestion de NAC (Moldeus *et al.*, 1994) ou d'AAS (Morand *et al.*, 1997), et (2) une activation de la synthèse de glutathion en réponse à une augmentation de la disponibilité hépatique en cystéine (Morand *et al.*, 1997). De fait, les pools hépatique et sanguin de glutathion n'évoluent pas toujours de façon parallèle, le foie étant le principal organe de synthèse et de stockage de glutathion avec un turnover et un niveau d'export du glutathion élevé afin de maintenir les pools de glutathion extra-hépatiques (Ookhtens *et al.*, 1998). Ainsi, dans des conditions qui challengent le statut redox, les stocks hépatiques de glutathion sont rapidement épuisés tandis que les concentrations sanguines en glutathion sont peu affectées (Griffith *et al.*, 1979b), un aspect bien mis en évidence dans l'expérience pilote de l'article 2.

Le deuxième aspect qui complique l'interprétation des données obtenues en aigu est l'observation d'une réduction globale, indépendante de la nature du repas ingéré, des excursions glycémiques et insuliniques dans le groupe de rats traités au BSO, comparés aux rats non traités. Cette observation pourrait suggérer que le traitement au BSO exerce un effet direct sur la régulation glycémique. Cependant, la comparaison statistique entre rats traités et non traités au BSO et consommant un même repas pourrait conduire à une interprétation erronée du fait de plusieurs facteurs de confusion potentiels : (1) les deux séries d'expériences ont été réalisées à plusieurs mois d'intervalle sur deux lots d'animaux hétérogènes (traités et non-traités au BSO), et d'après notre expérience, il peut exister d'importantes variations de régulation glycémique d'un lot de rat à un autre ; (2) nous n'avons pas utilisé exactement la même technique de prélèvement sanguin pour les deux expériences et lors de la première expérience, le cathéter cardiaque était relié à une longue tubulure en sylastique (80cm), une

procédure qui permet d'effectuer des prélèvements sanguins répétés sur rat vigile sans contention (Nicolaidis *et al.*, 1974), tandis que dans la seconde expérience, les prélèvements étaient réalisés directement à partir de la sortie craniale du cathéter afin de réduire le volume mort du cathéter de prélèvement ; (3) les rats traités au BSO ont tous reçu une injection sous-cutanée 1 heure avant l'ingestion du repas, à l'inverse des rats non-traités au BSO, et l'injection pourrait en elle-même moduler la régulation glycémique, indépendamment de la nature de la substance injectée. Bien que nous ne puissions pas totalement exclure une réduction des excursions glycémiques et insuliniques en réponse au BSO, l'importance de l'effet de l'apport supplémentaire en NAC sur la régulation de la glycémie chez les rats non-traités au BSO, et l'absence totale de différences entre les groupes HS_0, HS_1 et HS_2 chez les rats traités au BSO, suggèrent fortement l'implication de la synthèse de glutathion dans les effets bénéfiques de l'apport supplémentaire en NAC.

D'autres auteurs ont également mis en évidence un effet bénéfique du NAC sur la régulation glycémique en aigu. Chez le sujet sain, une perfusion intraveineuse de NAC lors d'un clamp hyperglycémique améliore la sensibilité à l'insuline (Ammon *et al.*, 1992) et une étude plus récente réalisée chez le rat a montré qu'une perfusion de NAC réduit l'insulino-sécrétion pendant un clamp hyperglycémique et prévient le stress oxydant et l'IR induits par le clamp hyperglycémique (Haber *et al.*, 2003). Dans ces deux études, les auteurs attribuent l'effet bénéfique du NAC à ses propriétés antioxydantes plus qu'à son rôle de donneur de cystéine et précurseur du glutathion, cette conclusion s'appuyant sur l'observation qu'une perfusion de taurine, un antioxydant non précurseur du glutathion, induit des effets similaires à ceux du NAC (Haber *et al.*, 2003). Cependant, dans notre étude, l'administration du NAC par voie orale est favorable à son rôle en tant que donneur de cystéine puisqu'il subit un important métabolisme de premier passage, tandis que l'administration par voie intraveineuse est plus propice à ses effets antioxydants directs.

Si nos résultats sont en faveur de l'implication de la synthèse de glutathion dans les effets bénéfiques du NAC sur la régulation glycémique postprandiale, notre étude ne permet pas de préciser les mécanismes qui y sont associés. Dans l'expérience 1 (rats non traités), l'absence de modification du ratio glutathion oxydé/glutathion total en réponse aux repas enrichis en NAC ne permet pas de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'apport en cystéine favorise la régulation glycémique par l'intermédiaire d'une amélioration du statut en glutathion et du statut redox. L'inclusion d'un groupe de rat recevant un repas non saccharosé aurait pu être

utile pour mieux évaluer l'effet du repas témoin riche en saccharose (HS_0) sur le statut redox postprandial. La seconde hypothèse qui permettrait d'expliquer les effets bénéfiques de l'apport en cystéine sur la régulation glycémique postprandiale est celle qui considère que le glutathion néosynthétisé chez les rats recevant les repas riches en cystéine participe à la formation de la substance hépatique sensibilisant à l'insuline (SHSI). En effet, la synthèse de cette substance met en jeu la production de NO et de glutathion (Guarino *et al.*, 2003). Pour valider la participation de la SHSI aux effets du NAC sur la régulation glycémique postprandiale dans notre modèle, nous aurions pu explorer l'effet d'un inhibiteur de la synthèse de NO, comme le L-NAME, seul ou en présence de BSO. Enfin, bien que l'apport supplémentaire en NAC mime les effets de l'αLAC, nos résultats suggèrent que d'autres mécanismes que ceux liés à la synthèse de glutathion interviennent dans les effets bénéfiques de cette source protéique sur la régulation glycémique postprandiale. Des différences de cinétique de digestion et de mise à disposition des acides aminés au cours de la phase postprandiale, ainsi que la présence dans l'αLAC d'autres acides aminés favorables à la captation de glucose, comme les AAR (Nishitani *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 2005), pourraient participer aux différences observées entre le NAC et l'αLAC.

Effets d'une augmentation de l'apport en cystéine à moyen terme sur le métabolisme du glutathion, le statut redox de l'organisme et la régulation de la glycémie chez le rat nourri avec un régime hypersaccharosé

Dans la suite de nos travaux, nous nous sommes intéressés aux effets de l'apport en cystéine sur la régulation glycémique à plus long terme chez le rat nourri avec un régime HS, une condition associée à la mise en place rapide d'un stress oxydant (Busserolles *et al.*, 2002a), et nous avons approfondi l'exploration des effets de l'apport alimentaire en cystéine sur le métabolisme du glutathion et le statut en glutathion en l'étudiant à la fois au niveau hépatique, sanguin et périphérique.

La consommation pendant 6 semaines du régime HS_0 était associée à une altération marquée du statut en glutathion de l'organisme et à l'apparition d'un stress oxydant au niveau sanguin, musculaire et cardiaque, objectivé par l'augmentation des concentrations en protéines carbonylées, un résultat en accord avec ceux d'autres études (Peters *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2006). Au niveau hépatique, bien que le statut en glutathion des rats HS_0 était altéré en comparaison de celui des rats ST, le niveau de carbonylation des protéines n'était pas affecté.

Cependant dans cet organe, le potentiel redox du glutathion est plus réduit qu'au niveau du cœur ou du foie (-250 mV vs. -210 mV dans le muscle et le cœur) ce qui traduit une meilleure protection antioxydante. Les données obtenues en période postprandiale - la diminution des concentrations plasmatiques en cystéine et l'augmentation prononcée du potentiel redox du glutathion en réponse au repas HS_0 - confirment l'importance de l'hyperglycémie postprandiale dans l'induction du stress oxydant dans ce groupe. Pour renforcer cette conclusion, il aurait été intéressant de réaliser l'expérience postprandiale chez les rats ST et de comparer les données obtenues à celles des rats HS_0.
La consommation du régime HS_0 n'était pas associée à une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la γ-GCS, observées fréquemment en situation de stress oxydant (Shi *et al.*, 1994)[Moellering, 1998 #656). Cependant, les concentrations hépatiques en glutathion total étaient réduites chez les rats HS_0 comparés aux rats ST, tandis que dans les autres organes elles ne différaient pas entre les groupes. Ces résultats suggèrent une augmentation de l'export hépatique du glutathion chez les rats HS_0 comparés aux rats ST, qui pourrait représenter une adaptation du métabolisme du glutathion au stress oxydant induit par l'alimentation HS, en faveur du maintien du statut redox extra-hépatique.

Nos résultats indiquent également que la consommation pendant trois semaines des régimes enrichis en cystéine, comparée à celle du régime ST, était associée à une augmentation des concentrations sanguines en glutathion total, de la capacité antioxydante totale plasmatique, et à une réduction du potentiel redox du glutathion sanguin. Ces résultats pourraient traduire une activation transitoire et importante de la synthèse hépatique de glutathion et de son export. Cependant, après 6 semaines, ces paramètres n'étaient plus différents entre les rats ST et les rats supplémentés en cystéine, ce qui pourrait suggérer un ajustement de la synthèse et de l'export de glutathion par rapport aux apports en cystéine et aux besoins de l'organisme. Cette hypothèse est confortée par la mesure d'une réduction de l'activité et l'expression hépatique de la γ-GCL chez les rats HS_1, HS_2 et HSa, probable conséquence de l'inhibition allostérique exercée par le glutathion sur l'enzyme, comme l'ont déjà rapporté plusieurs auteurs (Bella *et al.*, 1999b). Par ailleurs, l'augmentation des concentrations plasmatiques en taurine à jeun chez les rats HS_1 et HS_2 suggère que la gestion de l'excès de cystéine impliquait également par une activation de la CDO, une voie métabolique également impliquée dans la production de composés antioxydants. Malgré ces modifications en faveur d'une réduction des flux de cystéine vers la synthèse de glutathion, nos résultats suggèrent que la synthèse nette et l'export du glutathion chez les rats recevant les régimes riches en

cystéine étaient supérieurs à ceux du groupe HS_0. Bien que nous n'ayons pas effectué de mesure directe de ces deux paramètres, cette conclusion - déjà rapportée par d'autres auteurs en réponse à une augmentation de l'apport en AAS (Morand *et al.*, 1997; Mariotti *et al.*, 2004) - est suggérée par l'observation que chez les rats recevant les régimes enrichis en cystéine, les concentrations hépatiques en glutathion total étaient supérieures à celles du groupe HS_0 et similaires à celles du groupe ST, tandis que les détériorations induites par l'alimentation HS du statut redox de l'organisme et du potentiel redox du glutathion, à jeun et en période postprandiale, étaient prévenues de façon dose-dépendante.

Chez les rats HS_0, l'altération du statut en glutathion et le stress oxydant s'accompagnaient d'une intolérance au glucose, d'une IR et d'une altération de la signalisation de l'insuline au niveau hépatique et périphérique, des observations en accord avec celles rapportées dans d'autres études (Pagliassotti *et al.*, 1996; Santure *et al.*, 2002). L'augmentation de l'apport en cystéine prévenait ces altérations de façon dose-dépendante et nos résultats suggèrent que les effets bénéfiques de l'apport en cystéine sur la régulation de la glycémie étaient permis par la réduction du stress oxydant mais également par l'amélioration du statut en glutathion, ce-dernier pouvant jouer un rôle spécifique dans l'homéostasie du glucose au-delà de sa participation au maintien du statut redox.

Plusieurs études ont déjà mis en évidence l'effet bénéfique d'un apport supplémentaire en NAC à moyen terme sur le statut redox et la régulation de la glycémie sur des modèles de rats placés dans des conditions pro-oxydantes associées à l'apparition d'une IR. Chez le rat recevant un régime riche en fructose ou en saccharose, un apport supplémentaire en NAC prévient l'apparition d'un stress oxydant, la dégradation du potentiel redox du glutathion et l'IR (Song *et al.*, 2005; Diniz *et al.*, 2006) et des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres modèles animaux d'IR (Kaneto *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999). De la même façon que dans les études ayant exploré les effets du NAC en aigu, les auteurs de ces différents travaux mettent en évidence l'implication du stress oxydant dans les effets délétères de l'hyperglycémie sur l'insulino-sensibilité, et attribuent l'effet bénéfique du NAC à ses propriétés antioxydantes, en s'appuyant sur l'observation que des effets similaires à ceux du NAC sont obtenus avec d'autres antioxydants non précurseurs du glutathion (Kaneto *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1999; Nandhini *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent à l'inverse que les effets du NAC passent principalement par son rôle de donneur de cystéine et de précurseur du glutathion.

Le premier argument en faveur de cette conclusion est l'observation que l'apport supplémentaire en NAC permet d'obtenir des résultats similaires à ceux de la consommation d'une source protéique riche en cystéine, l'αLAC, sur le statut en glutathion et la régulation glycémique, même s'il existe quelques différences entre les réponses observées avec ces deux types de supplémentation en cystéine. De plus, la corrélation significative entre le potentiel redox du glutathion et le niveau d'activation des protéines IRS en réponse à une stimulation insulinique au niveau musculaire suggère une association entre les effets bénéfiques des régimes riches en cystéine sur l'homéostasie du glucose et leur capacité à maintenir le statut en glutathion périphérique. Cette relation avait déjà été suggérée dans des études montrant que chez des sujets insulino-résistants, une amélioration du statut en glutathion par l'intermédiaire d'une perfusion intraveineuse de glutathion réduit induisait une amélioration de l'insulino-sensibilité (Paolisso *et al.*, 1992b; De Mattia *et al.*, 1998). Au niveau hépatique, le niveau d'activation des protéines Akt en réponse à une stimulation insulinique était corrélé aux concentrations hépatiques en glutathion total plutôt qu'au potentiel redox du glutathion, peu affecté par la nature du régime, ce qui suggère que dans cet organe, le glutathion pourrait jouer un rôle spécifique dans l'insulino-sensibilité indépendamment de son rôle dans le statut redox. Cette suggestion est en accord avec les résultats de l'équipe de Lautt, qui indiquent que le glutathion module la sensibilité à l'insuline postprandiale par l'intermédiaire de sa participation à la sécrétion de la SHSI (Guarino *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, l'insuline initie lors de la période postprandiale un réflexe parasympathique qui permettrait la libération par le foie d'une substance sensibilisant les tissus périphériques à l'action de l'insuline (Lautt, 1999). Des résultats obtenus récemment par cette équipe suggèrent que la synthèse de la SHSI met en jeu la production hépatique de glutathion et de NO (Guarino *et al.*, 2003). Parmi les mécanismes possibles, la formation de nitrosoglutathion à partir du glutathion et du NO, conjugué stable et forme de stockage du NO, pourrait favoriser l'action de ce-dernier notamment au niveau du muscle où il joue un rôle dans la captation de glucose.

Chez le rat nourri avec un régime HS, l'IR serait la conséquence d'une moindre production hépatique de cette substance (Ribeiro *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2005) et par conséquent d'une moindre production et/ou biodisponibilité du glutathion et/ou du NO. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse, puisque l'IR mesurée chez les rats HS_0 (ou I) comparés aux rats ST (ou C) s'accompagnait d'une diminution des concentrations hépatiques en glutathion total, d'une dégradation du statut en glutathion de l'organisme et d'une diminution de la biodisponibilité du NO, tandis que chez les rats recevant les régimes riches en cystéine, la prévention de l'IR s'accompagnait d'un maintien de ces paramètres à un niveau similaire à

celui des rats ST (ou C). Chez les rats HS_0, l'ensemble de ces altérations serait la conséquence du stress oxydant induit par la consommation du régime HS (en particulier, la diminution de la biodisponibilité du NO, mise en évidence par l'augmentation marquée des concentrations plasmatiques en nitrotyrosine), qui pourrait induire un découplage de la eNOS, contribuant à accroître ce stress oxydant et conduisant à une diminution de la biodisponibilité du NO dans ce groupe. Cependant, bien que certains de nos résultats - en particulier les corrélations entre différents marqueurs de la régulation glycémique et le statut en glutathion musculaire, les concentrations hépatiques en glutathion total, et la production/biodisponibilité du NO - suggèrent que les effets bénéfiques de l'apport en cystéine sur la régulation glycémique pourraient s'expliquer en partie par une augmentation de la production/biodisponibilité du glutathion et du NO –, ils ne nous permettent pas d'affirmer sans équivoque que l'apport en cystéine influence la régulation glycémique au travers d'un effet sur production et l'action de la SHSI.

Les effets spécifiques des protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine

Nos résultats confirment le rôle de l'αLAC en tant que donneur de cystéine et précurseur du glutathion, déjà rapporté par d'autres auteurs dans des situations de stress oxydant aigu ou chronique (Micke *et al.*, 2002; Mariotti *et al.*, 2004). Cependant, si ce rôle explique en partie l'effet de cette source protéique sur la régulation glycémique en aigu et à plus long terme, les effets de l'αLAC n'étaient pas entièrement similaires à ceux d'une supplémentation en NAC apportant une dose équivalente de cystéine, ce qui indique que d'autres mécanismes pourraient intervenir dans les effets bénéfiques de l'αLAC sur la régulation glycémique et souligne l'intérêt spécifique de cette fraction protéique.

En aigu, nos données indiquent l'existence d'autres mécanismes que ceux associés à la synthèse du glutathion dans l'amélioration de la régulation glycémique postprandiale en réponse au repas HSa. A plus long terme, les effets des régimes HS_1 et HSa différaient également : l'excursion plasmatique postprandiale en cystéine et les concentrations hépatiques en glutathion étaient plus importantes et le stress oxydant musculaire plus faible chez les rats HSa comparés aux rats HS_1, tandis que l'intolérance au glucose était plus marquée chez les rats HS_1. Les concentrations plasmatiques de taurine à jeun des rats HS_1 étaient supérieures à celles des rats HSa, ce qui pourrait suggérer une moindre activation de la CDO chez les rats HSa, en faveur d'une plus grande utilisation de la cystéine pour la synthèse de glutathion.

D'autres études ont déjà mis en évidence l'effet bénéfique des protéines de lactosérum sur la régulation de la glycémie chez le rat (Belobrajdic *et al.*, 2004). Ces études sont en faveur du rôle des AAR, dont la teneur est élevée dans les protéines de lactosérum, dans l'amélioration de la régulation de la glycémie, une hypothèse supportée par plusieurs études ayant mis en évidence des interactions entre la leucine, l'isoleucine et la captation de glucose (Doi *et al.*, 2005; Nishitani *et al.*, 2005). L'effet insulinotrope important de ces protéines, mis en évidence à plusieurs reprise chez l'Homme (Calbet *et al.*, 2002; Frid *et al.*, 2005), pourrait également entrer en jeu dans les mécanismes spécifiques associés à l'effet de l'αLAC, mais notre protocole ne nous a pas permis de répondre à cette question. Il serait donc intéressant de tester les effets d'une double supplémentation en AAR et en NAC sur la régulation glycémique, d'explorer les effets de l'αLAC sur la fonction sécrétoire pancréatique et d'évaluer leur impact dans les effets bénéfiques de cette source protéique sur la régulation glycémique.

PERSPECTIVES

Bien que nos résultats soient en faveur d'un rôle bénéfique de l'apport en cystéine sur le statut redox et la régulation glycémique, plusieurs questions restent en suspend à l'issue de ce travail.

Nous avons porté une attention particulière aux effets aigus et chroniques du régime HS et de la supplémentation en cystéine sur le statut en glutathion et la régulation glycémique en situation postprandiale, mais les données concernant les modifications dynamiques de ces deux composantes au cours et après la période suivant l'ingestion du repas restent parcellaires. Une exploration plus fine de l'impact de nos régimes expérimentaux sur le métabolisme du glutathion à l'aide de l'utilisation de traceurs permettrait d'évaluer les modifications des besoins en glutathion, de la synthèse de glutathion et/ou de son turnover.

De plus, l'hypothèse centrale de nos travaux considère que les altérations de la régulation glycémique observées dans notre modèle d'induction d'une IR sont les conséquences d'une altération du statut redox se traduisant par une demande supplémentaire en glutathion qui peut être satisfaite par une augmentation de l'apport en cystéine, mais la caractérisation de ce stress oxydant est encore très limitée. Il serait nécessaire de compléter cette caractérisation à l'aide d'outils plus fins et plus sensibles permettant l'analyse des effets délétères du stress oxydant au niveau moléculaire (peroxydation lipidique par la mesure des diènes conjugués, des TBARS et des 8-iso-/8-épi-prostaglandine $F_{2\alpha}$; oxydation des protéines par la mesure de la sulfoxydation de la méthionine ; oxydation de l'ADN par la mesure de la formation d'adduits de l'ADN, par exemple) (Therond *et al.*, 2000; Kadiiska *et al.*, 2005). Ces mesures pourront être complétées par l'évaluation du statut en acide ascorbique et en α-tocophérol et la mesure des activités d'enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase). Il serait également intéressant d'explorer le niveau d'expression des différentes sous-unités de la NADPH oxydase, une enzyme impliquée dans la production de stress oxydant dans les modèles d'induction nutritionnelle d'une IR (Roberts *et al.*, 2006) et d'évaluer les modulations de l'activité de NFkB par nos différents traitements, facteur de transcription jouant un rôle important dans l'activation des voies de la réponse au stress (Evans *et al.*, 2003) et dont l'implication dans l'induction d'une IR par le stress oxydant a été suggérée chez l'animal (Ogihara *et al.*, 2004).

Par ailleurs, il serait intéressant de caractériser les rôles respectifs du glutathion et du NO dans les mécanismes de la régulation glycémique, en validant l'hypothèse de la SHSI dans

notre modèle ou, dans le cas inverse, en identifiant les mécanismes périphériques associés à nos observations. Dans le but de valider l'hypothèse de la SHSI, on pourrait envisager d'évaluer l'impact d'une vagotomie hépatique sur les effets bénéfiques de l'apport en cystéine sur la régulation glycémique chez le rat nourri avec un régime HS, cette substance étant libérée en réponse à un réflexe parasympathique (Porszasz *et al.*, 2002). Chez des rats ayant subi une vagotomie hépatique, l'effet sur la régulation glycémique d'une injection d'un donneur de cystéine et/ou d'un donneur de NO pourra être comparé à celui d'une injection de nitrosoglutathion.

Enfin, il semble nécessaire d'évaluer à plus long terme les effets de l'αLAC et du NAC sur le statut redox, la régulation glycémique, la fonction endothéliale et des dysfonctions plus tardives associées à l'IR telles que l'hypertension artérielle, l'hypertriglycéridémie, etc... dans notre modèle. L'évaluation des effets de l'apport alimentaire en cystéine sur la fonction sécrétoire pancréatique pourrait représenter un complément intéressant à nos travaux. De plus, la confirmation de nos conclusions chez l'Homme serait nécessaire, en vue de l'évaluation du potentiel de l'αLAC et du NAC dans la prévention de l'IR.

Nos résultats posent la question de l'adéquation des besoins en AAS tels qu'ils sont actuellement définis par la FAO, et en particulier des besoins en cystéine, car nous n'avons pas testé si un apport supplémentaire en méthionine pouvait prévenir l'apparition de l'IR chez des rats nourris avec un régime HS. Si la plupart des études réalisées chez l'Homme ont évalué que le besoin en méthionine + cystéine nécessaire à l'équilibre de la balance azotée est compris entre 13 et 16 $mg.kg^{-1}.j^{-1}$ (Fukagawa, 2006), le niveau d'apport optimal pour satisfaire les besoins autres que ceux de la synthèse protéique (synthèse de composés non-protéiques comme la taurine ou le glutathion, besoin en groupement méthyle) n'est pas établi. Or, la synthèse, le turnover et le statut en glutathion sont altérés dans de nombreuses situations physiopathologiques (Badaloo *et al.*, 2002; Darmaun *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2006). Dans ces conditions, la synthèse protéique étant prioritaire pour l'utilisation de la cystéine, l'apport alimentaire en cystéine pourrait être limitant pour la synthèse de glutathion, ce qui pourrait contribuer à la progression de ces pathologies.

Dans des conditions moins extrêmes, une étude chez l'Homme a suggéré que la synthèse de glutathion est affectée par des variations modérées de l'apport protéique autours des valeurs correspondant aux besoins azotés (Jackson *et al.*, 2004). Dans cette étude, chez des sujets sains adaptés à un apport protéique légèrement supérieur aux besoins (1,13 $g.kg^{-1}.j^{-1}$), une réduction de l'apport à 0,75 $g.kg^{-1}.j^{-1}$ est associée à une diminution du taux de synthèse du

glutathion, qui selon les auteurs, aurait un coût pour l'organisme en limitant sa capacité d'adaptation à des situations de stress oxydant et/ou infectieux, caractérisées par une augmentation des pertes en glutathion. Les données que nous avons obtenues au cours de cette thèse sont en accord avec cette hypothèse. La mise en évidence qu'une augmentation modérée de l'apport en cystéine améliore la régulation de la glycémie, prévient le stress oxydant et l'IR induits par une alimentation HS chez le rat suggère que dans des conditions pro-oxydantes, qui sont celles qui caractérisent l'alimentation occidentale, les besoins en AAS sont accrus. D'autres études sont nécessaires pour quantifier de nouveaux besoins en AAS, suffisants pour assurer le maintien du statut en glutathion de l'organisme dans des situations de challenge pro-oxydant.

ANNEXES

ARTICLE 5

Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline. The European Journal of Nutrition, 2006 Oct;45(7):383-90.

François Mariotti, Alexia Hammiche, Clémence Blouet, Sophie Daré, Daniel Tomé et Jean-François Huneau.

Introduction et objectifs

Il est établi que la concentration plasmatique en homocystéine est un marqueur de risque des maladies cardiovasculaires. Cependant, bien que les modèles animaux d'induction d'une hyperhomocystéinémie indiquent qu'une augmentation de l'homocystéinémie induit le développement de l'athérosclérose, on ne sait pas si l'hyperhomocystéinémie participe au processus physiopathologique des maladies cardiovasculaires ou si elle en est une des conséquences métaboliques (Voutilainen *et al.*, 1998; Verhoef *et al.*, 2004a).

La difficulté de répondre à cette question vient du fait que ces modèles expérimentaux utilisent différentes manipulations nutritionnelles pour provoquer une hyperhomocystéinémie – apport supplémentaire en méthionine ou déplétion en choline, par exemple -, qui n'induisent pas les mêmes conséquences sur la fonction vasculaire selon les espèces, les modèles expérimentaux et la nature de l'alimentation, en particulier sa teneur en glycine, cystéine, sérine et folates (Lentz *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 2004; Verhoef *et al.*, 2004b).

Les études chez l'Homme indiquent qu'une hyperhomocystéinémie transitoire, induite par une charge orale supraphysiologique de méthionine, altère la fonction vasculaire endothélium-dépendante, ce qui suggère qu'une altération de la production ou de la biodisponibilité du NO serait un des mécanismes de l'induction de l'athérogenèse par l'hyperhomocystéinémie (Chao *et al.*, 2000; Romerio *et al.*, 2004). L'implication de l'ADMA dans ces mécanismes, un inhibiteur endogène de la synthèse de NO, a été suggérée mais l'augmentation des concentrations plasmatiques d'ADMA au cours d'une hyperhomocystéinémie transitoire reste controversée (Boger *et al.*, 2000; Stuhlinger *et al.*, 2003). Chez l'animal, une étude rapporte une augmentation des concentrations plasmatiques d'ADMA en réponse à un apport supplémentaire en méthionine pendant 4 semaines mais

cette étude a été réalisée chez des animaux codéplétés en choline et en acide folique, un contexte qui influence le métabolisme des acides aminés soufrés (Boger *et al.*, 2000).
L'objectif de cette étude était d'explorer chez le rat recevant une supplémentation en méthionine, dans un contexte alimentaire non limitant en choline et en acide folique, les relations entre les concentrations plasmatiques en homocystéine, en ADMA et l'évolution de la fonction vasculaire.

Méthodes

16 rats mâles Wistar ont été répartis en deux groupes et ont reçu pendant 6 semaines un régime AIN-93 modifié apportant 30% de l'énergie sous forme de protéines totales de lait supplémenté avec 8 g de méthionine par kg d'aliment (M) ou non supplémenté (C).
A intervalle régulier au cours de l'étude (semaine 1, 3 et 5), la pression artérielle et les concentrations plasmatiques en en acides aminés et en ADMA ont été mesurés chez les animaux à jeun. A l'aide d'un système de pléthysmographie, la pression systolique, la pression diastolique et le débit sanguin ont été déterminés au niveu caudal. Les prélèvements de sang pour les dosages biochimiques étaient réalisés à l'aide d'un cathéter placé dans la veine de la queue. Après 6 semaines, la fonction vasculaire des animaux a été déterminée par la mesure de la pression artérielle et du débit sanguin après une stimulation intraveineuse à l'acétylcholine et une mesure des concentrations plasmatiques en nitrates et nitrites, un indicateur de la synthèse de NO. Après 6 semaines les rats ont été sacrifiés et le cœur a été prélevé, fixé, et le poids du ventricule gauche mesuré.

Résultats et conclusions

Les concentrations plasmatiques en méthionine n'étaient pas affectées par la teneur en méthionine du régime. La consommation du régime supplémenté en méthionine, comparée à celle du régime témoin, était associée à une hyperhomocystéinémie durant les 3 premières semaines de l'étude, considérablement minorée à 5 semaines. Les concentrations plasmatiques en cystéine et en sérine étaient significativement plus faibles chez les rats recevant le régime M comparés à ceux recevant le régime C. En revanche, les concentrations en taurine étaient plus élevées chez les rats du groupe M, tandis que les concentrations en glycine n'étaient pas affectées par la nature du régime.

Les cinétiques d'évolution de l'homocystéinémie chez les rats recevant le régime M indiquent la mise en place au cours de l'étude d'un mécanisme d'adaptation du métabolisme des AAS à la forte teneur du régime en méthionine. Les données de cette étude suggèrent une activation de la transsulfuration, une voie métabolique favorable à l'utilisation de l'homocystéine en excès. Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature ayant mis en évidence une activation de la transsulfuration par la méthionine (Stipanuk, 2004b).

La nature du régime n'influençait pas l'évolution des concentrations plasmatiques en ADMA, qui étaient significativement plus importantes après 5 semaines dans les deux groupes de rats. Ce résultat suggère que l'évolution des concentrations plasmatiques en ADMA est indépendante des concentrations en homocystéine. Ce résultat est en désaccord avec celui d'une étude réalisée chez le singe déficient en folates et choline (Boger *et al.*, 2000), ce qui suggère que la déficience en donneurs de groupements méthyle influence l'effet de l'hyperhomocystéinémie sur les concentrations plasmatiques en ADMA.

A 6 semaines, aucune différence de fonction vasculaire et de concentration plasmatique en nitrates et nitrites n'a été mesurée entre les groupes. En outre, la pression artérielle moyenne et la pression diastolique étaient réduites chez les rats du groupe M comparés aux rats témoins de semaine 1 à la semaine 6, et l'indice de masse ventriculaire gauche, mesuré à 6 semaines, était significativement plus faible chez les rats M que chez les rats C. Ces données indiquent qu'une augmentation de l'apport en méthionine induit une légère amélioration des fonctions vasculaires dans un contexte alimentaire non limitant en choline et en acide folique. Cette étude remet en cause la relation positive généralement admise entre l'homocystéinémie et les niveaux plasmatiques en ADMA.

Eur J Nutr (2006) 45:383–390
DOI 10.1007/s00394-006-0611-1

ORIGINAL CONTRIBUTION

François Mariotti
Alexia Hammiche
Clémence Blouet
Sophie Daré
Daniel Tomé
Jean François Huneau

Medium-term methionine supplementation increases plasma homocysteine but not ADMA and improves blood pressure control in rats fed a diet rich in protein and adequate in folate and choline

Received: 1 April 2006
Accepted: 26 June 2006
Published online: 1 September 2006

F. Mariotti · A. Hammiche · C. Blouet
S. Daré · D. Tomé · J.F. Huneau
UMR INRA-INAPG 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire
Institut National Agronomique Paris-Grignon
Paris, France

F. Mariotti (✉)
INAPG
16 rue Claude Bernard
75005 Paris, France
Tel.: +33-14/408-7286
Fax: +33-14/408-1858
E-Mail: mariotti@inapg.inra.fr

Summary *Background* Hyperhomocysteinemia (HHcy) is associated with cardiovascular risk, possibly because it increases asymmetric dimethyl-arginine (ADMA), but the general association remains unclear and may vary with nutritional and physiological conditions. *Aim of the study* We aimed to monitor the effect of methionine supplementation, and subsequent HHcy, on plasma ADMA and hemodynamics in the context of a diet rich in protein and adequate in folic acid and choline. *Methods* For 6 weeks, rats were fed a 29% protein diet supplemented (M) or not (C) with 8 g/kg L-methionine. Blood pressure and plasma amino acids, including homocysteine and ADMA, were measured throughout the experiment and additional parameters, including in vivo hemodynamic response to acetylcholine, were measured at week 5–6. *Results* As compared to the C diet, the M diet induced a marked HHcy during the first 3 weeks, which lessened at week 5. In contrast, plasma ADMA stayed similar in the C and M diet. Paradoxically, M rats had lower mean and diastolic blood pressure values over the experiment, together with a lower left ventricular mass at week 6, when compared with C rats. No difference was observed between groups regarding vascular reactivity and plasma NO*x* at week 6. *Conclusions* In a context of a diet rich in protein and adequate in methyl donors, rats exhibit a complex adaptation to the medium-term methionine supplementation, with improvement in blood pressure control despite marked HHcy. The lack of increase in plasma ADMA may account for the absence of detrimental effects of HHcy on hemodynamics.

Key words methionine – homocysteine – sulfur amino acids – asymmetric dimethyl-arginine – blood pressure – hemodynamics – diet

Introduction

Plasma homocysteine (Hcy) has been shown to be strongly associated with cardiovascular risk. However, it is still uncertain whether Hcy is a direct causal factor, a fellow traveler, or a marker of a pathogenic mechanism [1–6]. In addition, the mechanism whereby Hcy may increase the cardiovascular risk remains unclear, and may differ depending on the period of exposure to hyperhomocysteinemia (HHcy), nutritional status, and other risk factors [5–7].

© Steinkopff Verlag 2006

In animals, experimental HHcy has been shown to induce atherosclerosis, in particular in susceptible animal models [8] and can be achieved via a variety of dietary manipulations [9], which include methionine supplementation and/or vitamin and choline depletion [10] and, in a few cases, Hcy supplementation [8]. Even though they result in similar HHcy from a quantitative viewpoint, these manipulations differ largely with respect to the metabolic challenge imposed on sulfur amino acid pathways, interconnected metabolism [particularly one carbon metabolism, 11], and vascular homeostasis.

In humans, the effect of Hcy is studied after acute induction of a transient HHcy by a supra-physiological oral load of methionine. Using this HHcy experimental model, most, but not all [12–14], studies, have reported acute impairment of vascular function, particularly of the endothelium-dependent function, suggesting that an early alteration to nitric oxide (NO) production/bioavailability is central to the initiation of Hcy-induced atherogenesis [14–17].

Numerous mechanisms have been advocated but recently particular emphasis has been laid on the role of asymmetric dimethyl-arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of NO synthase. Although a large body of evidence supports ADMA as being central to the physiopathology of CVD and other diseases [18], it is inconclusive whether ADMA is increased in human, experimentally induced HHcy [19–22], and recently it has been reported that lowering Hcy concentrations does not decrease plasma ADMA [21, 23]. In animals, the effect of methionine supplementation on plasma ADMA concentration has only been reported once, in the context of a folic acid and choline-depleted diet in monkeys [24].

Indeed, the effects of so-called experimental HHcy models are varied. The nature of the basal diet, in particular as regards the intake of other amino acids (such as glycine and serine), has been shown to modulate HHcy [25, 26] by affecting sulfur amino acid pathways. Furthermore, experimental HHcy models may indeed differ considerably regarding their effects on vascular function, as illustrated by the fact that hyperhomocysteinemic humans free of other risk markers and/or with normal folate status exhibit no altered vascular reactivity [7, 27, 28] and that the effect of folate intake on vascular reactivity may be independent of reduced plasma Hcy [29]. Thus the effects of methionine intake on HHcy and hemodynamics and vascular reactivity may vary according to many factors (including the basal or experimental diet and nutritional status) so that it remains unclear whether the adverse effects are directly related to dietary methionine and plasma Hcy or indirectly related to other limiting dietary factors, including protein, folate, and choline.

Our aim was therefore to test the sequential relationship in rats between methionine, Hcy, ADMA, and hemodynamics by monitoring the effect of a simple chronic methionine challenging of sulfur amino acid metabolism in a situation where no nutrient is supposed to limit the capacity of the sulfur amino acid metabolism. For that purpose, rats were fed for 6 weeks a diet rich in protein (twice the standard amount of protein, mimicking spontaneous protein intake in western countries) and containing standard levels of folic acid and choline (to ensure a normal methyl donor status) and supplemented or not with methionine. Changes to plasma amino acids, including methionine, total cysteine, total Hcy, and ADMA, were examined after methionine supplementation. The systolic and diastolic blood pressures (DBP) of the rats were monitored during the 6 weeks of methionine supplementation, and additional parameters were measured at week 5–6 to check for the potential impact on hemodynamics and NO production.

Materials and methods

Animals and diets

The "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85–23, revised 1985) and French guidelines concerning the care and use of laboratory animals were followed. A total of 16 outbred Wistar-Hanover male rats (Harlan, France), weighing 130–140 g on arrival, were housed two by two, with free access to food and tap water, on a 12-h light:dark cycle (lights on at 08h00). The experimental diets were prepared under strict laboratory conditions by UPAE, an Experimental Food Preparation Unit (INRA, Jouy-en-Josas, France). During the first week, animals were fed with the Control diet (Table 1), which was a modified AIN-93 diet with an increased protein content (29% of total energy). The animals were then ("Week 0") split into two groups, the first (Control Group, C) continuing with the control diet and the second (Methionine group, M) switching to the methionine-enriched diet (Table 1), for the next 6 weeks. Animals were weighed every week during the experimental period and food intake was checked on the first 2 days after the rats started to receive their specific diets. On the last week, animals received nitrate-free water (Wattwiller, Cernay, France) prior to the analysis of plasma nitrate + nitrite, a surrogate measure for NO production.

Experimental design

During the first week before experimental diets, rats were adapted to laboratory conditions and

Table 1 Composition of control and methionine-supplemented diets

g per kg diet	Control diet (C diet)	Methionine-enriched diet (M diet)
Total milk protein	290	282
Corn starch	493.2	493.2
Sucrose	79.5	79.5
Soybean oil	40	40
AIN-93M-MX mineral mix	35	35
AIN-93-VX vitamin mix	10	10
Alpha-cellulose	50	50
Choline	2.3	2.3
L-Methionine	0	8
Methionine content	5.6	13.6
Folic acid content	0.002	0.002

experimental sessions, including blood pressure measurements as described below. Rats in both groups were processed in a randomized order, on the same day of each week, in the fasted state.

Systolic blood pressure (SBP), DBP, and heart rate (HR) were determined weekly by volume–pressure recordings using an automated tail-cuff plethysmographic device (XBP 1000, Kent Scientific, Torrington, CT). After 10 min of adaptation to inflation and deflation of the occlusion cuff in the restrainer, 20 recordings per rat and per session were used to obtain average values. The Mean Arterial Pressure (MAP) was calculated as MAP = DBP + (SBP−DBP)/3. Increments in volume during deflation of the occlusion cuff from minimum (SBP) to maximum (DBP) volume were computed and taken as the blood flow index (BFI).

During week 5, an indwelling catheter was inserted in a distal lateral tail vein and flushed with heparinized saline. After baseline measurements, SBP, DBP, HR, and BFI were computed after the injection of acetylcholine chloride (10 μg kg^{-1}, Sigma, France). The effects of acetylcholine were expressed as an absolute variation in blood pressure and a relative variation in BFI (i.e., (BFI_after−BFI_basal)/BFI_basal), as a percentage). At week 0, 1, 3, and 5, 500 μl blood drawn from a tail catheter was dropped into prechilled tubes containing 30-μl of an EDTA and aprotinin solution (Trasylol, 10000 U; Bayer, Leverkusen, Germany). Plasma aliquots were stored at −80°C. At the end of the experiment (week 6), the rats were killed with an overdose of pentobarbital and the heart was dissected out, cleaned with saline and stored in alcohol formalin-acetic acid fixative (AFA, ethylic acid 50%, acetic acid 4%, and formaldehyde 6%). The left ventricle was dissected out and weighed both immediately and then 24 h later to take account of the AFA (i.e., after near-complete AFA evaporation). The two measurements proved to be highly correlated (R^2 = 0.95, P < 0.0001) and resulted in a similar statistical inference. The first measurement was chosen to calculate the left ventricular mass index (left ventricular mass index = left ventricular weight/body weight).

Biochemical analysis

As previously described [30], plasma amino acids, including total Hcy and total cysteine, were analyzed together in a classical aminogram using ion-exchange-chromatography under a pre-reduction method [31] and plasma ADMA concentrations were determined using an ELISA assay (Cardiovasics Medical Science Laboratory). Plasma nitrite + nitrate was determined by a fluorimetric method [32].

Statistical analysis of results

Data are expressed as means ± SEM. Repeated (i.e., weekly) measurements were analyzed using a mixed model with diet and time (i.e. weeks) as independent, fixed factors and the rat as a random factor, nested in the diet factor (SAS institute, Cary, NC). Multiple comparisons were made using ad hoc contrasts under the mixed models. Selective measurements (at week 5 or 6, or collapsed data) were analyzed with a two-tail Student T-test. A P-value <0.05 was considered to be significant.

Results

Animals

The weight of the animals remained very similar between groups throughout the experiment (data not shown), being 186.1 ± 2.8 g in the M group and 189.4 ± 3.0 g in the C group at week 0 and 334.9 ± 10.3 g in the M group and 333.0 ± 9.9 g in the C group at the end of the experiment. Food intake at day 1–2 after introduction of the diet was similar in the two groups (amount consumed per pair of rats: 44.0 ± 3.1 g in the C group and 44.9 ± 6.5 g in the M group).

Plasma amino acids

Plasma amino acids concentrations are reported in Table 2 and Fig. 1. Methionine supplementation did not affect plasma methionine but induced a major increase in plasma Hcy at weeks 1 and 3. Plasma Hcy decreased in the M group at week 5, resulting in a

© Steinkopff Verlag 2006

Table 2 Plasma concentrations of methionine, total cysteine, taurine, serine, glycine, arginine and citrulline during 5 weeks in rats fed a control (C) or methionine-supplemented (M) diet

Amino acid	Diet	Week									Time	Diet	Time × Diet
		Week 0	Week 1			Week 3			Week 5				
Methionine	C	60 ± 6	82 ± 5		††	62 ± 7			63 ± 5		$P < 0.01$	NS	NS
	M	58 ± 4	71 ± 6			69 ± 8			65 ± 73				
Total cysteine	C	163 ± 15	191 ± 8			218 ± 22		††	209 ± 23	†	$P < 0.05$	$P < 0.05$	NS
	M	157 ± 8	147 ± 16	*		167 ± 13	*		149 ± 14	*			
Taurine	C	109 ± 14	85 ± 15			95 ± 9			96 ± 12		NS	$P < 0.01$	NS
	M	134 ± 17	123 ± 15			123 ± 9			160 ± 20	**			
Serine	C	118 ± 7	168 ± 7		††	182 ± 8		††	182 ± 15	††	$P < 0.001$	$P < 0.05$	$P < 0.05$
	M	118 ± 6	142 ± 12			147 ± 10	*		142 ± 9	**			
Glycine	C	118 ± 14	136 ± 8			130 ± 12			146 ± 18		NS	NS	NS
	M	143 ± 8	136 ± 12			142 ± 10			129 ± 9				
Arginine	C	86 ± 5	106 ± 2		††	112 ± 7		††	116 ± 8	††	$P < 0.001$	NS	NS
	M	83 ± 8	101 ± 10			103 ± 4			98 ± 8				
Citrulline	C	57 ± 3	66 ± 2		††	60 ± 5			52 ± 3		$P < 0.001$	NS	NS
	M	60 ± 2	73 ± 7			59 ± 2			53 ± 5				

Values are means ± SEM. † and ††: significantly different from week 0 (collapsing groups), $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively. * and **: significantly different from the control group, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively

non-significant difference at week 5 between groups and as compared together with baseline. Total cysteine was significantly lower in the M group at weeks 1, 3, and 5 when compared with the C group, exhibiting a smaller increase at week 3 when compared to baseline. Plasma serine was higher than baseline in both groups as early as week 1 ($P < 0.0001$), but was significantly lower in the M group than in the C group overall ($P < 0.05$) and at weeks 3 ($P < 0.05$) and 5 ($P < 0.01$). In contrast, the concentrations of other amino acids such as arginine and citrulline, which exhibited slight but significant changes over time, did not differ as a function of diet. Glycine (Table 2) was affected neither by time nor by the nature of the diet. Plasma ADMA concentrations significantly increased over time, being higher at weeks 3 and 5 than at baseline ($P < 0.01$), but they were not affected by the nature of the diet.

Blood pressure and left ventricular mass

Systolic blood pressure values tended to be lower in the M group ($0.05 < P < 0.10$) and DBP and MAP were significantly lower in the M group when compared to the C group (Fig. 2). When the values from week 1 to week 6 were taken together, the SBP was 127.2 ± 2.0 mmHg in the M group vs. 135.0 ± 1.6 mmHg in the C group ($P < 0.01$), the DBP was 67.2 ± 0.9 mmHg (M group) vs. 71.6 ± 1.4 mmHg (C group) ($P < 0.01$), and the MAP was 87.5 ± 1.1 mmHg (M group) vs. 93.2 ± 1.2 mmHg (C group) ($P < 0.01$). The left ventricular mass index, measured at week 6, was significantly lower in the M group than in the C group (Table 3).

Hemodynamics and plasma NO*x* at week 5–6

At the end of the experiment, acetylcholine injection (Table 3) resulted in a similar decrease in blood pressure (average 18.0 ± 3.8 mmHg—decrease in MAP compared to baseline value) and the tail BFI (average—43.3 ± 5.4% of the baseline value). The HR also increased similarly after the acetylcholine injection (13 ± 2% increment over baseline value, Table 3). Plasma nitrite + nitrate concentration did not differ between groups (Table 3).

Discussion

As expected, methionine supplementation resulted in a marked HHcy. Interestingly, methionine supplementation did not result in steady-state HHcy. Starting from the marked HHcy at weeks 1 and 3 after supplementation, the decrease in HHcy evidenced in week 5 clearly formed part of a complex adaptation of the sulfur amino acid metabolism. Glycine and serine are closely implicated in sulfur amino acid metabolism, with serine being both a major methyl donor for Hcy remethylation (generating glycine) and an obligatory substrate for transsulfuration [11]. Plasma glycine and serine are good markers of changes to the sulfur amino acid metabolism [33]. In the present study, the decrease in plasma serine observed in the methionine group (when compared to the control group), together with a lack of difference in plasma glycine, strongly suggests an increase in the transsulfuration pathway that would have favored the disposal of Hcy. Indeed, transsulfuration is expected

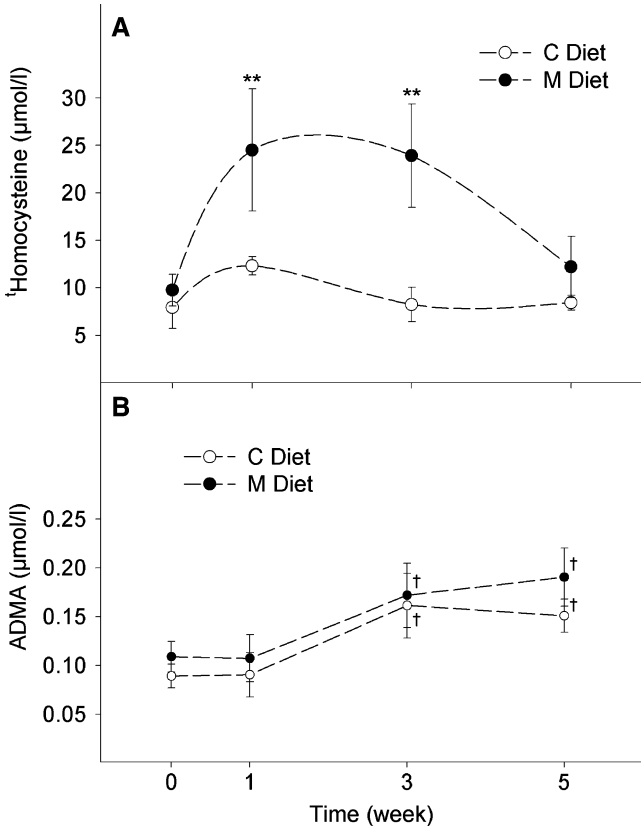


Fig. 1 Plasma concentrations of (total) homocysteine (panel A) and asymmetric dimethyl-arginine (ADMA, panel B) during 5 weeks in rats fed a control (C) or methionine-supplemented (M) diet. Values are means ± SEM. Plasma homocysteine was affected by both time and diet ($P < 0.05$) and plasma ADMA was affected by time ($P < 0.0001$). **: significantly different from control group, $P < 0.01$. †: significantly different from week 0, $P < 0.05$

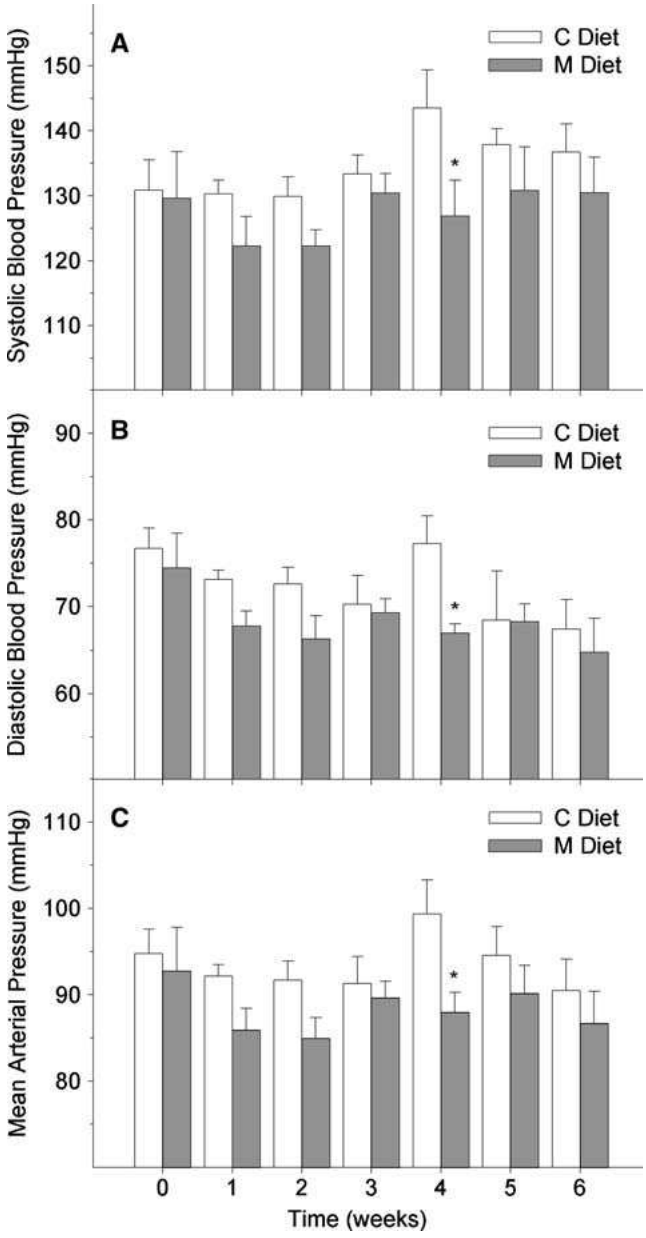


Fig. 2 Systolic blood pressure (SBP, panel A), diastolic blood pressure (DBP, panel B) and mean arterial pressure (MAP, panel C) values over 6 weeks in rats fed a control (C) or methionine-supplemented (M) diet. Values are means ± SEM. SBP tended to be lower ($0.05 < P < 0.10$), and DBP and MAP were significantly lower ($P < 0.05$) in the M group as compared to the C group. *: significantly different from C diet, $P < 0.05$

to be activated with a high methionine intake [11]. Furthermore, the fact that plasma cysteine was lower in the methionine-supplemented group as early as week 1 suggests that an early increase in the disposal of cysteine in the M group may have favored the onset of an increase in transsulfuration. Finally, adaptation resulted in similar plasma methionine concentrations in the supplemented and control groups, i.e., no accumulation of methionine following methionine supplementation. The rich protein content of the basal diet may have been implicated in these complex changes, presumably through a higher intake of serine [25, 26] that could have favored the disposal of Hcy in the context of adaptation by the liver to a high-methionine diet, as described by Finkelstein and Martin [34]. One major finding of the present work is that plasma ADMA was not affected by methionine supplementation, despite marked HHcy. Plasma ADMA significantly rose in both groups, but final level was still low as compared to other literature data on animals and humans [24, 30, 35, 36]. This present rise, however, suggests that ADMA may naturally and slowly accumulate during development and aging, although other longitudinal data are lacking to determine whether there is a general correlation between ADMA and age [35]. Despite the very marked degree of HHcy as evidenced at weeks 1 and 3, plasma ADMA concentrations were not higher in the methionine group. As pointed out in the introduction, in a non-acute dietary setting, an HHcy-induced rise in

© Steinkopff Verlag 2006

Table 3 Hemodynamics, as assessed by the response to an acetylcholine challenge, left ventricular mass index and plasma nitrate + nitrite, after 5–6 weeks in rats fed a control (C) or methionine-supplemented (M) diet

	C diet	M diet
Effect of acetylcholine on		
Mean arterial pressure (mmHg)	−20.6 ± 6.6	−15.8 ± 5.5
Tail blood flow index (%)	−45.6 ± 10.2	−41.5 ± 6.8
Heart rate (%)	+13.9 ± 3.5	+12.3 ± 3.4
Left ventricular mass index (mg/g)	0.449 ± 0.008	0.409 ± 0.009*
Plasma NO*x* (μmol/l)	74.1 ± 13.3	59.6 ± 8.4

Values are means ± SEM. *: significantly different from C diet, $P < 0.05$

ADMA has only been reported in the context of a methionine-enriched and folic acid and choline-depleted diet in monkeys [24]. First, this naturally suggests that this discrepancy may be related to the true metabolic nature of the dietary model for HHcy. A concomitant depletion of folic acid and choline in the diet induces an important deficiency in methyl donors that markedly impairs remethylation and favors the demethylation of methionine into Hcy [37, 38]. Second, the rich protein content in the basal diet may also be implicated. The modulation of plasma ADMA during HHcy, as with other conditions, has mostly been documented as being related to an oxidative stress-mediated down-regulation of ADMA hydrolysis [39–41], while a protein-rich diet (26%, similar to that used during the present experiment) has been shown to reduce oxidative stress when compared to a standard (14%) protein diet in rats [42]. In conclusion, our study questions the general view that Hcy always has an impact upon plasma ADMA in experimental short/medium-term HHcy [39], as it has also been questioned in human (acute) experimental HHcy [21, 22] and in other situations [23, 43, 44].

The last important result in the present study is that although it induced marked HHcy, the methionine-enriched diet resulted in a slightly but significantly lower blood pressure (5.7 mmHg-lower MAP). According to the integration theory [i.e., the cardio phenotype captures the integrated effect of blood pressure over an individual's lifetime, 45], the significantly lower left ventricular mass at week 6 is a clear confirmation that enrichment of the diet with methionine did slightly improve hemodynamic control throughout the experiment. Some authors have reported no significant changes to SBP in Wistar-Hanover or Sprague-Dawley rats supplemented with methionine [46, 47], and paradoxical effects of methionine enrichment on SBP have been reported recently in some models of primary and secondary hypertension [46, 48]. Furthermore, at the end of the experiment, the methionine supplementation caused no alterations in vascular reactivity and no significant changes to plasma NO*x*. Therefore, the present data indicate that the global HHcy had not so far induced any alterations to the basal or stimulated production of NO. Although many mechanisms of Hcy-induced vascular dysfunction have been documented, the prevalent view is that Hcy alters NO production. However, this association is not always consistent because most experimental models of HHcy may mask different metabolic conditions. Recent data strongly suggest that the adverse effects of Hcy on health may only occur when other aspects of the nutrient/metabolic status are altered, particularly folate and methylation [27, 49]. Although we cannot rule out the possibility that the methionine, enriched diet used during this study could eventually increase the risk of atherosclerosis, the results clearly suggest that, in this favorable overall dietary context, there is rather a positive impact of methionine supplementation on cardiovascular risk. We suggest that the absence of adverse effects of HHcy on vascular reactivity, which unmasked positive effects of methionine supplementation on blood pressure, may have been linked to a lack of effect of HHcy on ADMA. This is in line with the emerging view that ADMA is crucial to the initiation of vascular dysfunction and is an independent factor of cardiovascular risk [18, 50].

References

1. Wald DS, Law M, Morris JK (2002) Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. BMJ 325:1202
2. Mensink RP, Aro A, Den Hond E, German JB, Griffin BA, ten Meer HU, Mutanen M, Pannemans D, Stahl W (2003) PASSCLAIM—Diet-related cardiovascular disease. Eur J Nutr 42(Suppl 1):I6–27
3. Troen AM, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J (2003) The atherogenic effect of excess methionine intake. Proc Natl Acad Sci USA 100:15089–15094
4. Hanratty CG, McGrath LT, McAuley DF, Young IS, Johnston GD (2001) The effects of oral methionine and homocysteine on endothelial function. Heart 85:326–330
5. Bunout D, Hirsch S (2005) Are we losing homocysteine as a cardiovascular risk factor? Nutrition 21:1068–1069
6. Ubbink JB, Delport R (2000) Homocysteine as atherothrombotic agent: is the bark worse than the bite? Nutrition 16:672–674

7. Hanratty CG, McAuley DF, McGrath LT, Young IS, Johnston GD (2001) Hyperhomocysteinaemia in young adults is not associated with impaired endothelial function. Clin Sci (Lond) 100:67–72
8. Zhou J, Moller J, Danielsen CC, Bentzon J, Ravn HB, Austin RC, Falk E (2001) Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:1470–1476
9. Lentz SR (2005) Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. J Thromb Haemost 3:1646–1654
10. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD (1996) Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. J Clin Invest 98:24–29
11. Stipanuk MH (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. Annu Rev Nutr 24:539–577
12. Labinjoh C, Newby DE, Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum H, Melville V, Boon NA, Webb DJ (2001) Effects of acute methionine loading and vitamin C on endogenous fibrinolysis, endothelium-dependent vasomotion and platelet aggregation. Clin Sci (Lond) 100:127–135
13. Wilkinson IB, Megson IL, MacCallum T, Rooijmans DF, Johnson SM, Boyd JL, Cockcroft JR, Webb DJ (2001) Acute methionine loading does not alter arterial stiffness in humans. J Cardiovasc Pharmacol 37:1–5
14. Chao CL, Kuo TL, Lee YT (2000) Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. Circulation 101:485–490
15. Nestel PJ, Chronopoulos A, Cehun M (2003) Arterial stiffness is rapidly induced by raising the plasma homocysteine concentration with methionine. Atherosclerosis 171:83–86
16. Nightingale AK, James PP, Morris-Thurgood J, Harrold F, Tong R, Jackson SK, Cockcroft JR, Frenneaux MP (2001) Evidence against oxidative stress as mechanism of endothelial dysfunction in methionine loading model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280:H1334–1339
17. Romerio SC, Linder L, Nyfeler J, Wenk M, Litynsky P, Asmis R, Haefeli WE (2004) Acute hyperhomocysteinemia decreases NO bioavailability in healthy adults. Atherosclerosis 176:337–344
18. Cooke JP (2004) Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? Circulation 109:1813–1818
19. Boger RH, Lentz SR, Bode-Boger SM, Knapp HR, Haynes WG (2001) Elevation of asymmetrical dimethylarginine may mediate endothelial dysfunction during experimental hyperhomocyst(e)inaemia in humans. Clin Sci (Lond) 100:161–167
20. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP (2003) Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. Circulation 108:933–938
21. Doshi S, McDowell I, Goodfellow J, Stabler S, Boger R, Allen R, Newcombe R, Lewis M, Moat S (2005) Relationship between *S*-adenosylmethionine, *S*-adenosylhomocysteine, asymmetric dimethylarginine, and endothelial function in healthy human subjects during experimental hyper- and hypohomocysteinemia. Metabolism 54:351–360
22. Wanby P, Brattstrom L, Brudin L, Hultberg B, Teerlink T (2003) Asymmetric dimethylarginine and total homocysteine in plasma after oral methionine loading. Scand J Clin Lab Invest 63:347–353
23. Ziegler S, Mittermayer F, Plank C, Minar E, Wolzt M, Schernthaner GH (2005) Homocyst(e)ine-lowering therapy does not affect plasma asymmetrical dimethylarginine concentrations in patients with peripheral artery disease. J Clin Endocrinol Metab 90:2175–2178
24. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR (2000) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1557–1564
25. Stead LM, Brosnan ME, Brosnan JT (2000) Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. Biochem J 350(Pt 3):685–692
26. Verhoef P, Steenge GR, Boelsma E, van Vliet T, Olthof MR, Katan MB (2004) Dietary serine and cystine attenuate the homocysteine-raising effect of dietary methionine: a randomized crossover trial in humans. Am J Clin Nutr 80:674–679
27. Hirsch S, Ronco AM, Vasquez M, de la Maza MP, Garrido A, Barrera G, Gattas V, Glasinovic A, Leiva L, Bunout D (2004) Hyperhomocysteinemia in healthy young men and elderly men with normal serum folate concentration is not associated with poor vascular reactivity or oxidative stress. J Nutr 134:1832–1835
28. Woodman RJ, Celermajer DE, Thompson PL, Hung J (2004) Folic acid does not improve endothelial function in healthy hyperhomocysteinaemic subjects. Clin Sci (Lond) 106:353–358
29. Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, Goodfellow J (2002) Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. Circulation 105:22–26
30. West SG, Likos A, Brown PH, Mariotti F (2005) Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. J Nutr 135:212–217
31. Briddon A (1998) Total plasma homocysteine as part of the routine aminogram by ion-exchange chromatography. Amino Acids 15:235–239
32. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SM, Jr, Bruckner UB (1997) Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and *S*-nitrosothiols. Nitric Oxide 1:177–189
33. Stam F, Smulders YM, van Guldener C, Jakobs C, Stehouwer CD, de Meer K (2005) Folic acid treatment increases homocysteine remethylation and methionine transmethylation in healthy subjects. Clin Sci (Lond) 108:449–456
34. Finkelstein JD, Martin JJ (1986) Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. J Biol Chem 261:1582–1587
35. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Boger RH (2005) Determination of a reference value for *N*, *N*-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. Eur J Clin Invest 35:622–626
36. Raimondi L, Lodovici M, Visioli F, Sartiani L, Cioni L, Alfarano C, Banchelli G, Pirisino R, Cecchi E, Cerbai E, Mugelli A (2005) n-3 Polyunsaturated fatty acids supplementation decreases asymmetric dimethyl arginine and arachidonate accumulation in aging spontaneously hypertensive rats. Eur J Nutr 44:327–333
37. Niculescu MD, Zeisel SH (2002) Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. J Nutr 132:2333S–2335S
38. Jacob RA, Jenden DJ, Allman-Farinelli MA, Swendseid ME (1999) Folate nutriture alters choline status of women and men fed low choline diets. J Nutr 129:712–717

© Steinkopff Verlag 2006

39. Stuhlinger MC, Stanger O (2005) Asymmetric dimethyl-L-arginine (ADMA): a possible link between homocyst(e)ine and endothelial dysfunction. Curr Drug Metab 6:3–14
40. Vallance P, Leiper J (2004) Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1023–1030
41. Fu YF, Xiong Y, Guo Z (2005) A reduction of endogenous asymmetric dimethylarginine contributes to the effect of captopril on endothelial dysfunction induced by homocysteine in rats. Eur J Pharmacol 508:167–175
42. Petzke KJ, Elsner A, Proll J, Thielecke F, Metges CC (2000) Long-term high protein intake does not increase oxidative stress in rats. J Nutr 130:2889–2896
43. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, Boucher JL, Rendu F, Devynck MA, David-Dufilho M (2004) Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. Free Radic Biol Med 36:1532–1541
44. Paroni R, Fermo I, Fiorina P, Cighetti G (2005) Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in plasma of hyperhomocysteinemic subjects. Amino Acids 28:389–394
45. Iso H, Kiyama M, Doi M, Nakanishi N, Kitamura A, Naito Y, Sato S, Iida M, Konishi M, Shimamoto T, et al. (1994) Left ventricular mass and subsequent blood pressure changes among middle-aged men in rural and urban Japanese populations. Circulation 89:1717–1724
46. Robin S, Maupoil V, Laurant P, Jacqueson A, Berthelot A (2004) Effect of a methionine-supplemented diet on the blood pressure of Sprague-Dawley and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Br J Nutr 91:857–865
47. Morita H, Saito Y, Kurabayashi M, Nagai R (2002) Diet-induced mild hyperhomocysteinemia and increased salt intake diminish vascular endothelial function in a synergistic manner. J Hypertens 20:55–62
48. Yen CH, Lau YT (2002) Vascular responses in male and female hypertensive rats with hyperhomocysteinemia. Hypertension 40:322–328
49. Spijkerman AM, Smulders YM, Kostense PJ, Henry RM, Becker A, Teerlink T, Jakobs C, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD (2005) *S*-adenosylmethionine and 5-methyltetrahydrofolate are associated with endothelial function after controlling for confounding by homocysteine: the Hoorn Study. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25:778–784
50. Boger RH (2003) The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Cardiovasc Res 59:824–833

ARTICLE 6

Liver glyconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess? The American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, in press.

Dalila Azzout-Marniche, Claire Gaudichon, Clémence Blouet, Cécile Bos, Véronique Mathé, Jean-François Huneau et Daniel Tomé

Introduction et objectifs

Les conséquences d'une augmentation aiguë ou chronique de l'apport protéique sur la régulation des voies métaboliques de la production endogène de glucose sont controversées. Si plusieurs études suggèrent que l'augmentation de la teneur en protéines de l'alimentation induit une activation de la néoglucogenèse hépatique, en particulier au cours de la période postprandiale (Remesy *et al.*, 1978; Bois-Joyeux *et al.*, 1986; Kaloyianni *et al.*, 1990), d'autres travaux montrent à l'inverse l'absence d'augmentation de la synthèse endogène de glucose en réponse à un repas protéique (Wahren *et al.*, 1976; Khan *et al.*, 1992).

Une des hypothèses permettant de concilier les résultats divergents de la littérature considère que le glucose et/ou le glucose-6-phosphate néoformé en réponse à l'activation de la néoglucogenèse par les acides aminés, pourrait être orienté vers la synthèse de glycogène (Bode *et al.*, 1992). Cependant, l'existence de cette voie métabolique, appelée néoglycogenèse, est controversée, car elle suppose l'activation concomitante de deux voies qui ne devraient pas pouvoir coexister, la néoglucogenèse et la synthèse de glycogène. En effet, en période postprandiale, l'augmentation de la glycémie et de l'insulinémie stimule la synthèse de glycogène et inhibe la néoglucogenèse, tandis-qu'à jeun, la baisse de la glycémie et l'augmentation de la glucagonémie inhibent la synthèse de glycogène et stimulent la néoglucogenèse (Postic *et al.*, 2004). Bien que certains auteurs aient mis en évidence l'existence de la néoglycogenèse (Radziuk *et al.*, 2001), les mécanismes pouvant expliquer cette situation paradoxale ne sont pas établis. De plus, l'activation de cette voie en réponse à l'ingestion d'un repas ou d'un régime hyperprotéique n'a jamais été considérée. Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de l'augmentation de l'apport protéique à moyen terme sur la néoglycogenèse chez le rat.

Méthodes

32 rats Wistar mâles ont reçu pendant 15 jours un régime normoprotéique (NP) ou un régime hyperprotéique HP (mêmes régimes que ceux présentés dans le tableau 6), distribué chaque jour sous forme de deux repas calibrés, un repas de 6 g le matin et un repas de 30 g l'après-midi.
15 jours après l'introduction des régimes, les animaux ont été anesthésiés à jeun ou à l'état nourri. Des prélèvements sanguins et tissulaires ont été réalisés. La glycémie, l'insulinémie et les concentrations plasmatiques en acides aminés dans la veine porte ont été déterminées. Les concentrations hépatiques en glycogène ont été mesurées. L'expression des gènes codant les enzymes de la néoglucogenèse (PEPCK et isoforme néoglucogénique (G6PC1) et ubiquitaire (G6PC3) de la sous-unité catalytique de la G6Pase) a été déterminée au niveau du foie, du rein et de la partie proximale de l'intestin grêle par PCR quantitative en temps réel. Une mesure des flux de production de glucose d'hépatocytes isolés après une incubation d'une heure en présence de précurseurs de la néoglucogenèse (lactate, pyruvate et glycérol) a été réalisée. L'effet des acides aminés sur l'induction de l'expression des gènes de la PEPCK et de la G6PC1 par le glucagon a été déterminé sur des cultures primaires d'hépatocytes.

Résultats et discussion

Les concentrations hépatiques de glycogène étaient significativement réduites chez les rats à jeun comparés aux rats à l'état nourri, sans effet de la nature du régime. De la même façon, la production de glucose d'hépatocytes isolés de rats à jeun était plus faible que celle d'hépatocytes de rats à l'état nourri, et n'était pas influencée par la teneur en protéines du régime. L'expression hépatique de la PEPCK était élevée à jeun et similaire chez les rats NP et les rats HP. A l'état nourri, elle était significativement réduite chez les rats NP tandis que chez les rats HP elle n'était pas influencée par l'état nutritionnel. En revanche, l'expression hépatique de la G6PC1, isoforme majoritaire dans cet organe, était activée à jeun et inhibée à l'état nourri de la même manière dans les groupes NP et HP.
Ces résultats suggèrent une activation de la glyconéogenèse chez les rats HP à l'état nourri, caractérisée par une activation de l'expression de la PEPCK mais une inhibition de celle de la G6PC1. Le glucose-6-phosphate néoformé serait alors orienté vers la synthèse de glycogène, comme le suggère la mesure de stocks de glycogène élevés chez les rats HP à l'état nourri, et l'absence de production de glucose par les hépatocytes isolés de rats HP à l'état nourri.

A l'état nourri, la glycémie des rats HP était faiblement augmentée, l'insulinémie inchangée et les concentrations d'acides aminés dans la veine porte était fortement augmentées par rapport à leurs valeurs à jeun. Afin de déterminer l'influence de ces différents paramètres sur la régulation de l'expression de la PEPCK et la G6PC1 chez les rats HP à l'état nourri, nous avons incubé des hépatocytes en culture primaire en présence d'insuline, de glucagon et d'acides aminés, aux concentrations égales à celles mesurées à l'état nourri au niveau de la veine porte chez les animaux HP. Les résultats obtenus montrent que les acides aminés s'opposent à l'induction de l'expression de la G6PC1 par le glucagon, mais ne modifient pas celle de la PEPCK. L'effet des acides aminés sur l'expression de la PEPCK et de la G6PC1 pourrait expliquer la stimulation de la néoglycogenèse chez les rats HP à l'état nourri.

Dans le rein, les niveaux d'expression de la PEPCK étaient similaires à ceux mesurés à jeun au niveau hépatique et peu affectés par l'état nutritionnel et la teneur en protéines du régime. L'isoforme 3 de la G6PC était environ dix fois plus exprimée que l'isoforme 1, et l'expression de cette-dernière n'était affectée ni par l'état nutritionnel ni par la teneur en protéines du régime. Au niveau de la partie proximale de l'intestin grêle, les niveaux d'expression de la PEPCK et de la G6PC1 étaient très faibles, comparés à ceux mesurés dans le foie et le rein, et l'isoforme 3 de la G6PC était l'isoforme prédominante de cette enzyme. Son niveau d'expression était peu affecté par l'état nutritionnel et la teneur en protéines du régime. Ces résultats suggèrent que, dans nos conditions expérimentales, la néoglucogenèse rénale et intestinale ne participent pas à la production endogène de glucose.

Cette étude a mis en évidence l'existence de la néoglycogenèse à l'état nourri chez des animaux adaptés à un régime hyperprotéique. Cette voie métabolique, activée directement par les acides aminés, contribue à la gestion de l'excès d'acides aminés et pourrait contribuer à l'amélioration de la régulation glycémique et la réduction du dépôt adipeux observées chez des animaux adaptés à la consommation d'un régime hyperprotéique.

Article 6

Liver glyconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high protein fed rats?

Dalila Azzout-Marniche, Claire Gaudichon, Clémence Blouet, Cécile Bos, Véronique Mathé, Jean-François Huneau and Daniel Tomé

UMR INRA 914 Nutrition Physiology and Feeding Behavior, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris cedex 05, France

Running title: Amino acid excess and glyconeogenesis

Key words: *high protein diet, glyconeogenesis, glucose 6-phosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, liver*

Footnotes

[1] Abbreviations: BCAA: Branched chain amino acids, DAA: Dispensable amino acids, IAA (Indispensable amino acids), GAA: Gluconeogenic amino acids, G6P: glucose 6-phosphate, G6Pase: glucose 6-phosphatase, G6PC1: gluconeogenic isoform of the glucose 6-phosphatase catalytic subunit; G6PC3: ubiquitous isoform of the glucose 6-phosphatase catalytic subunit; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase.

2 Corresponding author: Prof Daniel Tomé, UMR INRA-INAPG 914, Nutrition Physiology and Feeding Behavior, Institut National Agronomique Paris-Grignon, 16 rue Claude Bernard 75231 Paris cedex 05, France.
TEL: + 33 1 44 08 17 18, FAX: +33 1 44 08 72 48; e-mail: tome@inapg.fr

Abstract

This paper provides molecular evidence for a liver glyconeogenic pathway, i.e. a concomitant activation of hepatic gluconeogenesis and glycogenesis, which could participate in the mechanisms which cope with amino acid excess in high protein (HP) fed rats. This evidence is based on the concomitant up-regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression, down-regulation of glucose 6-phosphatase catalytic subunit (G6PC1) gene expression, an absence of glucose release from isolated hepatocytes and restored hepatic glycogen stores in the fed state in HP fed rats. These effects are mainly due to the ability of high physiological concentrations of portal blood amino acids to counteract glucagon-induced liver G6PC1 but not PEPCK gene expression. These results agree with the idea that the metabolic pathway involved in glycogen synthesis is dependant upon the pattern of nutrient availability. This non-oxidative glyconeogenic disposal pathway of gluconeogenic substrates copes with amino excess and participates in adjusting both amino acid and glucose homeostasis. In addition, the pattern of PEPCK and G6PC1 gene expression provides evidence that neither the kidneys nor the small intestine participated in gluconeogenic glucose production under our experimental conditions. Moreover, the main G6Pase isoform expressed in the small intestine is the ubiquitous isoform of G6Pase (G6PC3) rather than the G6PC1 isoform expressed in gluconeogenic organs.

Introduction

The consequences of high protein feeding on the regulation and pathways of glucose disposal through glycogen metabolism and gluconeogenesis remain unclear. High protein feeding induced both insulin and glucagon secretion in the fed state, associated with the repletion of glycogen stores (1-3), whereas excess dietary amino acids are metabolized within tissues and the derived nitrogen released into the circulation in the form of glutamine, alanine, serine, and glycine (4,5). These amino acids are subsequently taken up by the liver and the nitrogen is converted to urea and glutamine (5,6), the bulk of their carbon skeleton being converted to glucose through hepatic gluconeogenesis (7-10). This concomitant activation of both glycogen synthesis and gluconeogenesis in the fed state raises the question as to whether the glucose-6-P produced from gluconeogenic amino acid precursors could be directly channeled to glycogen through glycogenesis instead of being excreted as glucose from hepatocytes. This pathway of glyconeogenesis has been discussed over several decades but despite some evidence during refeeding (11), its significance and molecular basis remain poorly understood (12,13) and it has not previously been hypothesized under high protein feeding.

It is established that insulin stimulates glycogen synthesis and represses the gluconeogenic production of glucose, whereas glucagon represses glycogen synthesis and stimulates glucose production through glycogen hydrolysis and gluconeogenesis (14). Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) are the key regulatory enzymes of gluconeogenesis. Two isoforms of PEPCK have been described; they differ in terms of their intracellular distribution from species to species. In the rat, more than 90% of total activity is cytosolic, whereas in humans, the enzyme is distributed nearly equally in both cytosolic and mitochondrial compartments (15,16). The cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene is expressed in multiple tissues and regulated in a complex tissue-specific manner. Two isoforms of G6Pase have been described. G6PC1 is mainly expressed in the gluconeogenic organs, i.e. liver and kidney, whereas G6PC3 (17), also called the glucose 6-phosphatase catalytic subunit-related protein (UGRP) (18) or G6Pβ (19), is ubiquitous and not directly related to gluconeogenesis.

The acute regulation of PEPCK and G6Pase is achieved by the modulation of gene transcription and mRNA stability. Major factors that increase PEPCK and G6Pase gene expression include cyclic AMP, glucocorticoids and thyroid hormone, whereas insulin inhibits this process (20). Glucose, in contrast with other factors, has opposing effects on PEPCK and G6PC1 gene expression since it down-regulates PEPCK (21) and up-regulates G6Pase (22). Glutamine has been shown to counteract the effect of glucose on PEPCK gene expression (23), but no studies have examined the effect of a physiological increase to amino acid supply on the regulation of PEPCK and G6PC1 gene expression in gluconeogenic organs. There is however some evidence that glucose alone is not a good precursor for hepatic glycogen synthesis *in vitro* in perfused rat liver (24) or in isolated hepatocytes (25,26) and that the addition of modest amounts of gluconeogenic substrates in the culture medium (lactate or amino acids) results in markedly enhanced glycogenesis (27,28). Gluconeogenic substrates including amino acids may contribute to glycogen accumulation by exerting a regulatory effects on hepatic *de novo* glucose synthesis and glycogen metabolism (29,30).

The present study hypothesized that the increased post-prandial portal blood delivery of amino acids produced by high protein feeding could induce a liver glyconeogenic pathway among the metabolic pathways involved in the response, enabling coping with the amino acid excess. In this context, we first determined the liver glycogen content and glucose production by isolated hepatocytes in rats adapted to a normal or high protein diet. These results were further related to the liver expression of the two key gluconeogenic enzymes, i.e. PEPCK and G6PC, and the possible contribution of post-prandial increase in portal blood amino acid in the control of the expression of these two key enzymes. In addition, although the liver is considered as the principal gluconeogenic organ, it was also necessary to evaluate the role of other organs because the kidney is established as being a second gluconeogenic organ (31) and the intestine has been described as a potential gluconeogenic organ after prolonged fasting (32,33) or in rats fed a high protein diet (34).

Materials and methods

Animals, diet, and experimental design. 40 male Wistar rats weighing 180-220 g (Harlan-France, Gannat, France) were used according to the guidelines of the French National Animal Care Committee. The rats were placed under a reversed light rhythm (lights on from 8:00 pm to 8:00 am) and adapted to the experimental conditions for one week. Experimental diet groups consisted of a normal protein (NP, 14% of protein as energy) group and a high protein (HP, 50 % of protein as energy) group, which for 15 days received a control diet (in g/kg of dry matter: 140 total milk protein, 100 sucrose, 622.4 Cornstarch, 40 soybean oil, 35 AIN 93M mineral mix, 10 AIN 93 vitamin mix, 50 α–cellulose and 2.3 choline) or a high protein diet (in g/kg: 530 total milk protein, 46.5 sucrose, 286.0 Cornstarch 40 soybean oil, 35 AIN 93M mineral mix, 10 AIN 93 vitamin mix, 50 α–cellulose and 2.3 choline). The two diets were iso-energetic (14.89 kJ/g) and all dietary components were purchased or prepared by the A.P.A.E. (Atelier de Preparation des Aliments Expérimentaux, French National Institute of Agronomic Research, INRA, Jouy en Josas, France). Rats were divided into two groups of 16 rats which received the experimental diet in two gauged meals consisting of a breakfast (6 g of food) between 8:00 am and 9:00 pm, and a lunch (30 g of food) between 14:00 pm and 18:00 pm. Firstly, eight rats from each NP and HP group, in either the fed state (30 minutes after the end of breakfast) or fasted state (after an overnight fast) were used for glucose production measurements and blood sampling. Secondly, eight rats from each NP and HP rat group were sacrificed in either the fed or fasted state for gene expression studies. A third group of four rats receiving a standard chow diet was used for the preparation of primary hepatocyte cultures. The animals were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (0.1ml/100g), the abdomen was opened, and blood was collected from the portal vein for amino acid measurements, and by intracardiac puncture for serum insulin and glucose determinations. Blood samples were collected in pre-chilled tubes containing 0.7% EDTA (and 0.014% aprotinin for insulin determinations) and centrifuged (3000 × g, 15 min, 4 °C). The resulting plasma was divided into aliquots and stored at -20° until later analysis. The liver, proximal small intestine and kidneys were removed quickly, frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. The proximal small intestine was scraped to remove epithelial cells before being frozen.

Glucose production by isolated rat hepatocytes. Isolated hepatocytes were prepared as described in references (6) and (43). The liver was perfused with 300 mL of a perfusion medium as follows (in mM): 118.9 NaCl, 4.76 KCl, 1.19 KH_2PO_4, 1.19 K_2HPO_4 and 10 HEPES, pH 7.4, supplemented with 2.4 mM $CaCl_2$ and 0.90 g

collagenase H (Roche) to achieve liver digestion. When digestion was completed, the liver was excised and the cells disrupted. The cell suspension was filtered through nylon mesh filters (250 µm and 100 µm pore sizes) and washed twice by centrifugation for 3 min at 500 *g*. Cells were suspended in 50 mL of the perfusion medium. Cell viability was assessed using the trypan blue exclusion test and was always higher than 85%. Cells (8.10^6) were incubated at 37°C in 4 ml Krebs–Henseleit bicarbonate buffer supplemented with 10 mM sodium Hepes, pH 7.4, in an O_2/CO_2 atmosphere (19:1). The cells were incubated for 60 min in the absence or presence of gluconeogenic precursors (3 mM lactate/0.3 mM pyruvate, 3 mM alanine and 3 mM glycerol) (Sigma Chemical). Each measurement was performed in duplicate. At the end of incubation, the cells were rapidly removed from the incubation medium by spinning in a micro centrifuge (1s), frozen in liquid nitrogen and stored at –20°C. Glucose production was measured in the incubation medium. The rate of glucose production was determined by subtracting the amounts of glucose produced in the absence of gluconeogenic precursors from the total amount of glucose produced after the addition of gluconeogenic precursors. Results were expressed per 10^6 cells.

Primary culture of rat hepatocytes. Hepatocytes were plated on 60-mm tissue culture dishes at a density of 7 x 10^6 cells in medium 199 (M199) with Earle's salts (Gibco/BRL, Paisley, United Kingdom) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), 0.1% (wt/vol) bovine serum albumin, 2% (vol/vol) Ultroser G (Biosepra), 100 nM dexamethasone (Sigma), 1 nM insulin (Sigma), and 100 nM triiodothyronine (T_3; Sigma). The cells were allowed to adhere to the culture dishes for 4-5 h and the medium was replaced with fresh M199 medium containing 5,5mM glucose and low amino acids concentration (corresponding to the portal amino acid concentrations measured in NP fasted rats) supplemented with penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Cells were maintained in this medium overnight (18-24 h) and then utilized during subsequent experiments. Primary rat hepatocytes were cultured overnight in the presence of 100 nM glucagon and then incubated for 2 h with 100 nM glucagon supplemented with different concentrations of insulin (0, 10 or 100 nM) and amino acids (low or high concentrations of amino acids, corresponding to the portal amino acid concentrations measured in NP fasted and HP fed rats, respectively).

Real-time PCR (RT-PCR). *Total RNA preparation and cDNA synthesis*: 0.1 g frozen tissue was extracted using TRIzol® Reagents (invitrogen). The amount of total RNA extracted was quantified at 260 nm. RNA integrity had been confirmed by ethidium bromide staining. 2µg of total RNA in a final volume of 20µl was reversely transcribed using reverse transcriptase (MMLV-RT, Invitrogen). *Oligonucleotide primers*: Primers were designed using Oligo Explorer 1.1.0 software. In order to amplify cDNA but not genomic DNA (gDNA) the sense and antisense primers of each target gene were placed in two different exons of the gene. The sequences of PCR primers used were: 5'-GTATGGATTCCGGTGCTT-3', and 5'-TGGAGTCTTGTCAGGCATT-3' for G6PC1, 5'-TGAGATTGGTCCAGGCAG-3' and 5'-TCTAGCTGGTGTTATCCTTGG-3' for G6PC3, 5'-GAGACCACAGGATGAGGAA-3' and 5'-ATGACCTTGCCCTTATGCT- 3'for PEPCK, 5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3' and 5'-GGGTCGGGAGTGGGTAATTT-3' for 18S.

Quantification by real-time PCR: Real-time PCR was carried out using the qPCR Core kit for SYBR® Green I No ROX Kit (Eurogentec SA, Belgium) with a MyiQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc, USA) and SYBR GreenI (DNA binding dye) for the RNA extracted from frozen tissues. RNA extracted from primary hepatocyte cultures was analyzed by ABI 7300 using the power syber green PCR master mix (applied biosystems). Each PCR reaction was performed in a final volume of 20 µl, containing 5 µl of the RT

reaction medium (diluted 10-fold). All PCR reactions were performed as follows: denaturation at 95°C for 10 min, 40 amplification cycles with each cycle, consisted of 15s at 95°C following by 1 min at 60°C. For each run, a melt curve was subsequently performed to detect any contamination resulting from residual genomic DNA amplification (using controls without reverse transcriptase) and/or from primer dimer-formation (controls with no DNA template and no reverse transcriptase). The cycle threshold (C_T) for each sample was determined at a constant fluorescence threshold. Ribosomal 18 S RNA amplifications were used to account for variabilities in the initial quantities of cDNA, and interplate variations were corrected using an RT calibrator. Gene expression was determined using the 2- □Ct formula where 2 represents the optimum efficiency (*E*) of PCR which is *E* = 2, and □Ct = Ct target gene - □Ct 18S (□Ct 18 S= Ct 18 S calibrator- Ct 18 S sample). PCR efficiency was determined in each plate using a serial dilution of reverse transcribed RNA. Data are presented as means ± SE of 10^{10} x □Ct.

Analytical procedures. Liver glycogen contents were determined according to the method described by Bergmeyer (4). Glucose concentrations were measured by enzymatic spectrophotometric assay using the Glucose oxydase/Peroxidase (Sigma) enzymatic method. Serum insulin concentrations were assessed using a rat insulin ELISA kit (Mercodia kit, Sweden). Serum AA concentrations were determined using an HPLC system (Bio-Tek Instruments, St. Quentin en Yvelines, France) combined with post-column ninhydrin derivatization, and monitored using Kromasystem 2000 software. Separation was performed on a cation exchange resin (MCIGEL CK10F, Interchim, Montluçon, France). All amino acids were detected at 540 nm, except for proline (440 nm). γ-aminobutyric and α-aminoadipic acids were added to one aliquot to act as an internal standard, as previously described (35).

Statistics. The data are shown as mean values and standard error (□ SE). Differences between groups were tested by two-way ANOVA using the general linear model procedure of SAS (version 6.11: SAS, Cary, NC). Statistical significance was set at P<0.05.

Results

Plasma insulin and glucose, liver glycogen content, and glucose production

Plasma insulin and glucose were determined in NP and HP rats in both the fasted and fed states (Table 1). In the fed state, plasma glucose was slightly but significantly decreased (P<0.05) in HP rats compared to NP rats. The same trend was observed for plasma insulin, but the difference was not significant. The liver glycogen content was significantly higher in the fed state than in the fasted state, whatever the diet (Table 2). In the fed state, glycogen stores were similar in HP and NP rats. Moreover, glucose production by isolated hepatocytes from gluconeogenic substrates reached high levels in fasted rats but was markedly reduced in fed rats, without any difference between NP and HP rats (table 2).

PEPCK and G6Pase gene expression in the liver

To further investigate hepatic gluconeogenesis, the gene expression of the two key hepatic enzymes involved in gluconeogenesis, i.e. PEPCK and the catalytic subunit of G6Pase, was examined in the fasted and fed states in both NP and HP rats (Figure 1). In NP rats, PEPCK gene expression was repressed in the fed state and strongly induced after overnight fasting (P<0.05) (Figure 1A). By contrast, PEPCK gene expression in HP rats was

induced at the same level in both the fasted and fed states. For the catalytic subunit of G6Pase (G6PC), expression of the two isoforms, i.e. G6PC1 and G6PC3, was determined (Figures 1B and 1C). Firstly, the pattern of G6PC gene expression in the liver showed that G6PC1 was the principal subunit expressed in the liver. Secondly, in both NP and HP rats, G6PC1 gene expression was induced after overnight fasting and repressed under fed conditions.

PEPCK and G6Pase gene expression in the kidneys and intestine

In the kidneys, the abundance of PEPCK mRNA (Figure 2A) was similar to that observed in the liver and significantly increased in HP fasted rats when compared with NP rats. G6PC3, the ubiquitous isoform of G6Pase, was ten times more strongly expressed in the kidneys than G6PC1 (Figures 2B and 2C). In the small intestine, PEPCK mRNA abundance did not differ between NP and HP-adapted rats, in both the fasted and fed states. A slight increase was observed in the fed state compared to the fasted state, but was only significant in HP-adapted rats (Figure 2D). However, regardless of the nutritional conditions, PEPCK gene expression in the intestine remained very low, amounting only to 0.05% to 1% of that measured in the liver. As for PEPCK, the mRNA abundance of G6PC1 was very low and represented only 0.3% to 6.5% of that expressed in the liver. The results also indicated that G6PC3 was the main isoform of G6Pase expressed in the small intestine; mRNA abundance was 8 to 19 times higher than that of G6PC1. G6PC1 and G6PC3 were both induced in the fed state, whatever the protein content of the diet (Figures 2E and 2F).

Influence of amino acids and insulin on glucagon-induced PEPCK and G6PC1 gene expression in hepatocytes

As reported in Table 3, portal blood amino acid concentrations were significantly increased in HP rats compared to NP rats in the fed state ($P<0.05$), due to increases in indispensable amino acids (IAA), branched chain amino acids (BCAA) and some dispensable amino acids (DAA), i.e; proline, taurine and tyrosine. However, the pattern of gluconeogenic amino acid (GAA) variations depended upon the amino acid considered. Portal concentrations of alanine were enhanced in the fed state whatever the diet ($P<0.0001$), aspartate/asparagine increased in HP fed rats ($P<0.005$), and glycine and serine were more strongly influenced by the diet ($P<0.0001$ and $P<0.05$, respectively) whereas no variations were observed for glutamate/glutamine. In this context, the respective influence of amino acids and insulin on glucagon-induced PEPCK and G6PC1 gene expression was determined *in vitro* in a primary culture of rat hepatocytes (Figure 3). The results showed that high but physiologically relevant concentrations of amino acids (corresponding to the portal amino acid levels of HP fed rats) significantly inhibited glucagon-induced G6PC1 (Figure 3B) ($p<0.0005$), i.e. the last step of the glucagon-dependent induction of gluconeogenesis, but not PEPCK (Figure 3A) gene expression. These results also showed that the expression of G6PC1 was more responsive than that of PEPCK to insulin inhibition.

Discussion

The results of this study provide evidence for an indirect liver glyconeogenic pathway in the fed state in rats adapted to a HP diet. This pathway could participate in coping with amino acid excesses in high protein fed rats. In HP rats, the fed state was characterized by high hepatic glycogen levels, equivalent to those found in NP fed

rats, in agreement with the findings of other studies (1-3). Moreover, we found that glucose release from isolated hepatocytes is very low and is not different between NP and HP fed rats. There was a concomitant induction of PEPCK whereas no changes were observed for G6PC1 gene expression, which catalyzes the first step of cytosolic gluconeogenesis and the production of glucose from G6P, respectively. As a result, the newly synthesized G6P derived from gluconeogenesic precursors could be directed toward glycogen synthesis rather than being converted to glucose and subsequently released from hepatocytes.

In the present study, HP fed rats exhibited a slight decrease in plasma glucose, no change in plasma insulin and significantly increased levels of portal blood amino acids. Previous studies had reported a postprandial secretion of both insulin and glucagon in rats fed a HP diet (2,36). In that context, the respective influence of amino acids and insulin on glucagon-induced PEPCK and G6PC1 gene expression was investigated *in vitro* in primary cultures of isolated hepatocytes with constant concentration of glucose (5.5 mM). The present study showed that a portal blood amino acid excess was able to counteract the glucagon-induced expression of G6Pase but not PEPCK in the liver. These observations provide evidence for a role of amino acids in controlling the gene expression of G6C1 in the liver, and agree with the hypothesis that G6Pase suppression is sufficient to "push" G6P into glycogen synthesis (28,37). This regulatory effect of amino acids on G6PC1 gene expression constitutes molecular evidence for possible orientation of the gluconeogenesis flux toward liver glycogen synthesis. An additional mechanism could also involve the activation of glycogen synthetase (GS), which might also "pull" G6P into glycogen (38). Indeed, G6P not only constitutes the crossroads of several metabolic pathways, but also plays a key role as a signal molecule in regulating hepatic glucose and glycogen metabolism. An increase in G6P levels induces the activation of GS through cellular redistribution of the enzyme and activation of the phosphatase 1 proteins (PP1) that mediate GS dephosphorylation (39). Moreover, exogenous glucose and gluconeogenesis are equally effective in increasing intracellular G6P (40) and activating GS (41). For instance, it has been reported that G6P levels were increased in a proline perfused liver (28) and following the administration of casein hydrolysate to rats (42). There is also some evidence to suggest a direct effect of amino acids on GS activity, probably through cell swelling (27). Furthermore, amino acids stimulate p70(s6k) and transiently inhibit glycogen synthase kinase 3 (GSK3), which in turn stimulates GS (43). According to the present and other studies, amino acids can thus regulate glycogen synthesis indirectly via G6P, and directly by inactivating GSK3 and activating PP2A.

The liver appeared to be the main organ involved in regulating glucose homeostasis under high protein feeding in the adult rat, whereas the kidneys and intestine were only slightly or not involved in glucose production. Because G6PC1 gene expression in the kidneys was not affected by either overnight fasting or HP feeding, renal gluconeogenesis did not seem to be involved in glucose homeostasis under our experimental conditions. In line with these results, other studies also showed that PEPCK and G6Pase expression was not induced in the kidneys during short term fasting (44). However, the significant increase in renal PEPCK expression in HP fasted rats was in line with the role of the kidneys in the whole body acid–base balance. Indeed, when dietary amino acid supplies increase, the renal catabolism of plasma glutamine produced by the muscles generates ammonium ions which are partially excreted in urine. Renal PEPCK transcription is stimulated in the event of metabolic acidosis (45) and is involved in glutamine extraction (46). The conversion of glutamine to serine generates bicarbonate

ions (5) that neutralize any cation excess. The small intestine has also been suggested as a gluconeogenic organ after prolonged fasting or under HP feeding in the rat (34,47). However, in the present study, expression of the genes encoding the key gluconeogenic enzymes PEPCK and G6PC1 remained at very low levels in the intestinal mucosa when compared with the liver and kidneys, whatever the nutritional conditions. In line with our results, other studies have also demonstrated very low or even undetectable levels of G6PC1 mRNA in the small intestine of adult rats (17,48). Moreover, both our results and those of others (49) showed that the principal G6PC isoform expressed in the small intestine in adult rats was the ubiquitous (G6PC3) isoform. Interestingly, we observed that the expression of intestinal G6PC1 and G6PC3 was stimulated by feeding, regardless of the diet. These results are in favor of a glucose transepithelial transport role for intestinal G6Pase as previously suggested (50,51),i.e. in situations where glucose is available ~~(50,51)~~. In accordance with our view that the intestine was unlikely to produce glucose, and in line with the conclusions reached by Watford (52), the gluconeogenic capacity of this organ was recently refuted, based on the lack of glucose production by small intestine and , as observed from *in vivo* and *in vitro* tracer studies (53). As for observations concerning the kidneys, the stimulation of intestinal PEPCK expression with high protein feeding could have been related to extensive amino acid interconversion in this tissue and the production of bicarbonate ions to balance the cation excess (5).

This study questions the metabolic significance of the liver glyconeogenic pathway that confers the capacity to convert gluconeogenic precursors to glycogen in the fed state under high protein feeding. Knowing that the control of G6Pase activity by nutrients has a profound impact on glucose homeostasis, we postulate for an adaptative adjustment between G6Pase activity and glycogen metabolism in rats fed a high protein diet. This non-oxidative glyconeogenic disposal pathway of gluconeogenic substrates copes with amino acid excess and participates in adjusting both amino acid and glucose homeostasis. This pathway may be involved in improving glucose disposal and reducing fat deposition, as previously observed in rats fed a high protein diet (54-56). Further investigations are however required to verify this hypothesis and to understand the regulatory role of amino acids in this process.

References

1. **Remesy C, Demigne C and Aufrere J**. Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem J* 170: 321-9., 1978.

2. **Baum JI, Layman DK, Freund GG, Rahn KA, Nakamura MT and Yudell BE**. A reduced carbohydrate, increased protein diet stabilizes glycemic control and minimizes adipose tissue glucose disposal in rats. *J Nutr* 136: 1855-61, 2006.

3. **Obeid OA, Boukarim LK, Al Awar RM and Hwalla N**. Postprandial glycogen and lipid synthesis in prednisolone-treated rats maintained on high-protein diets with varied carbohydrate levels. *Nutrition* 22: 288-94, 2006.

4. **Yamamoto H, Aikawa T, Matsutaka H, Okuda T and Ishikawa E**. Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Am J Physiol* 226: 1428-33., 1974.

5. **Jungas RL, Halperin ML and Brosnan JT**. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev* 72: 419-48, 1992.

6. **Brosnan JT**. Glutamate, at the interface between amino acid and carbohydrate metabolism. *J Nutr* 130: 988S-90S, 2000.

7. **Bois-Joyeux B, Chanez M, Azzout B, Delhomme B and Peret J**. Comparison between starvation and consumption of a high protein diet in rats: hepatic metabolites and amino acid levels during the first 24 hours. *Diabete Metab* 12: 239-45., 1986.

8. **Remesy C and Demigne C**. Impaired lactate utilization in livers of rats fed high protein-diets. *J Nutr* 112: 60-9., 1982.

9. **Kaloyianni M and Freedland RA**. Contribution of several amino acids and lactate to gluconeogenesis in hepatocytes isolated from rats fed various diets. *J Nutr* 120: 116-22., 1990.

10. **Linn T, Santosa B, Gronemeyer D, Aygen S, Scholz N, Busch M and Bretzel RG**. Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. *Diabetologia* 43: 1257-65., 2000.

11. **Radziuk J and Pye S**. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 250-72., 2001.

12. **Bernard C**. *Origine du sucre qui existe dans le foie de l'homme et des animaux vertébrés-These de doctorat es sciences naturelles* (Notes, Mémoires et leçons sur la glycogenèse animale et le diabète. Monumenta Medica), 1853.

13. **Katz A**. Glycogenin, proglycogen, and glycogen biogenesis: what's the story? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E757-8; author reply E758-9, 2006.

14. **Postic C, Dentin R and Girard J**. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 30: 398-408, 2004.

15. **Nordlie RC and Lardy HA**. Mammalian liver phosphoneolpyruvate carboxykinase activities. *J Biol Chem* 238: 2259-63, 1963.

16. **Brech W, Shrago E and Wilken D**. Studies on pyruvate carboxylase in rat and human liver. *Biochim Biophys Acta* 201: 145-54, 1970.

17. **Guionie O, Clottes E, Stafford K and Burchell A**. Identification and characterisation of a new human glucose-6-phosphatase isoform. *FEBS Lett* 551: 159-64., 2003.

18. **Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC and O'Brien RM**. Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol* 29: 205-22., 2002.

19. **Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC and Chou JY**. A glucose-6-phosphate hydrolase, widely expressed outside the liver, can explain age-dependent resolution of hypoglycemia in glycogen storage disease type Ia. *J Biol Chem* 278: 47098-103. Epub 2003 Sep 16., 2003.

20. **Barthel A and Schmoll D**. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E685-92., 2003.

21. **Cournarie F, Azzout-Marniche D, Foretz M, Guichard C, Ferre P and Foufelle F**. The inhibitory effect of glucose on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured hepatocytes is transcriptional and requires glucose metabolism. *FEBS Lett* 460: 527-32., 1999.

22. **Massillon D**. Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Differential effect of glucose and xylitol. *J Biol Chem* 276: 4055-62. Epub 2000 Nov 21., 2001.

23. **Lavoinne A, Husson A, Quillard M, Chedeville A and Fairand A**. Glutamine inhibits the lowering effect of glucose on the level of phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 242: 537-43, 1996.

24. **Hems DA, Whitton PD and Taylor EA**. Glycogen synthesis in the perfused liver of the starved rat. *Biochem J* 129: 529-38., 1972.

25. **Geelen MJ**. Restoration of glycogenesis in hepatocytes from starved rats. *Life Sci* 20: 1027-34., 1977.

26. **Katz J, Golden S and Wals PA**. Glycogen synthesis by rat hepatocytes. *Biochem J* 180: 389-402., 1979.

27. **Plomp PJ, Boon L, Caro LH, van Woekom GM and Meijer AJ**. Stimulation of glycogen synthesis in hepatocytes by added amino acids is related to the total intracellular content of amino acids. *Eur J Biochem* 191: 237-43., 1990.

28. **Bode AM, Foster JD and Nordlie RC**. Glyconeogenesis from L-proline involves metabolite inhibition of the glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem* 267: 2860-3., 1992.

29. **Katz J and McGarry JD**. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism? *J Clin Invest* 74: 1901-9., 1984.

30. **Youn JH and Bergman RN**. Enhancement of hepatic glycogen by gluconeogenic precursors: substrate flux or metabolic control? *Am J Physiol* 258: E899-906., 1990.

31. **Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ and Stumvoll M**. Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* 24: 382-91., 2001.

32. **Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S and Mithieux G**. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49: 1165-8., 2000.

33. **Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S and Mithieux G**. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50: 740-6., 2001.

34. **Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F and Zitoun C**. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2: 321-9., 2005.

35. **Bos C, Metges CC, Gaudichon C, Petzke KJ, Pueyo ME, Morens C, Everwand J, Benamouzig R and Tome D**. Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. *J Nutr* 133: 1308-15, 2003.

36. **Demigne C, Fafournoux P and Remesy C**. Enhanced uptake of insulin and glucagon by liver in rats adapted to a high protein diet. *J Nutr* 115: 1065-72, 1985.

37. **Newgard CB, Hirsch LJ, Foster DW and McGarry JD**. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? *J Biol Chem* 258: 8046-52., 1983.

38. **Hers HG**. The control of glycogen metabolism in the liver. *Annu Rev Biochem* 45: 167-89., 1976.

39. **Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N, Cid E and Guinovart JJ**. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 546: 127-32., 2003.

40. **Katz J, Wals PA and Rognstad R**. Glucose phosphorylation, glucose-6-phosphatase, and recycling in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 253: 4530-6., 1978.

41. **Gomis RR, Favre C, Garcia-Rocha M, Fernandez-Novell JM, Ferrer JC and Guinovart JJ**. Glucose 6-phosphate produced by gluconeogenesis and by glucokinase is equally effective in activating hepatic glycogen synthase. *J Biol Chem* 278: 9740-6. Epub 2003 Jan 7., 2003.

42. **Gannon MC**. The effect of oral casein on hepatic glycogen metabolism in fasted rats. *Metabolism.* 42: 649-53., 1993.

43. **Armstrong JL, Bonavaud SM, Toole BJ and Yeaman SJ**. Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J Biol Chem* 276: 952-6., 2001.

44. **Brosnan JT, McPhee P, Hall B and Parry DM**. Renal glutamine metabolism in rats fed high-protein diets. *Am J Physiol* 235: E261-5, 1978.

45. **Curthoys NP and Gstraunthaler G**. Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F381-90, 2001.

46. **Vinay P, Coutlee F, Martel P, Lemieux G and Gougoux A**. Effect of phosphoenolpyruvate carboxykinase inhibition on renal metabolism of glutamine: in vivo studies in the dog and rat. *Can J Biochem* 58: 103-11, 1980.

47. **Mithieux G, Rajas F and Gautier-Stein A**. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J Biol Chem* 279: 44231-4. Epub 2004 Aug 9., 2004.

48. **Lin B, Annabi B, Hiraiwa H, Pan CJ and Chou JY**. Cloning and characterization of cDNAs encoding a candidate glycogen storage disease type 1b protein in rodents. *J Biol Chem* 273: 31656-60., 1998.

49. **Boustead JN, Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC and O'Brien RM**. Identification and characterization of a cDNA and the gene encoding the mouse ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol* 32: 33-53., 2004.

50. **Carriere V, Le Gall M, Gouyon-Saumande F, Schmoll D, Brot-Laroche E, Chauffeton V, Chambaz J and Rousset M**. Intestinal glucose-dependent expression of glucose-6-phosphatase: involvement of the aryl receptor nuclear translocator transcription factor. *J Biol Chem* 280: 20094-101, 2005.

51. **Habold C, Foltzer-Jourdainne C, Le Maho Y, Lignot JH and Oudart H**. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. *J Physiol* 566: 575-86. Epub 2005 May 5., 2005.

52. **Watford M**. Is the small intestine a gluconeogenic organ. *Nutr Rev.* 63: 356-60., 2005.

53. **Martin G, Ferrier B, Conjard A, Martin M, Nazaret R, Boghossian M, Saade F, Mancuso C, Durozard D and Baverel G**. Glutamine gluconeogenesis in the small intestine of 72h-fasted adult rats is undetectable. *Biochem J* in press, 2006.

54. **Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, Tome D and Huneau JF**. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R934-42, 2004.

55. **Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Bos C, Mathe V, Tome D and Huneau JF**. The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J Nutr* 136: 1849-54, 2006.

56. **Pichon L, Huneau JF, Fromentin G and Tome D**. A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J Nutr* 136: 1256-60, 2006.

Table 1. Plasma glucose and insulin in fasted or fed (90 min after the beginning of the meal) rats (n= 4 to 6 per group) adapted for 15 days to a NP or HP diet. Statistical differences for Diet (D), Conditions (C) and interaction between the two factors (DxC) are reported (Two-way-ANOVA).

		Insulin (pmol/L)	**Glucose (mmol/L)**
NP	Fasted	170.9 ± 42.9[a]	7.4 ± 0.6[a]
	Fed	595.3 ± 114.4[b]	7.1 ± 0.9[a]
HP	Fasted	140.1 ± 43.5[a]	6.2 ± 0.7[ab]
	Fed	364.1 ± 47.6[ab]	5.9 ± 0.7[b]
Statistical effect (P)	D	NS	<0.05
	C	<0.001	NS
	D x C	NS	NS

The results are expressed as means ± SE.

Within each column, values with different letters are statistically different ($P < 0.05$).

Table 2. Liver glycogen content and glucose production by isolated hepatocytes in fasted (n=5) or fed (90 min after the beginning of the meal) (n=5) rats adapted for 15 days to a NP or HP diet. Glucose production by isolated hepatocytes was measured after incubation for 60 min in the presence of 3 mM alanine, 3 mM lacate/0.3 mM pyruvate and 3 mM glycerol. Statistical differences for Diet (D), Conditions (C) and interaction between the two factors (DxC) are reported (Two-way-ANOVA).

		glycogen (mg/g)	**glucose production (nmol/106 hepatocytes/hour)**
NP	Fasted	0.86 ± 0.3[a]	1809.9±72.2[a]
	Fed	18.91 ± 1.6[b]	490.3±29.7[b]
HP	Fasted	4.32 ± 1.4[a]	1869.7±160.5[a]
	Fed	17.41 ± 4.6[b]	534.5±64.6[b]
Statistical effect (P)	D	NS	NS
	C	<0.001	<0.0001
	D x C	NS	NS

The results are expressed as means ± SE.

In each column values with different letter are statistically different ($P < 0.05$).

Table 3. Portal blood amino acid concentrations in fasted or fed (90 min after the beginning of the meal) rats (n= 4 to 6 per group) adapted for 15 days to NP or HP diet. Statistical differences for Diet (D), Conditions (C) and interaction between the two factors (DxC) are reported (Two-way-ANOVA).

Amino acids (µmol/l)	**NP**		**HP**		**Statistical effect (P)**
	Fasted	Fed	Fasted	Fed	
Indispensable					
▪ Histidine	27± 5 [a]	39± 3 [ab]	36± 1 [a]	54± 4 [b]	D, C (<0.005)
▪ Isoleucine	39± 3 [a]	37± 5 [a]	57± 6 [a]	132± 11 [b]	D, C, DxC (<0.0005)
▪ Leucine	73± 6 [a]	68± 10 [a]	105± 8 [a]	257± 18 [b]	D, C, DxC (<0.0001)
▪ Lysine	269± 31 [a]	235± 18 [a]	296± 6 [a]	409± 20 [b]	C, DxC (<0.01)
▪ Methionine	26± 3 [a]	28± 5 [a]	29± 1 [a]	58± 4 [b]	D, C, DxC (<0.005)
▪ Phénylalanine	38± 4 [a]	39± 7 [a]	49± 3 [ab]	71± 8 [b]	D (<0.005)
▪ Threonine	163± 12 [a]	163± 9 [a]	107± 4 [a]	202± 13 [b]	D, DxC (<0.005)
▪ Valine	91± 7 [a]	98± 8 [a]	127± 9 [a]	317± 17 [b]	D, C, DxC (<0.0001)
Dispensable					
▪ Alanine	262± 17 [a]	415± 12 [b]	237± 11 [a]	474± 47 [b]	C (<0.0001)
▪ Aspartate/Asparagine	27± 4 [a]	33± 2 [a]	31± 2 [a]	77 ± 8 [b]	D, C, DxC (<0.005)
▪ Arginine	52± 8	47± 11	68± 9	59± 6	ns
▪ Citruline	53± 3	54± 8	46± 2	64± 6	ns
▪ Glutamate/Glutamine	286± 22	280± 16	264± 10	354± 46	ns
▪ Glycine	224± 17 [a]	179± 25 [ab]	129± 6 [b]	122± 10 [b]	D (<0.0001)
▪ Ornithine	22± 1	33± 12	20± 3	28± 4	ns
▪ Proline	100± 9 [a]	155± 29 [a]	94± 4 [a]	377± 32 [b]	D, C, DxC (<0.0005)
▪ Sérine	179± 9 [a]	159± 10 [ab]	116± 4 [b]	153± 17 [ab]	D (<0.05)
▪ Taurine	45± 4 [a]	82± 27 [ab]	123± 8 [b]	99± 6 [b]	D, DxC (<0.05)
▪ Tyrosine	44± 3 [a]	52± 7 [a]	44± 3 [a]	79± 5 [b]	D, C, DxC (<0.05)
▪ IAA	726± 61 [a]	706 ± 62 [a]	805 ± 31 [a]	1496± 71 [b]	D, C, DxC (<0.0005)
▪ DAA	1285± 65 [a]	1488±101 [a]	1174± 14 [a]	1889± 117 [b]	C, DxC (<0.05)
▪ BCAA	203± 16 [a]	204 ± 22 [a]	289 ± 23 [a]	705 ± 43 [b]	D, C, DxC (<0.0001)
▪ GAA	1142± 66 [ab]	1228± 62 [a]	884± 8 [b]	1382± 88 [a]	C, DxC (<0.05)
▪ Total AA	2011±125 [a]	2194±154 [a]	1979± 33 [a]	3385±172 [b]	D, C, DxC (<0.005)

Results are expressed as means ± SE. In each column, values with different letters are statistically different ($P < 0.05$). IAA (Indispensable amino acids), BCAA (Branched chain amino acids), GAA (Gluconeogenic amino acids), DAA (Dispensable amino acids)

Figure Legends

Figure 1. Changes to liver mRNA encoding PEPCK (A), G6PC1 (B) and G6PC3 (C) in rats fed an NP or HP diet, in the fasted state (overnight fast) or in the fed state (90 min after the beginning of the meal). Total RNA was extracted from frozen tissues and analyzed by real-time PCR, a technique as described in the Methods. Ribosomal 18 S RNA was used as the internal control. The results are expressed as means ± SE for five different animals. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$ and was reported in the graphs using different letters. Global statistical effects concerning diet (D), Conditions (C) and the interaction of the two factors (DxC) are shown at the top of each graph (Two-way-ANOVA).

Figure 2. Tissue- specific gene expression of PEPCK (A, D) G6PC1 (B, E) and G6PC3 (C, F) in the kidneys and small intestine of rats fed an NP or HP diet, in the fasted state (overnight fast) or in the fed state (90 min after the beginning of the meal). Total RNA were extracted from the kidneys (A, B, C) and the proximal part of the small intestine (D, E, F) and analyzed by RT-PCR. Ribosomal 18 S RNA was used as the internal control. The results are expressed as means ± SE for five different animals. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$ and was reported in the graphs using different letters. Global statistical differences concerning diet (D), Conditions (C) and the interaction of the two factors (DxC) are shown at the top of each graph (Two-way-ANOVA).

Figure 3. Effects of amino acids on PEPCK (A) and G6PC1 (B) gene expression induced by glucagon in primary cultures of hepatocytes. Ribosomal 18 S RNA was used as the internal control. The results are expressed as fold increase of the basal value (first black bar) and are representative of two independent experiments. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$ and was reported in the graphs using different letters. Global statistical effects concerning amino acids (AA), insulin and the interaction of the two factors (AA x insulin) are shown at the top of each graph (Two-way-ANOVA).

Fig. 1

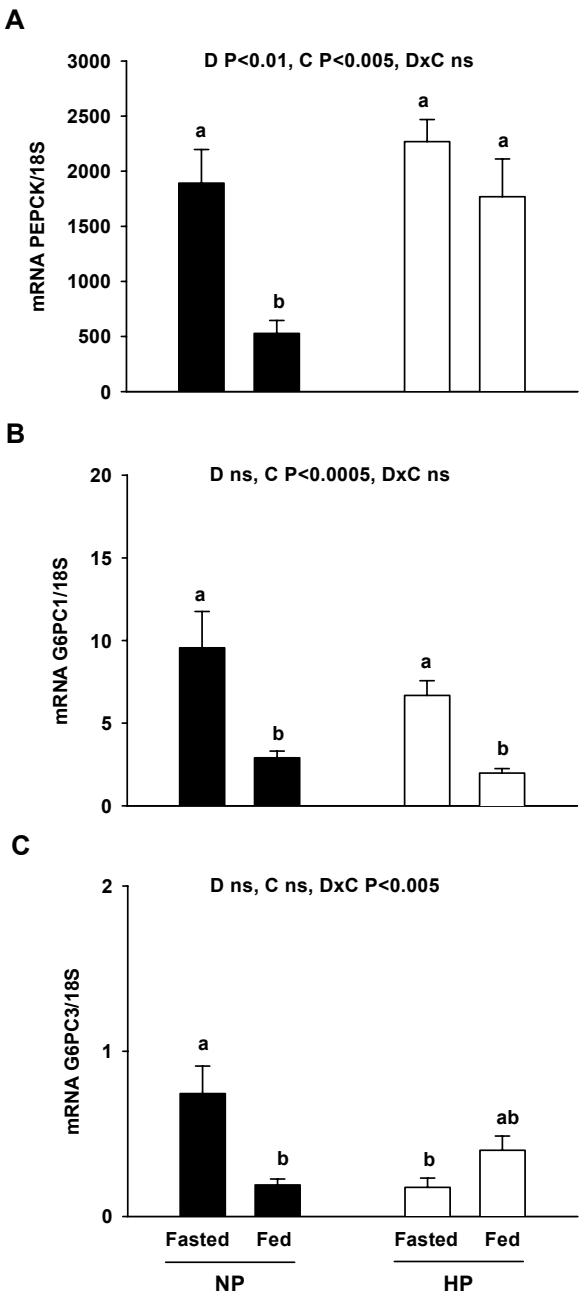

A
D P<0.01, C P<0.005, DxC ns
mRNA PEPCK/18S
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
a
b
a
a
B
D ns, C P<0.0005, DxC ns
mRNA G6PC1/18S
20
15
10
5
0
a
b
a
b
C
D ns, C ns, DxC P<0.005
mRNA G6PC3/18S
2
1
0
a
b
b
ab
Fasted
Fed
Fasted
Fed
NP
HP

Fig. 2

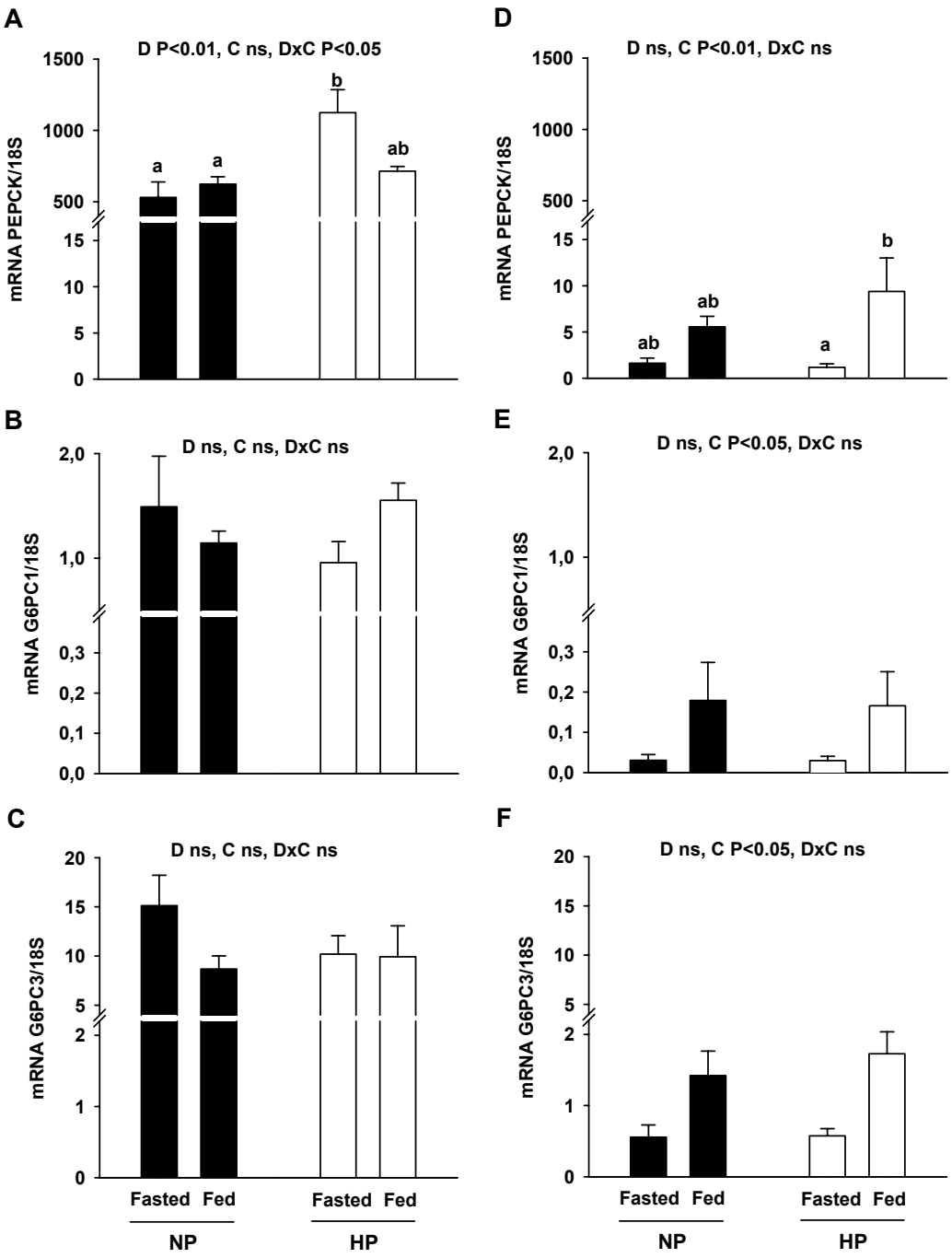
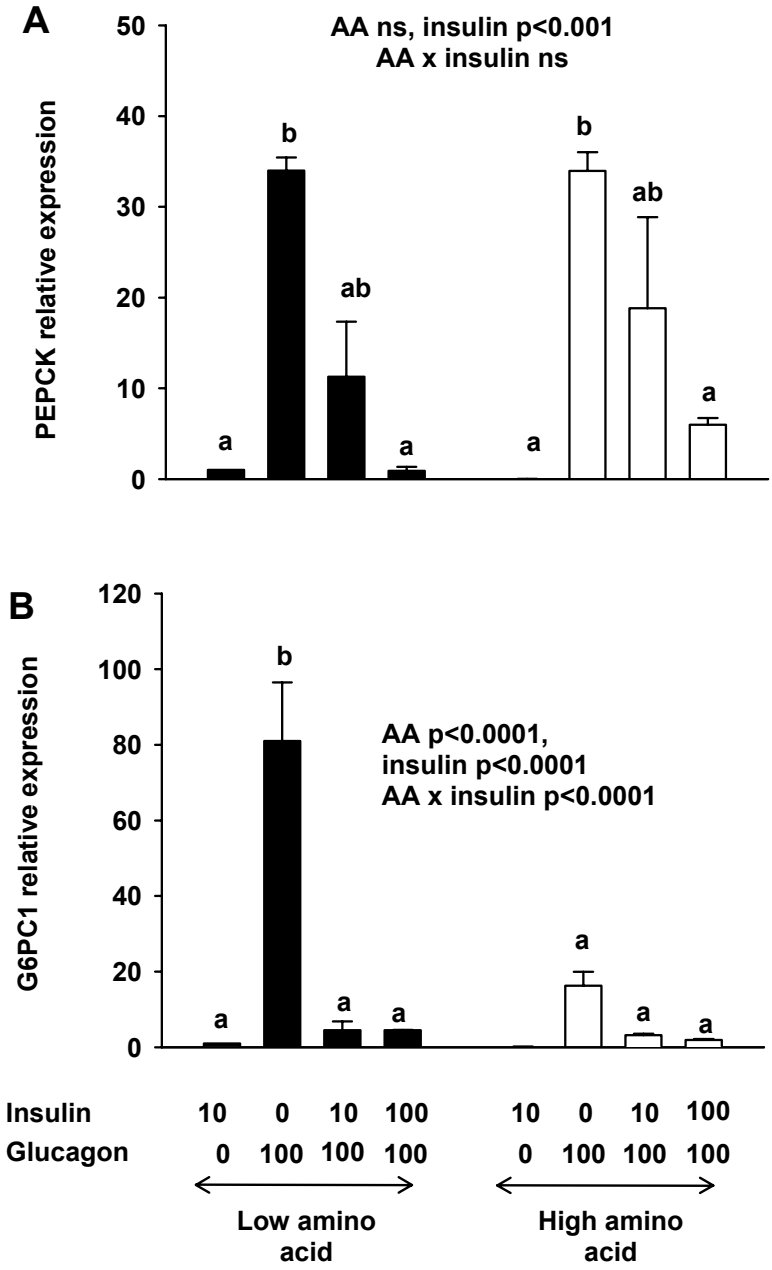

A
D P<0.01, C ns, DxC P<0.05
mRNA PEPCK/18S
1500
1000
500
15
10
5
0
a
a
b
ab
D
D ns, C P<0.01, DxC ns
mRNA PEPCK/18S
ab
ab
a
b
B
D ns, C ns, DxC ns
mRNA G6PC1/18S
2,0
1,0
0,3
0,2
0,1
0,0
E
D ns, C P<0.05, DxC ns
mRNA G6PC1/18S
C
D ns, C ns, DxC ns
mRNA G6PC3/18S
20
15
10
5
2
1
0
F
D ns, C P<0.05, DxC ns
mRNA G6PC3/18S
Fasted Fed
NP
Fasted Fed
HP
Fasted Fed
NP
Fasted Fed
HP

Fig. 3


A
PEPCK relative expression
AA ns, insulin p<0.001
AA x insulin ns
50
40
30
20
10
0
a
b
ab
a
a
b
ab
a
B
G6PC1 relative expression
120
100
80
60
40
20
0
AA p<0.0001,
insulin p<0.0001
AA x insulin p<0.0001
a
b
a
a
a
a
a
Insulin 10 0 10 100 10 0 10 100
Glucagon 0 100 100 100 0 100 100 100
Low amino acid
High amino acid

FIGURES

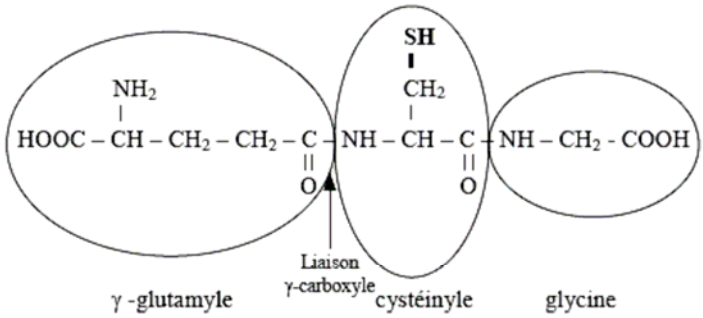


Figure 1 : La structure chimique du glutathion.

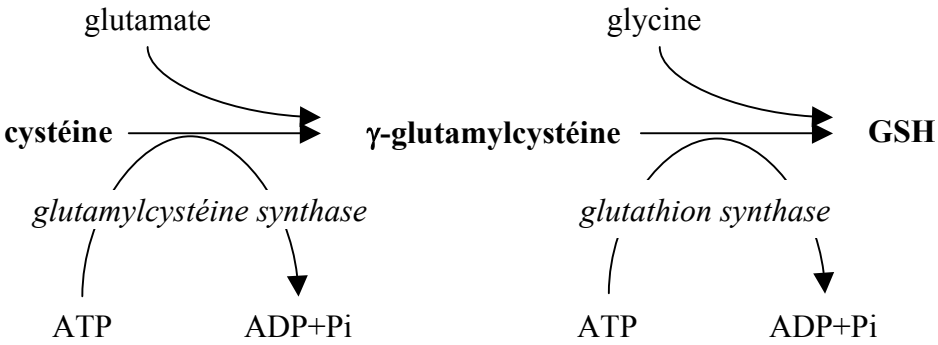


Figure 2 : La biosynthèse du glutathion.

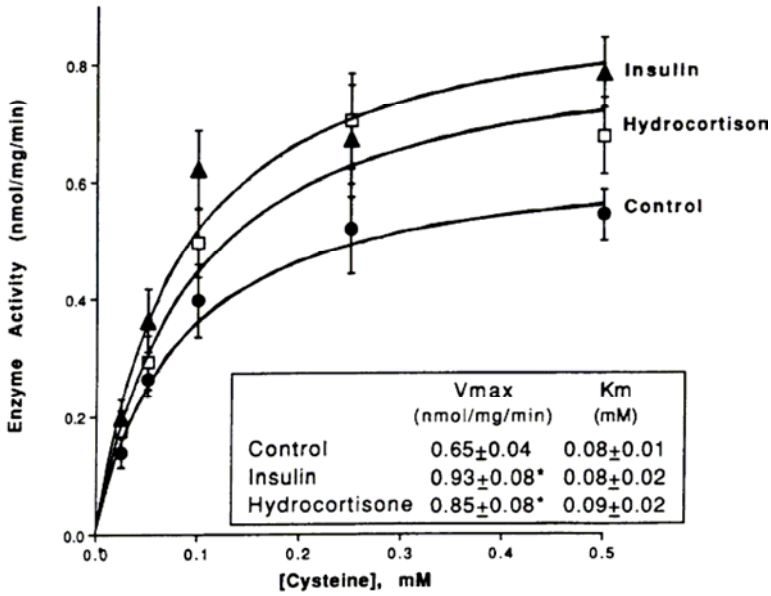


Figure 3 : Effet de l'insuline sur l'activité γ-glutamylcystéine synthase. D'après Lu et al. (1992).

Des hépatocytes en culture ont été incubés pendant 1 nuit en présence d'insuline (1 µg/mL) ou d'hydrocortisone (50 nmol/L). Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± écart types.

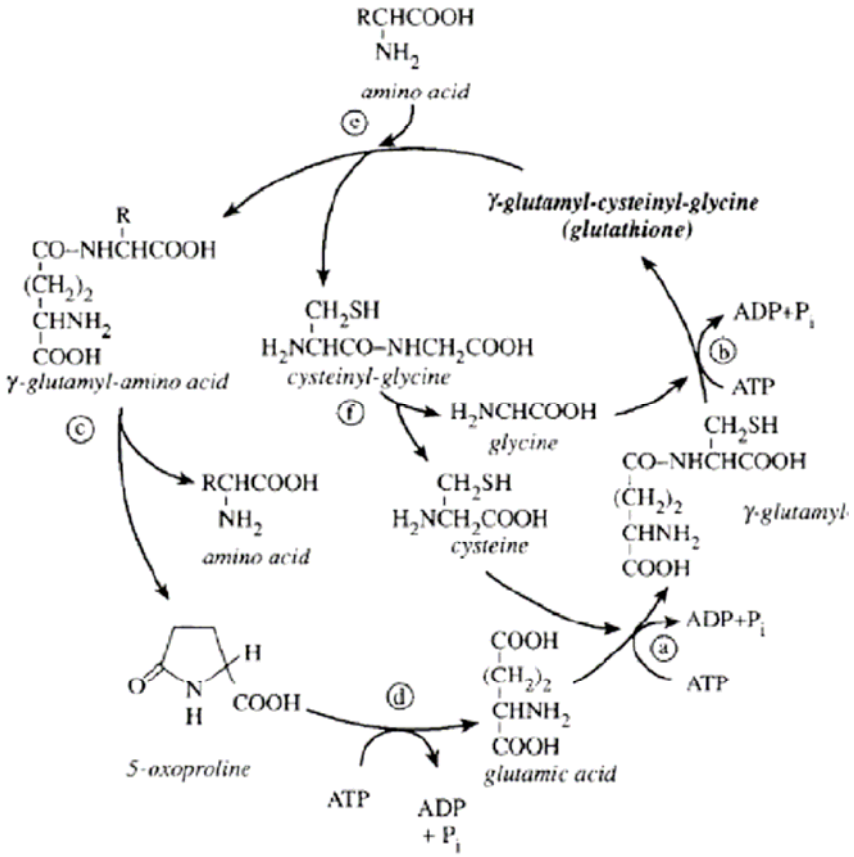


Figure 4 : Le cycle de la γ-glutamyle. D'après Pastore et al. (2003).

(a) Glutamylcystéine synthase; (b) glutathion synthase; (c) γ-glutamyl cyclotransférase; (d) oxoprolinase; (e) γ-glutamyl transpeptidase; (f) peptidase.

Tableau 1 : Concentrations tissulaires en glutathion chez des souris après administration aiguë (expérience A) ou chronique (expérience B) d'un inhibiteur de la synthèse de glutathion, le BSO. D'après Griffith et al. (1979).

Tissue	Tissue GSH, μmol/g (%)		
	Control	Exp. A*	Exp. B†
Brain	2.08 ± 0.15	1.93 ± 0.11 (93)	1.74 ± 0.13 (84)
Heart	1.35 ± 0.10	1.19 ± 0.14 (88)	0.20 ± 0.05 (15)
Lung	1.52 ± 0.13	1.42 ± 0.09 (94)	0.79 ± 0.07 (52)
Spleen	3.43 ± 0.35	3.46 ± 0.07 (101)	1.73 ± 0.18 (51)
Liver	7.68 ± 1.22	2.67 ± 1.15 (35)	4.26 ± 1.11 (56)
Pancreas	1.78 ± 0.31	0.81 ± 0.30 (46)	0.14 ± 0.06 (8)
Kidney	4.13 ± 0.15	0.75 ± 0.16 (18)	0.19 ± 0.05 (4)
Small intestine mucosa	2.94 ± 0.16	2.40 ± 0.36 (82)	1.64 ± 0.41 (56)
Colon mucosa	2.11 ± 0.19	1.83 ± 0.16 (87)	0.29 ± 0.14 (14)
Skeletal muscle	0.78 ± 0.05	0.52 ± 0.11 (67)	0.016 ± 0.009 (2)
Plasma, μM	28.4 ± 6.2	9.3 ± 3.8 (33)	9.1 ± 2.7 (32)

Expérience A : les concentrations tissulaires en glutathion ont été déterminées 2 heures après une injection sous-cutanée de 4 mmol/kg de poids corporel de BSO. Expérience B : les concentrations tissulaires en glutathion ont été déterminées après 15 jours d'un traitement au BSO, administré par voie orale (dans l'eau de boisson, 5μmol/jour). Les valeurs entre parenthèse sont les pourcentages de la valeur mesurée chez les rats témoins.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM.

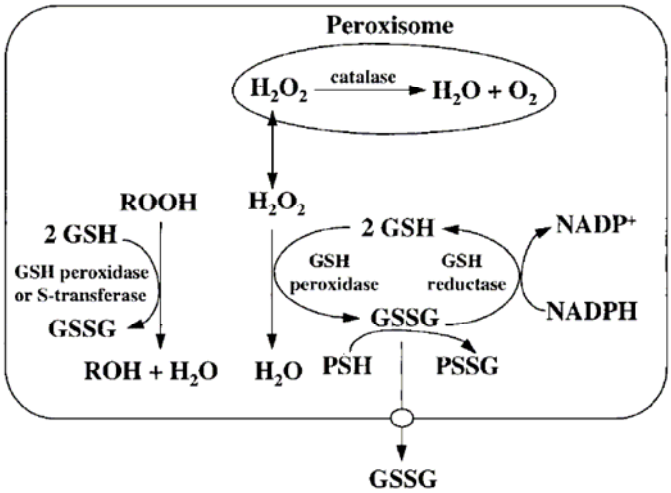


Figure 5: Participation du glutathion aux défenses antioxydantes. D'après Lu et al. (1999).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), formé dans la mitochondrie lors de la production d'ATP, peut être réduit par la glutathion peroxidase (GSH peroxidase). La glutathion réductase régénère le glutathion sous sa forme réduite pour maintenir le statut redox intracellulaire. Dans des conditions de stress oxydant, le maintien du statut redox du glutathion est assuré par la glutathionylation des groupements thiols des protéines (PSH → PSSG) et par l'export du glutathion oxydé.

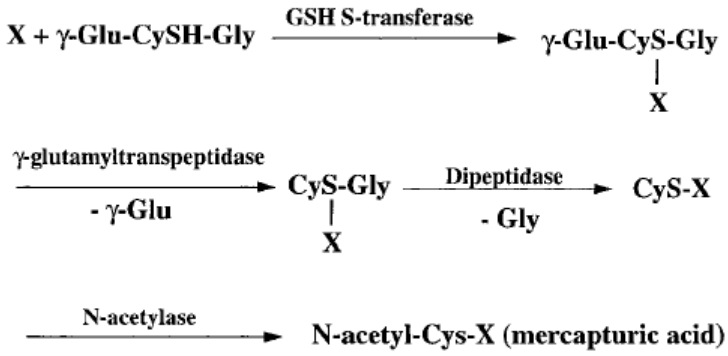


Figure 6 : Détoxification de composés électrophiles (X) par la glutathion S-transférase et la voie de l'acide mercapturique . D'après Lu et al. (1999).

La glutathion S-transférase catalyse la formation d'un composé conjugué glutathion (GSH)-molécule électrophile. Ce composé est clivé puis N-acétylé pour former de l'acide mercurique, excrété dans l'urine.

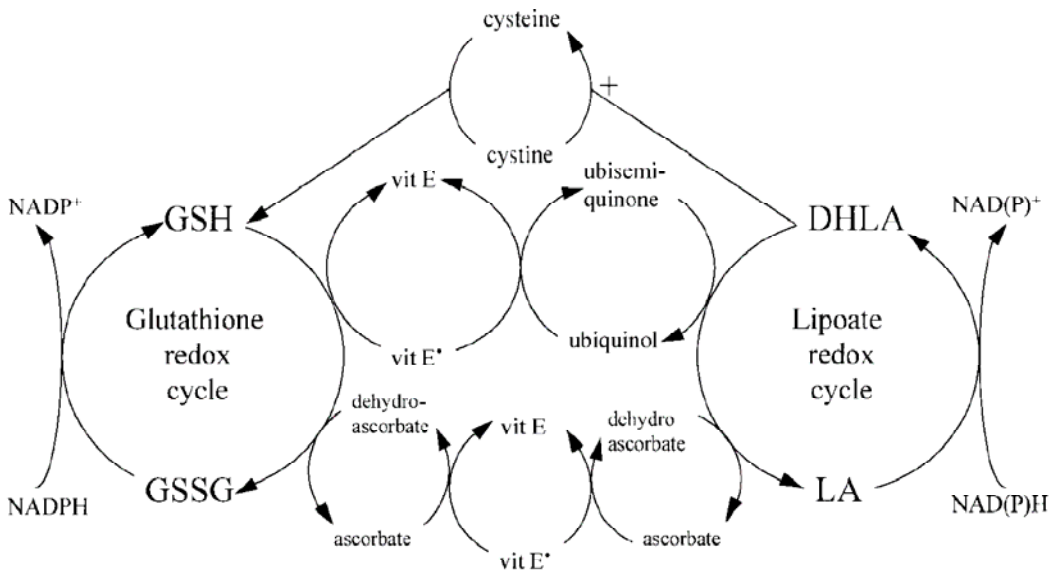


Figure 7 : Participation du couple redox du glutathion à la régénération de la forme réduite d'autres antioxydants. D'après Sen et al. (2000).

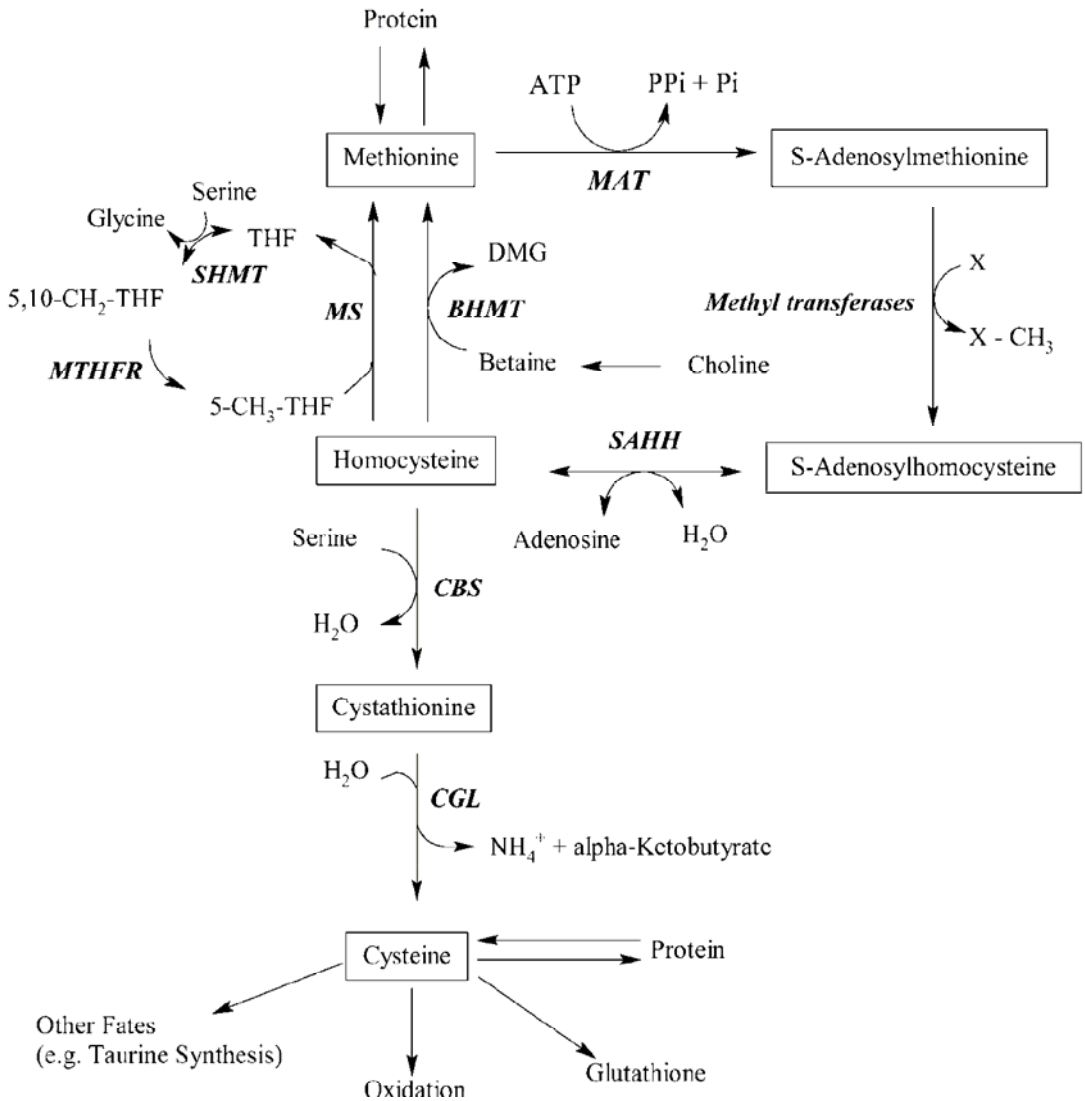


Figure 8: Métabolisme de la méthionine et de la cystéine. D'après Brosnan et al. (2006)

MAT : Méthionine adénosyltransférase ; SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase ; CBS : cystathionine β-synthase ; CGL : cystathionine γ-lyase ; MTHFR : méthylènetétrahydrofolate réductase ; MS : méthionine synthase ; BHMT : bétaine:homocystéine méthyltransférase ; SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase.

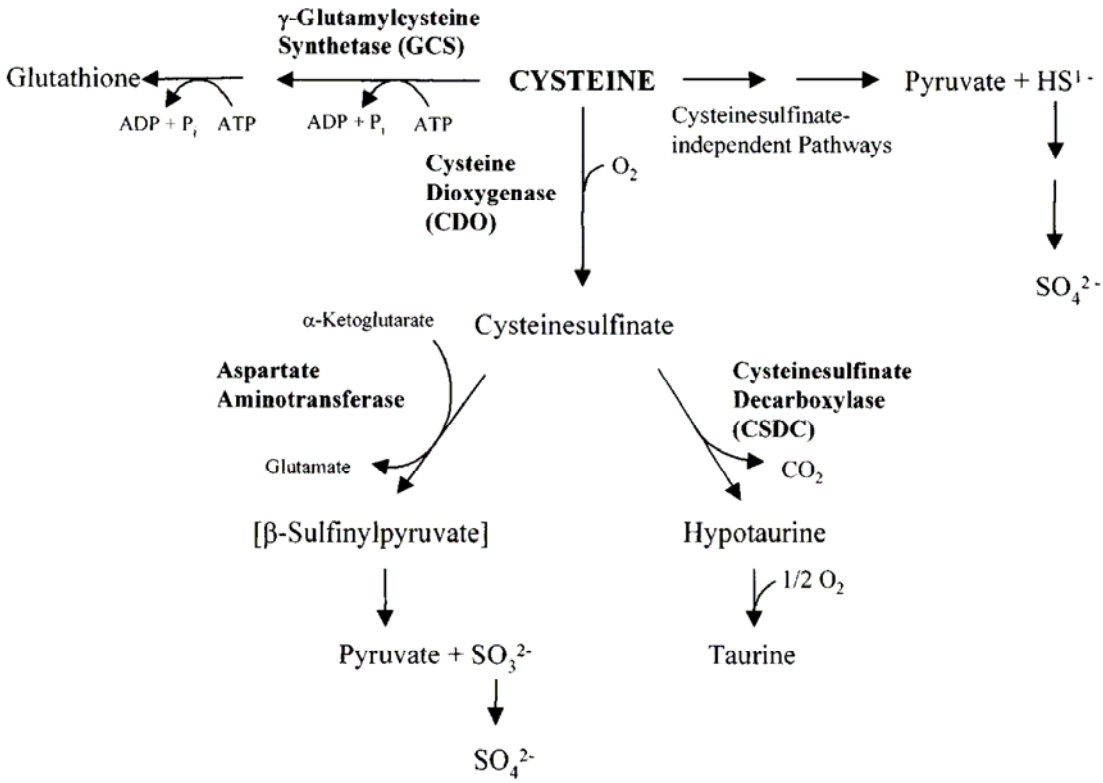


Figure 9 : Les voies d'utilisation de la cystéine. D'après Bella et al. (1999).

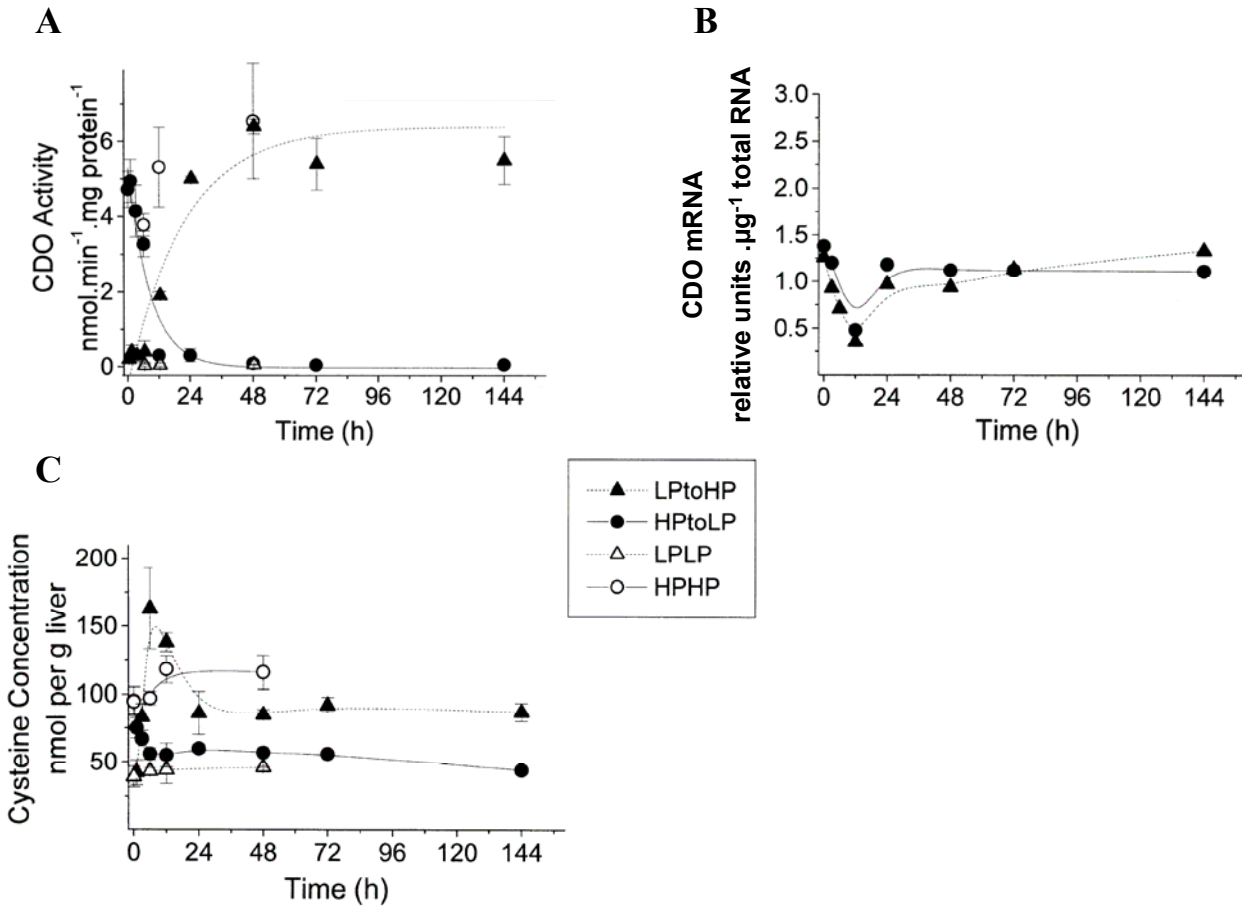


Figure 10 : Effet du passage d'un régime hyperprotéique (HP, 40% de protéines) à un régime hypoprotéique (LP, 10% de protéines) et vice-versa sur l'expression et l'activité de la cystéine dioxygénase chez le rat. D'après Lee et al. (2004).

A: Activité hépatique de l'enzyme. B: Concentrations hépatiques en ARN messagers de l'enzyme. C: Concentrations hépatiques en cystéine.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM.

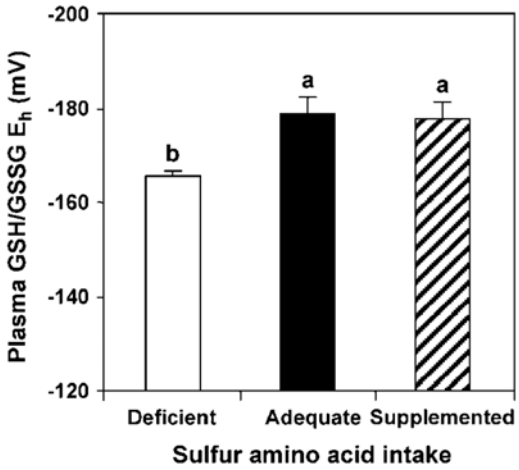


Figure 12 : Effet de l'apport en acides aminés soufrés sur le potentiel de demi-cellule plasmatique du couple redox du glutathion chez le rat. D'après Nkabyo et al. (2006).

Apport en acides aminés soufrés : deficient, 17 mg/jour ; adequate, 98 mg/jour ; supplemented, 214 mg/jour pendant 7 jours. Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM.

Tableau 2 : Effet de la consommation d'un régime dépourvu d'acides aminés soufrés pendant 10 jours chez l'Homme sain sur le taux de synthèse (FSR), la vitesse de synthèse (ASR) et les concentrations sanguines de glutathion. D'après Lyons et al. (2000).

Diet and subjects	GSH FSR, per day	GSH ASR, μmol·liter^{-1}·day^{-1}	Whole blood GSH, μM
Adequate			
1	0.65	557.97	858.42
2	0.57	600.51	1,053.52
3	0.49	479.32	978.20
4	0.58	673.25	1,160.77
5	0.60	987.00	1,645.00
6	0.83	829.83	999.80
7	0.85	1105.30	1,300.35
Mean ± SD	0.65 ± 0.13*	747 ± 216†	1,142 ± 243
SAA-free			
1	0.57	650.44	1,143.13
2	0.56	546.53	979.45
3	0.34	462.16	1,359.29
4	0.24	356.60	1,485.85
5	0.50	604.38	1,208.75
6	0.58	614.12	1,058.82
7	0.64	815.96	1,274.94
Mean ± SD	0.49 ± 0.13	578.6 ± 135	1,216 ± 162

*$P < 0.01$ adequate vs. SAA-free diet.
†$P < 0.05$ adequate vs. SAA-free diet.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM, n=7.

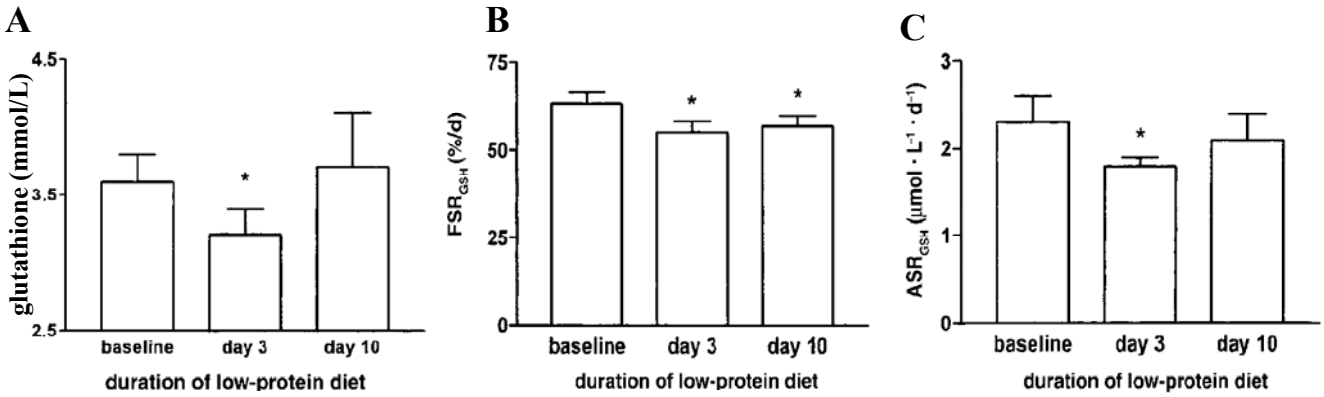


Figure 12 : Effet de la consommation d'un régime normoprotéique (0,75 g/kg/j) chez des sujets sains adaptés à la consommation d'un régime riche en protéines (1,13 g/kg/j) sur les concentrations et la synthèse de glutathion dans les globules rouges. D'après Jackson et al. (2002).

A. Concentrations en glutathion. B. Taux de synthèse du glutathion. C. Vitesse de synthèse du glutathion.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM, n=12. *:différence significative par rapport à la valeur basale, P<0.05.

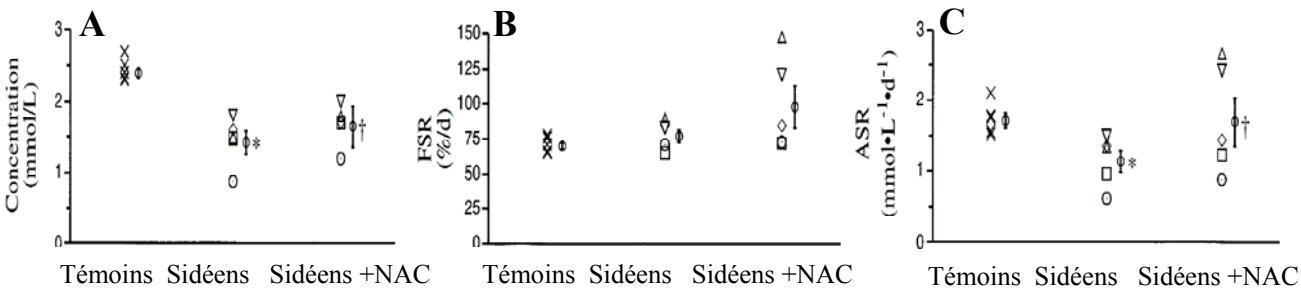


Figure 13: Effet d'un apport supplémentaire en N-acétylcystéine sur les concentrations et la synthèse de glutathion dans les globules rouges chez des sujets sidéens. D'après Jahoor et al. (1999).

A. Concentrations en glutathion. B. Taux de synthèse du glutathion. C. Vitesse de synthèse du glutathion.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM, n=5. *: différence significative par rapport aux sujets sains, P<0.05. †: différence significative par rapport aux sujets sidéens non supplémentés, P<0.05.

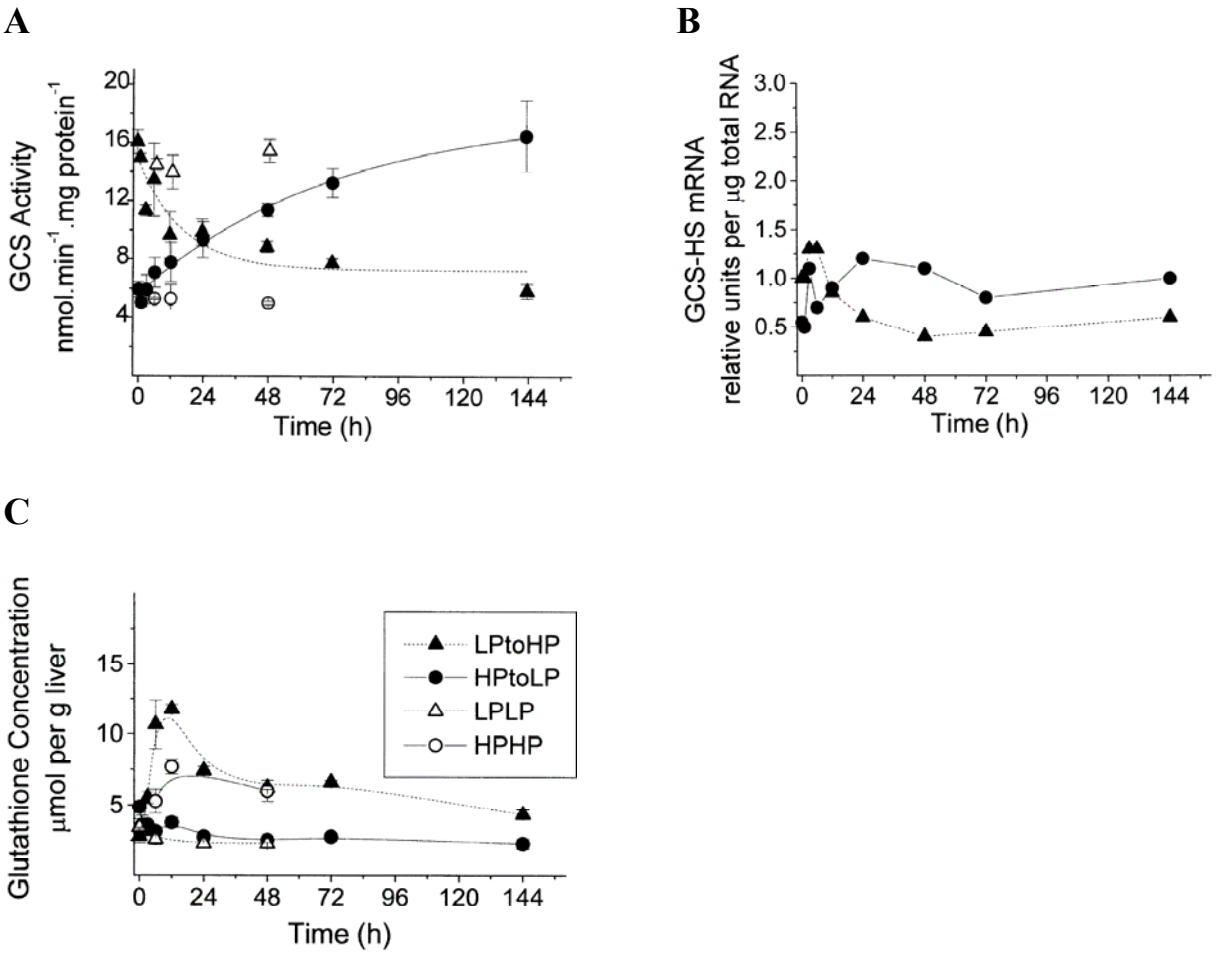


Figure 14: Effet du passage d'un régime hyperprotéique (HP, 40% de protéines) à un régime hypoprotéique (LP, 10% de protéines) et vice-versa sur l'expression et l'activité de la γ-glutamylcystéine synthase chez le rat. D'après Lee et al. (2004).

A: Activité hépatique de l'enzyme. B: concentration hépatique en ARN messagers de l'enzyme. C: concentration hépatique en glutathion.

Les données sont présentées sous la forme de moyennes ± SEM.

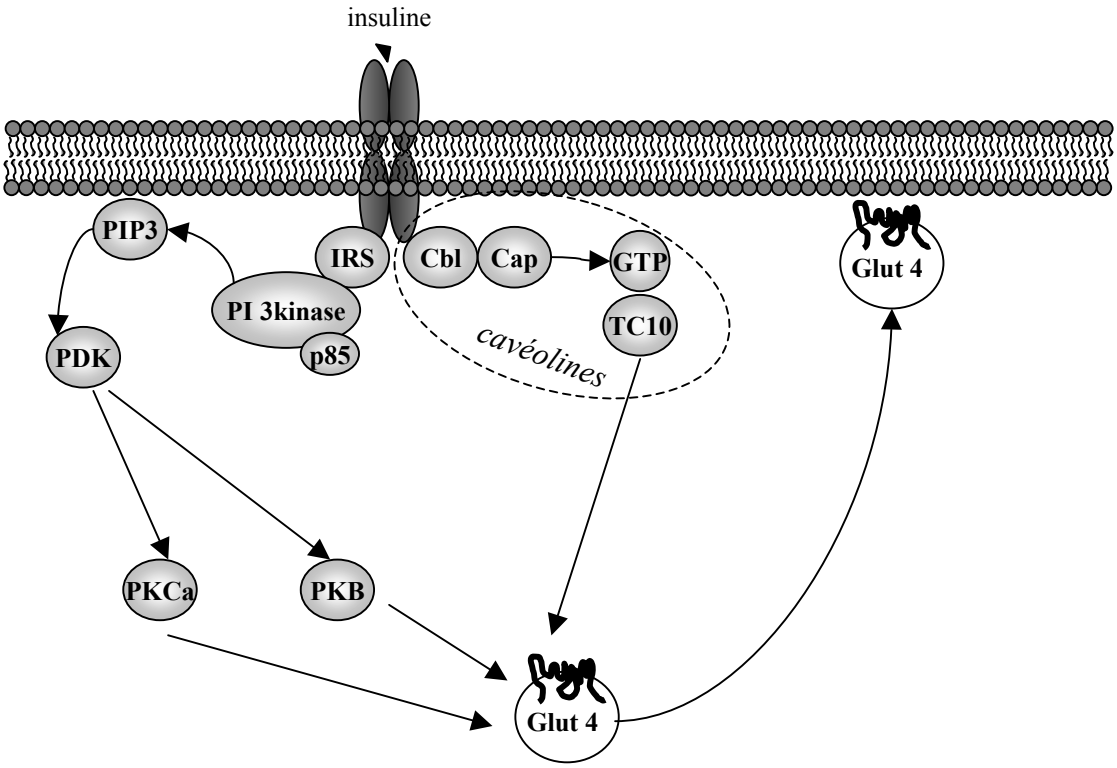


Figure 15 : Insuline et translocation des transporteurs de glucose GLUT4. D'après Pessin et al. (2001).

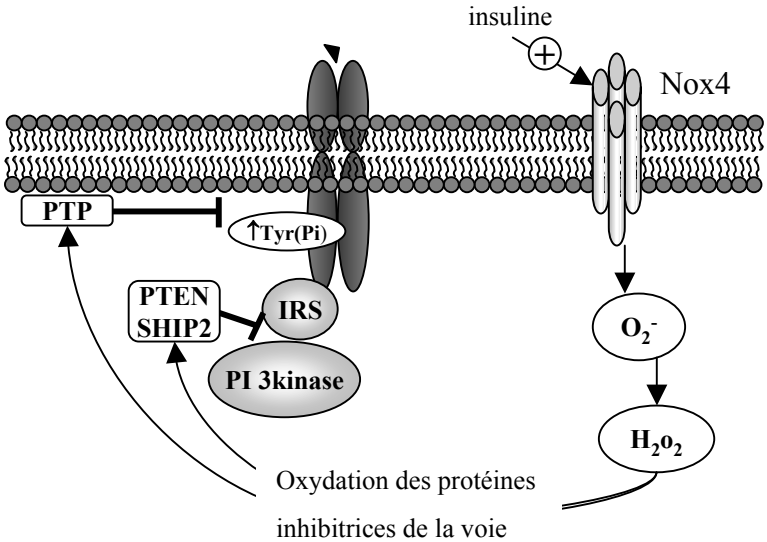
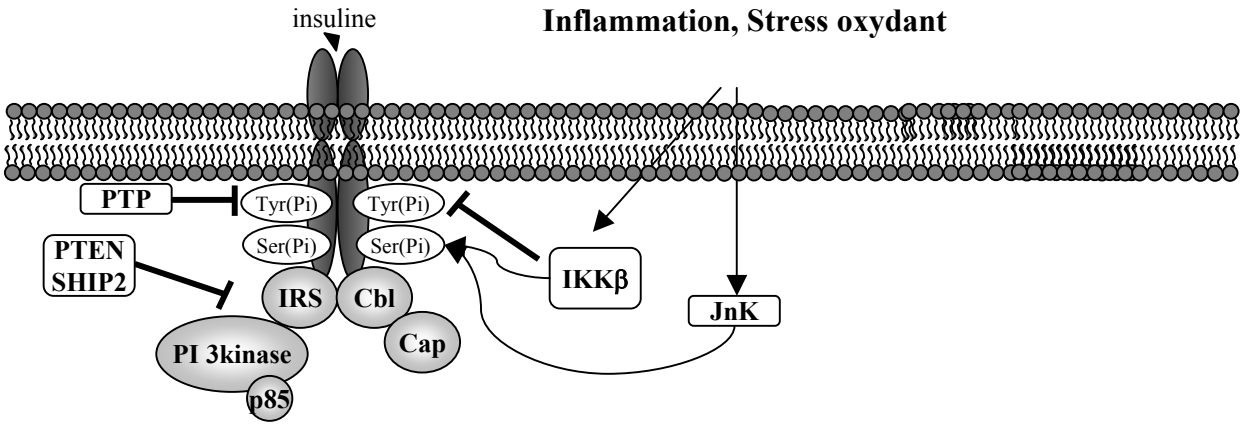


Figure 16: Mécanisme du redox priming. D'après Goldstein et al. (2005).

En réponse à l'insuline, l'activation de l'isoforme 4 de la NADPH oxydase conduit à une production modérée de peroxyde d'hydrogène qui inactive par oxydation des inhibiteurs de la voie de signalisation de l'insuline, favorisant ainsi le déclenchement de la voie.



Signaux inhibiteurs	Effecteurs	Mécanismes de désactivation	Voie de signalisation de l'insuline
Stress oxydant	PTP1B	Déphosphorylation des résidus tyrosine	Tyrosine phosphorylation du récepteur à l'insuline
Hyperglycémie Acides gras libres	PKCδ		
TNKα adipokines	C-JUN kinase	Phosphorylation des résidus sérine	Tyrosine phosphorylation des protéines IRS
Médiateurs inflammatoires	IKKβ		
	SOCS-3	Dégradation des protéines IRS	Activation de la PI 3-kinase
Stress oxydant	PTEN SHIP2	Déphosphorylation de lipides membranaires	

Figure 17 : Mécanismes associés au stress oxydant et contribuant à la désactivation de la voie de transduction de l'insuline. D'après Stumwoll et al.(2005), Shulman et al. (2000) et Gual et al. (2005).

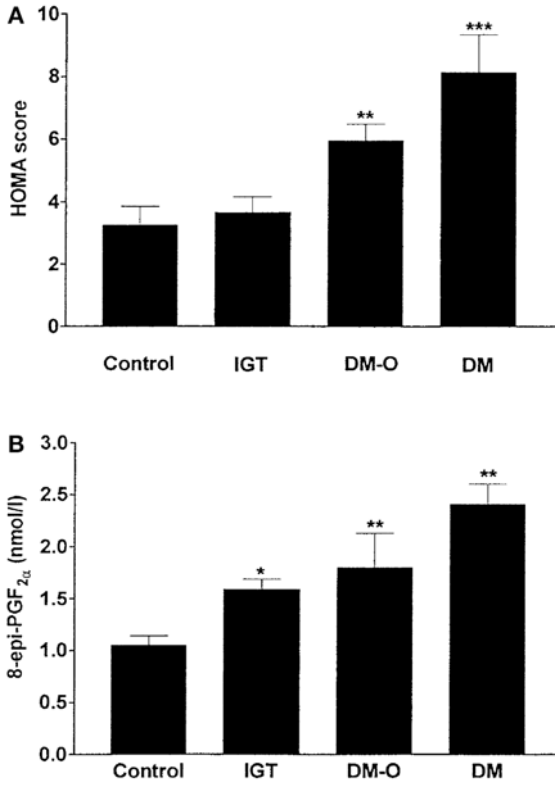


Figure 18 : Chez des sujets insulino-résistants, l'altération du statut redox précède l'insulino-résistance. D'après Gopaul et al. (2001).

Control: sujets sains ; IGT: sujets intolérants au glucose ; DM-O, sujets diabétiques (diagnostic récent) ; DM: sujets diabétiques. A: Homa score, index de sensibilité à l'insuline. B: 8-epi-PGF 2α, marqueur de stress oxydant produit par la peroxydation de l'acide arachidonique par les radicaux libres.

Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SD.

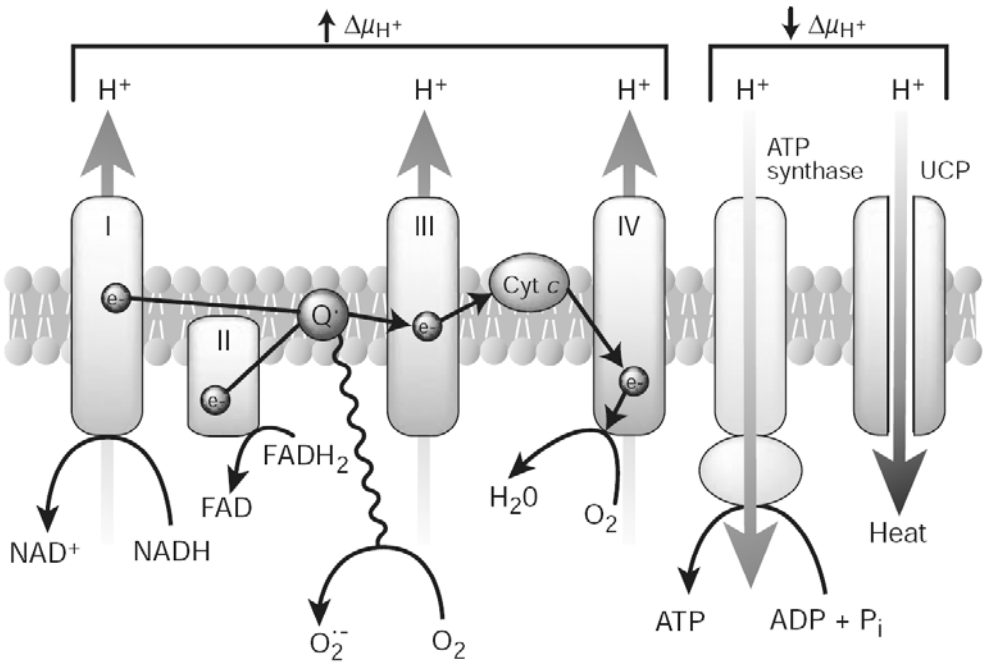


Figure 19 : Mécanisme de production de peroxyde d'hydrogène par la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. D'après Brownlee (2001).

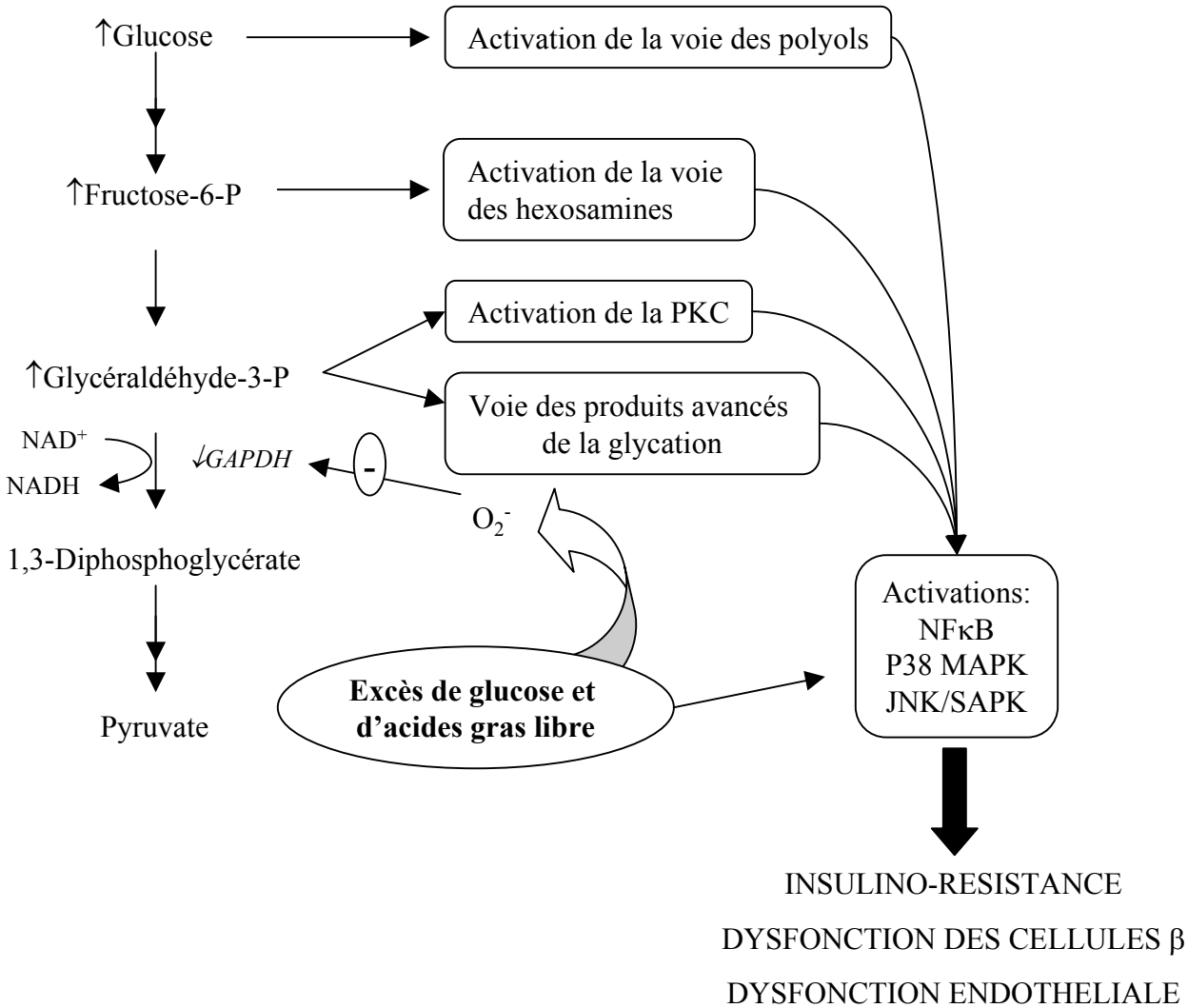


Figure 20 : Mécanismes d'induction de stress oxydant par l'hyperglycémie. D'après Brownlee (2001) et Evans (2001).

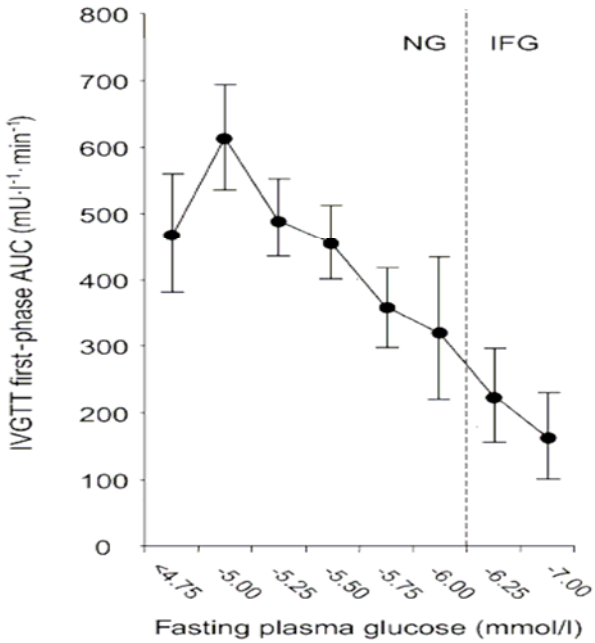


Figure 21 : Aire sous la courbe de la phase précoce de la sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie à jeun lors d'un test intraveineux de tolérance au glucose. D'après Godsland et al. (2004).

NG, glycémie à jeun normale; IFG: glycémie à jeun anormale, au delà du seuil de définition du diabète.

Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SD.

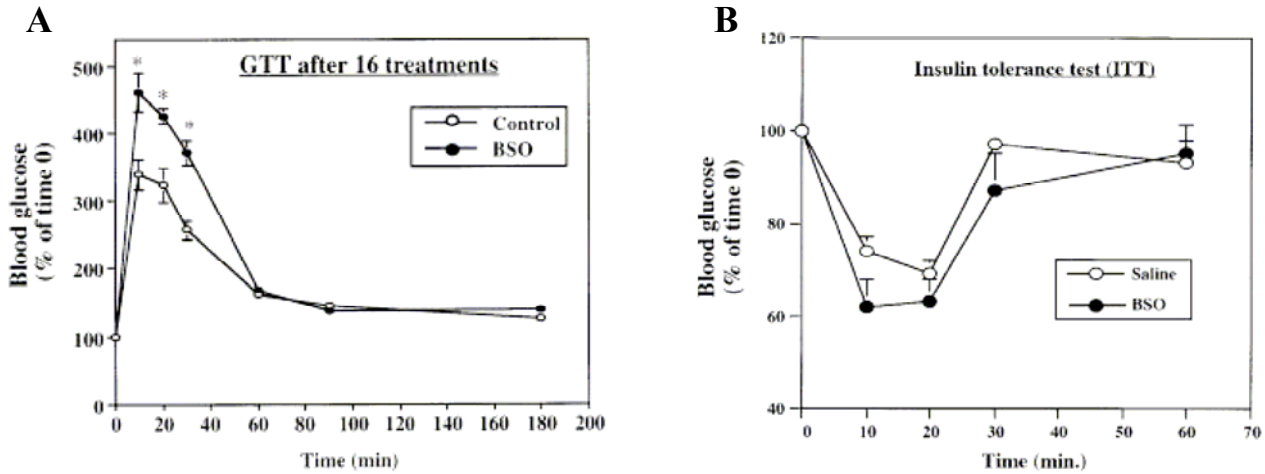


Figure 22 : Tolérance au glucose (A) et sensibilité à l'insuline (B) de rats traités au D, L-buthionine sulfoximine (BSO) pendant 16 jours. D'après Khamaisi et al. (2000).

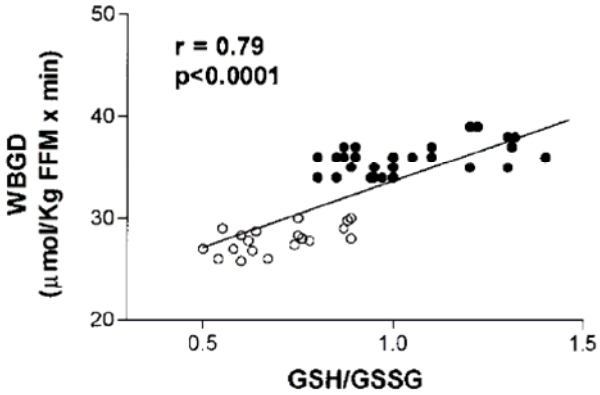


Figure 23 : Corrélation entre l'utilisation du glucose (WBGD) et le ratio glutathion total/glutathion oxydé (GSH/GSSG) chez des sujets sains (•) et hypertendus (°) en réponse à une perfusion de glutathion. D'après Barbagallo et al. (1999).

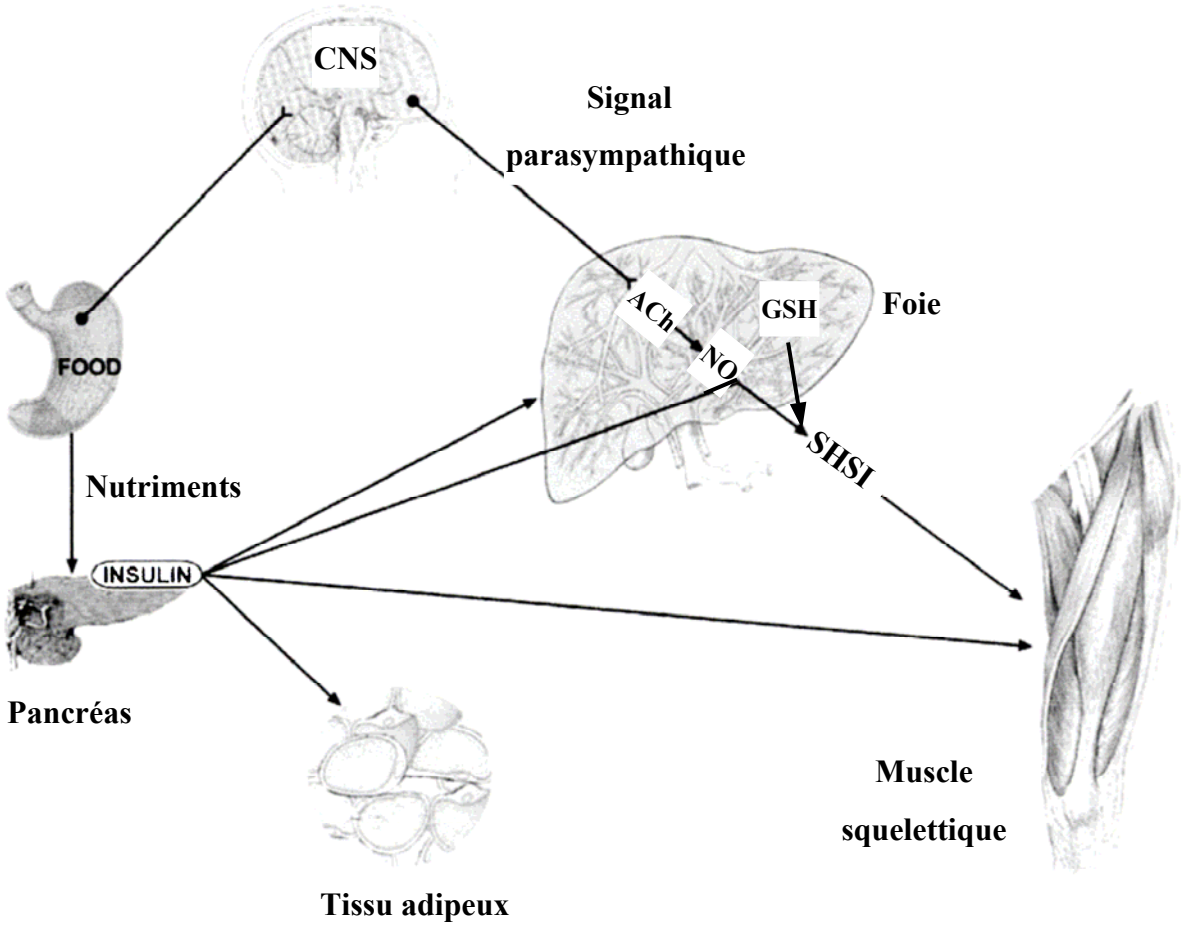
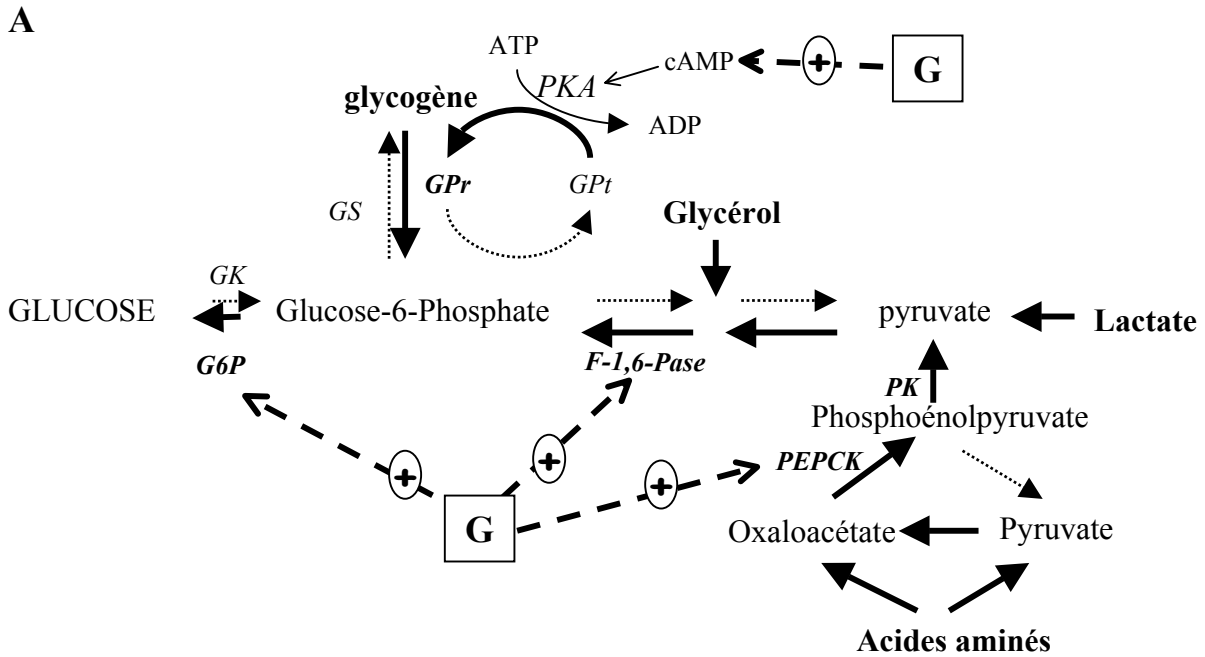


Figure 24 : Activation par l'insuline de la synthèse de la substance hépatique sensibilisant à l'insuline (SHSI) au cours de la période postprandiale. D'après Lautt (2004).

Lors de la période postprandiale, l'insuline initierait un réflexe parasympathique qui permettrait la libération par le foie de la SHSI, faisant intervenir la synthèse hépatique de monoxyde d'azote (NO) et de glutathion (GSH) et sensibilisant les tissus périphériques à l'action de l'insuline



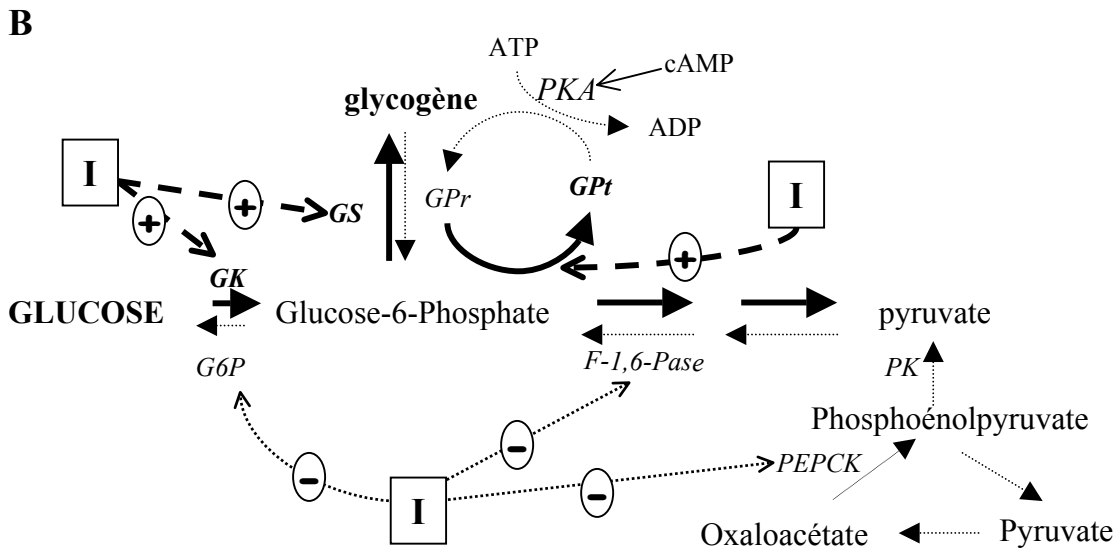


Figure 25 : Régulation hormonale et nutritionnelle de la production endogène de glucose.

D'après Barthel et al. (2003) et Jiang et al. (2003).

A: En période post-absorptive, le glucagon (G) favorise la glycogénolyse, inhibe la synthèse glycogène et active la néoglucogenèse.

B : En période postprandiale, l'insuline (I) favorise la synthèse de glycogène, inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

F-1,6-Pase: fructose-1,6-biphosphatase. G: glucagon. GK: glucokinase. GP: glycogène phosphorylase. GS: glycogène synthase. G6Pase: glucose-6-phosphatase. I: insuline. PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase. PK: pyruvate kinase

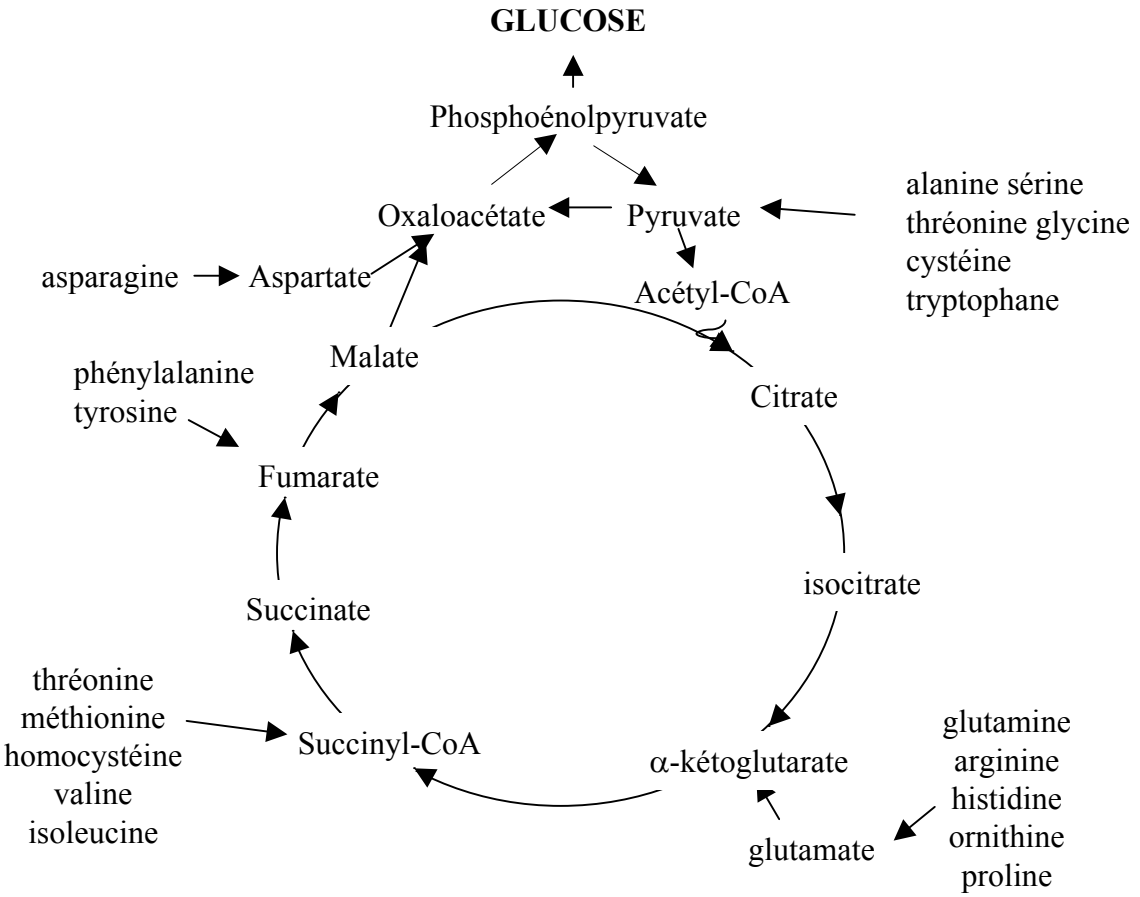


Figure 26 : Catabolisme des acides aminés et néoglucogenèse.

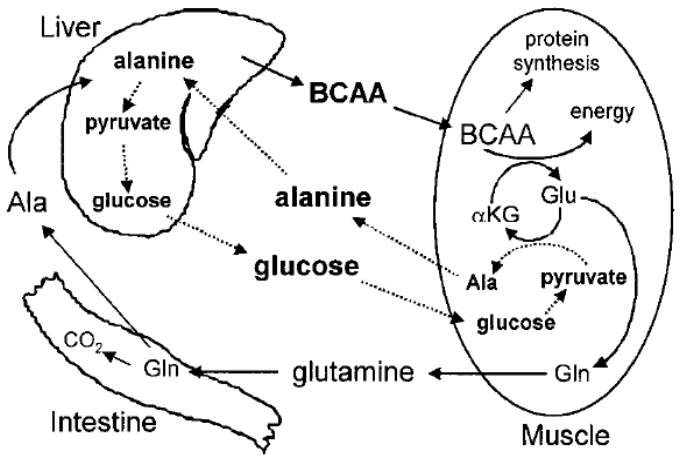


Figure 27 : Représentation du cycle glucose-alanine. D'après Layman (2003).

Il existe un flux continu de BCAA (acides aminés à chaîne latérale ramifiée) de la zone viscérale vers le tissu musculaire, où ils sont transaminés et fournissent un groupement α-aminé utilisé pour la production d'alanine à partir du pyruvate. Un flux parallèle d'alanine du muscle vers le foie alimente la néoglucogenèse hépatique.

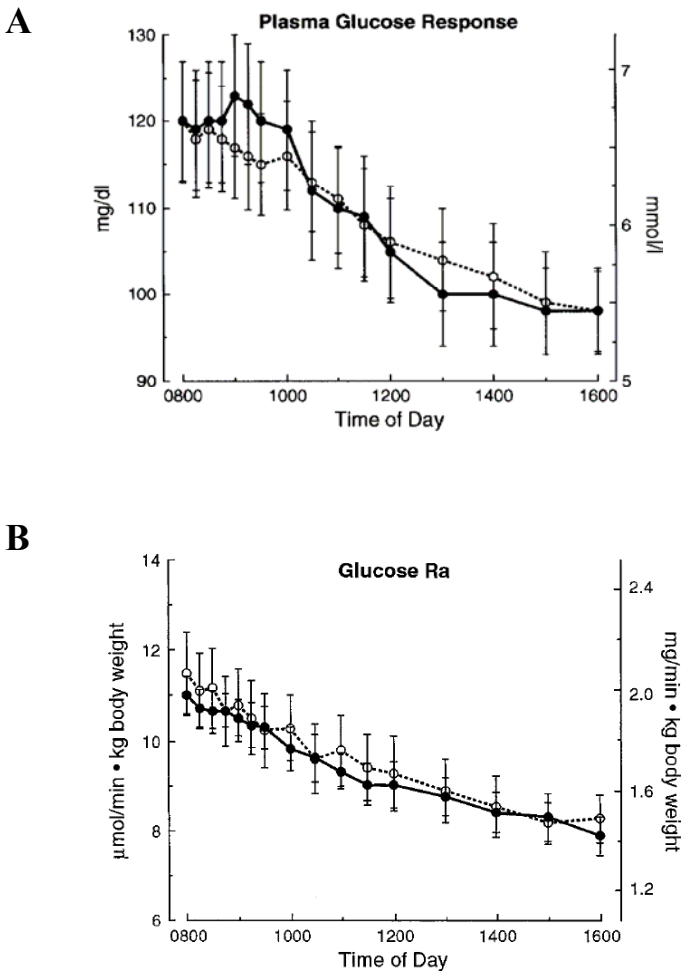


Figure 28 : Concentrations plasmatiques de glucose (A) et vitesse d'apparition du glucose (B) évaluées par dilution isotopique, chez des sujets diabétiques de type 2 en réponse à l'ingestion de 50 g de protéines (cercle rempli) ou de 50 g d'eau (cercle vide). D'après Gannon et al. (2001).

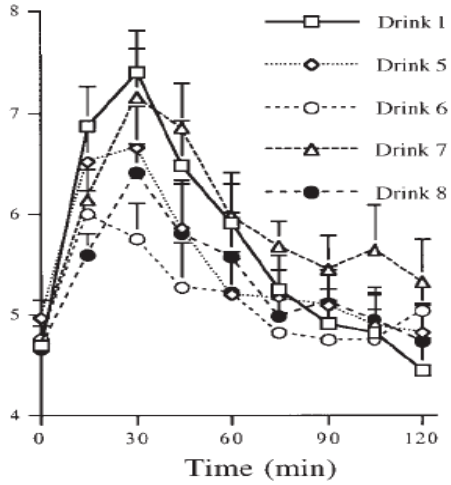


Figure 29 : Effet de la source protéique sur l'insulino-sécrétion postprandiale. D'après Van Loon et al. (2000).

Drink 1 : 57 g/L de glucose ; Drink 5 : 57g/L de glucose et 57 g/L d'un hydrolysat de protéines de lactosérum ; Drink 6 : 57g/L de glucose et 57 g/L d'un hydrolysat de protéines de pois ; Drink 7 : 57g/L de glucose et 57 g/L d'un hydrolysat de protéines de blé ; Drink 8 : 57g/L de glucose et 57 g/L d'un hydrolysat de caséines.

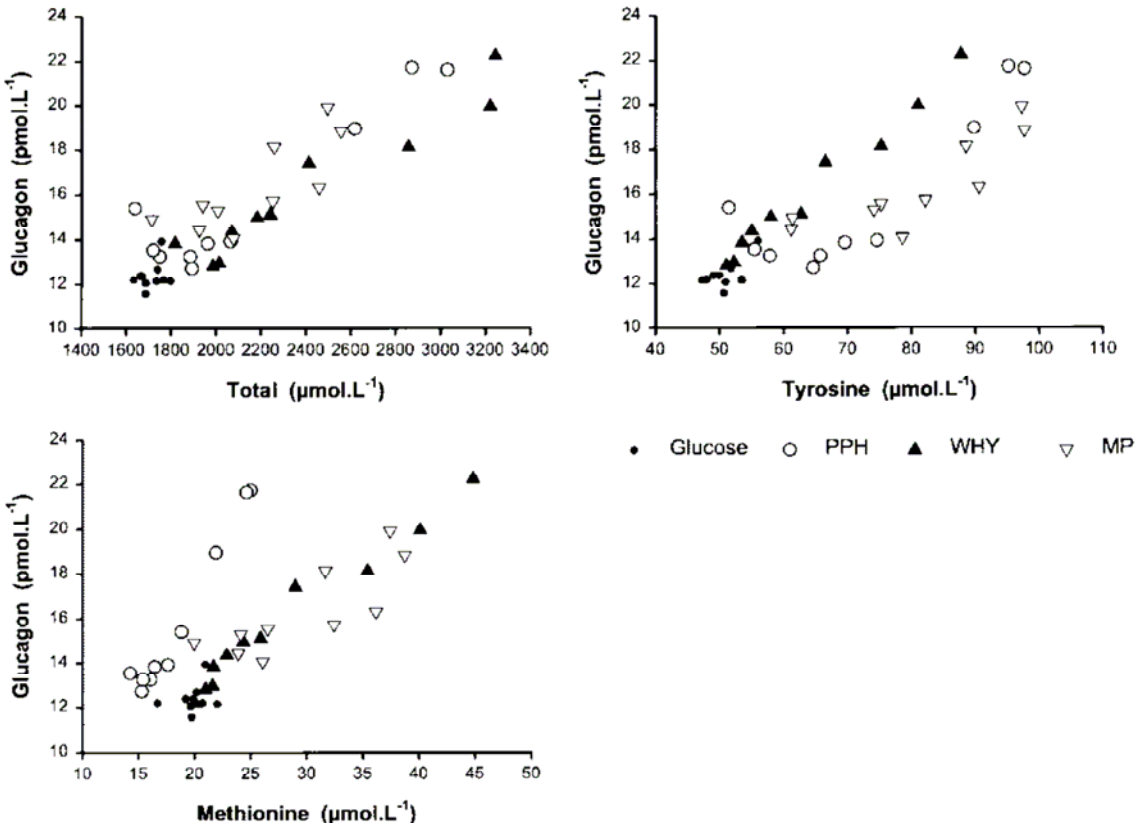


Figure 30 : Corrélations entre la glucagonémie et les concentrations plasmatiques d'acides aminés postprandiales. D'après Calbet et al. (2002).

Glucose : 57 g/L de glucose seul ; PPH : 57g/L de glucose et 57 g/L d'hydrolysat de protéines de pois ; WHY: 57g/L de glucose et 57g/L d'hydrolysat de protéines de lactosérum ; MP : 57g/L de glucose et 57g/L de protéines de lait).

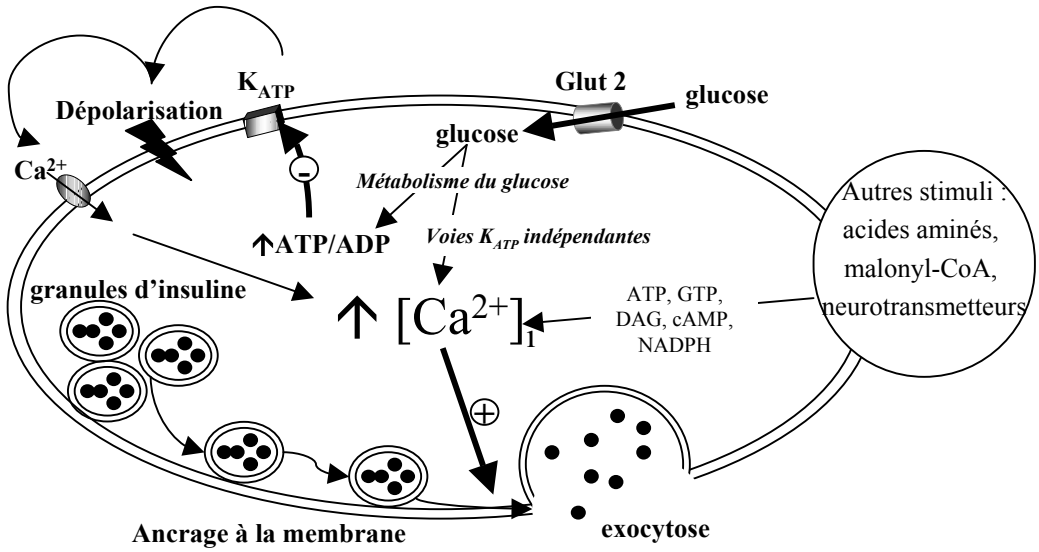


Figure 31: Mécanismes de la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. D'après Ashcroft et al. (2005) et Straub et al. (2004).

La phase précoce de la sécrétion d'insuline est activée par l'augmentation du ratio ATP/ADP induite par le métabolisme du glucose. Cette dernière induit la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants (K_{ATP}), la dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux calciques. L'entrée du calcium dans la cellule amorce la translocation et l'exocytose des granules d'insuline. Par la suite, les variations des concentrations intracellulaires de calcium ($[Ca^{2+}]_i$), modulées par la voie indépendante des K_{ATP}, conditionne le caractère pulsatile de la sécrétion d'insuline. D'autres stimuli, de nature neuro-humorale et nutritionnelle peuvent moduler l'exocytose des granules d'insuline.

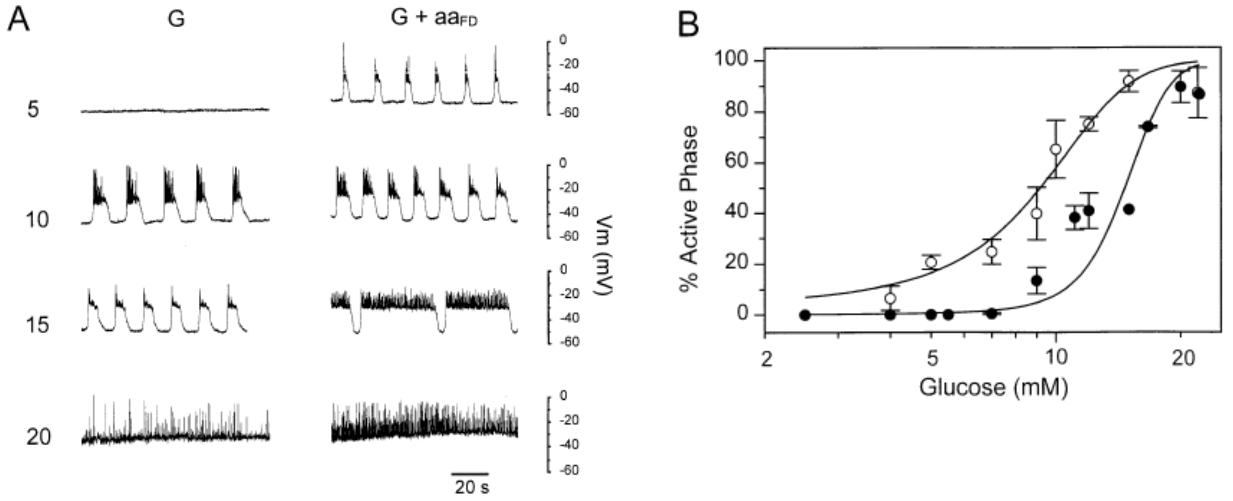


Figure 32: Effet des acides aminés sur l'activité électrique de cellules β en présence de glucose. D'après Bolea et al. (1997).

A. Effet de concentrations croissantes de glucose (5, 10, 15 et 20 mmol/L) sur le potentiel membranaire de cellules β en l'absence (G) ou en présence (G + aa_{FD}) d'acides aminés (concentrations égales à celles mesurées sur un animal à l'état nourri).

B. Courbe dose-réponse de l'activation de la sécrétion d'insuline en fonction des concentrations en glucose du milieu de culture d'îlots pancréatiques isolés en l'absence (●) ou (○) en présence d'acides aminés.

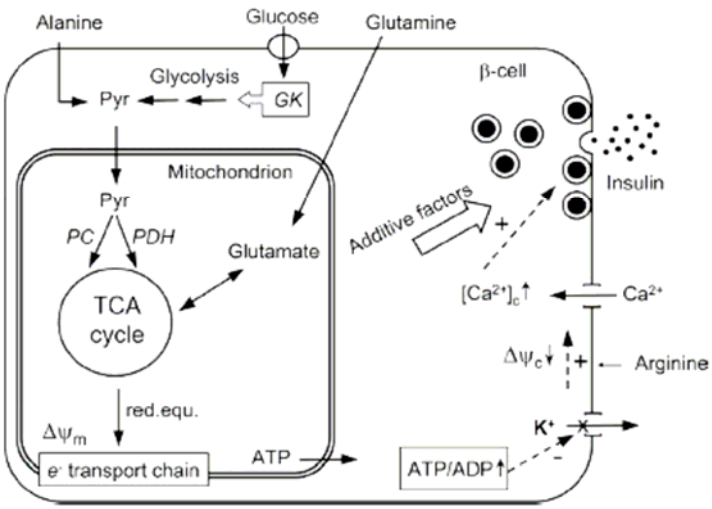
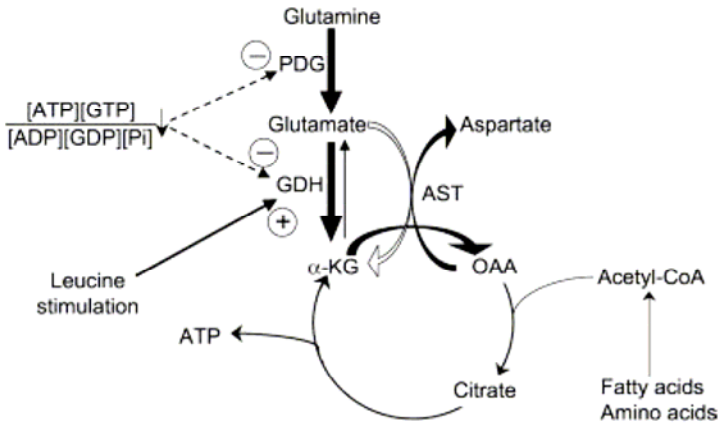


Figure 33: Schéma représentant les mécanismes de la stimulation de la sécrétion d'insuline de la cellule β par les acides aminés et le glucose. D'après Newsholme et al. (2005).

Le métabolisme mitochondrial est activé par certains acides aminés comme l'alanine, la glutamine ou le glutamate. Leur entrée dans le cycle de l'acide tricarboxylique aboutit à une augmentation du ratio ATP/ADP, qui induit la sécrétion d'insuline. L'entrée dans la cellule des acides aminés à chaîne latérale positivement chargée, comme l'arginine, induit une dépolarisation directe qui a pour conséquence une entrée de calcium dans la cellule, cette dernière activant l'exocytose des granules d'insuline.

A. sans glucose



B. avec glucose

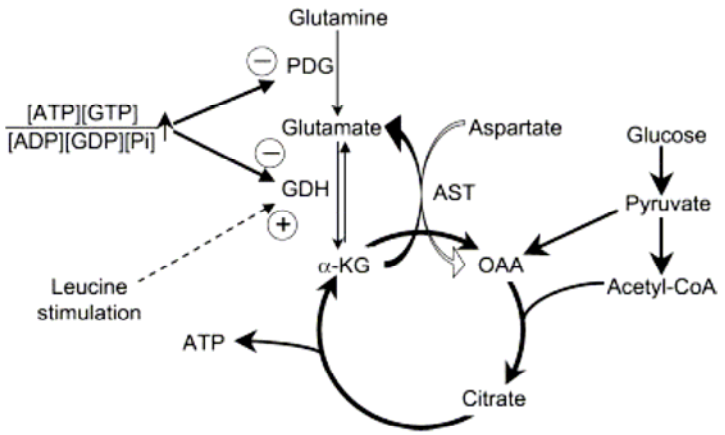


Figure 34 : Influence du statut énergétique de la cellule sur l'activation de la sécrétion d'insuline par la leucine. D'après Li et al. (2002).

A. En l'absence de glucose, le ratio ATP/ADP intracellulaire décroît, induisant la desinhibition de la glutaminase phosphate dépendante (PDG) et de la glutamate déshydrogénase (GDH). Les flux de glutamine et de glutamate vers le cycle de Krebs augmentent, aboutissant à la formation d'ATP.

B. En présence de glucose, l'augmentation du ratio ATP/ADP inhibe la PDG et la GDH, désensibilisant la GDH à la stimulation de la leucine. La lyse de la glutamine est inhibée. Les produits finaux de la glycolyse, le pyruvate et l'acétylcoA favorisent la formation de glutamate par transamination de l'aspartate.

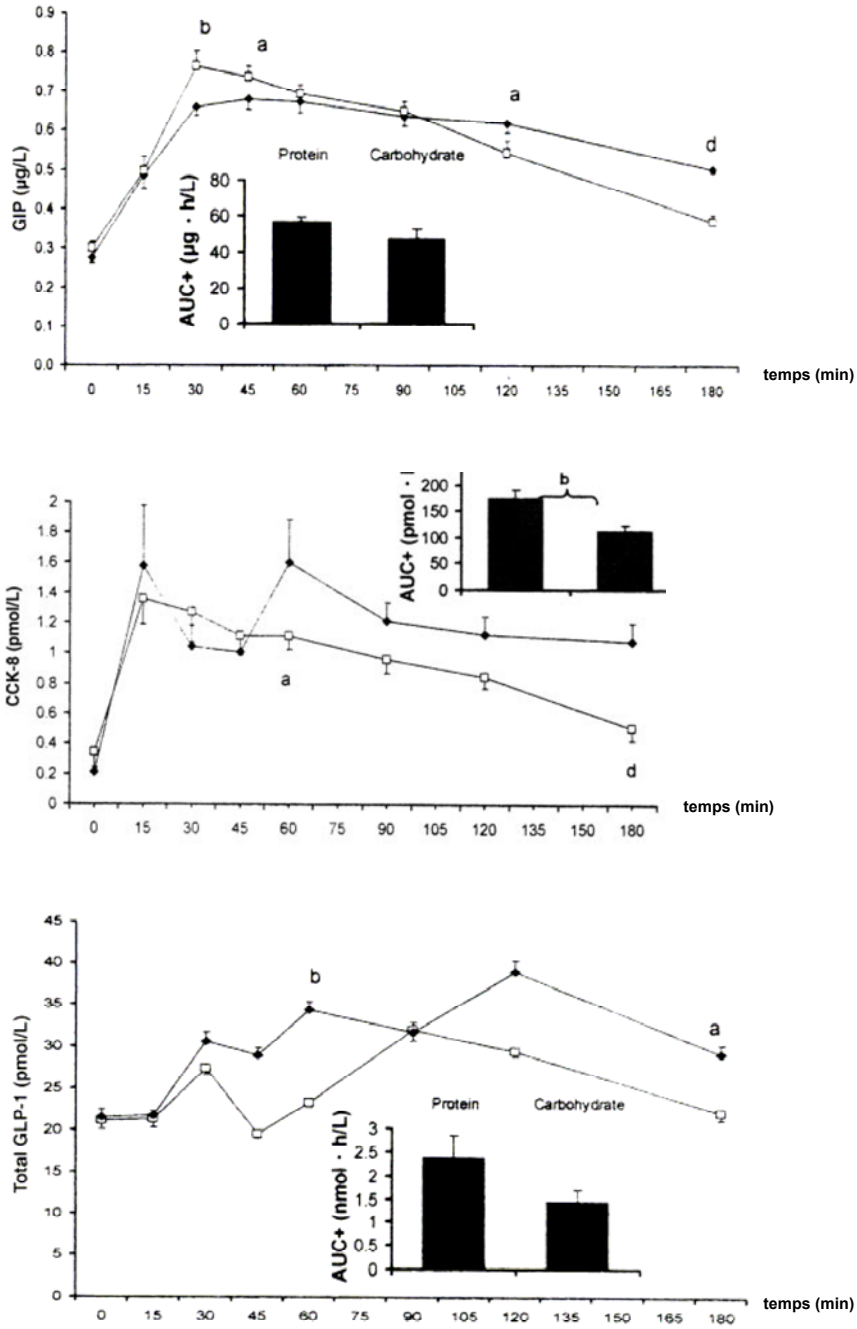


Figure 35 : Concentrations postprandiales de GIP (gastric inhibitory peptide), CCK (cholécystokinine) et de GLP-1 (glucagon like peptide-1) en réponse à l'ingestion d'un repas riche en glucides (carbohydrate) ou riche en protéines (protein). D'après Blom et al. (2006).

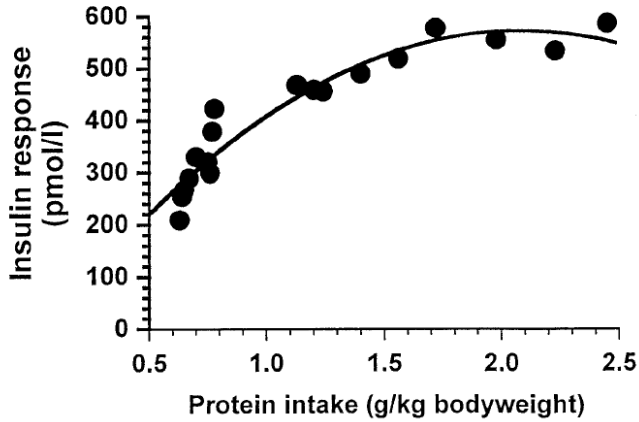


Figure 36: Influence de la teneur en protéines de l'alimentation sur la sécrétion d'insuline en réponse à une charge orale de glucose chez le sujet sain. D'après Linn et al. (2000).

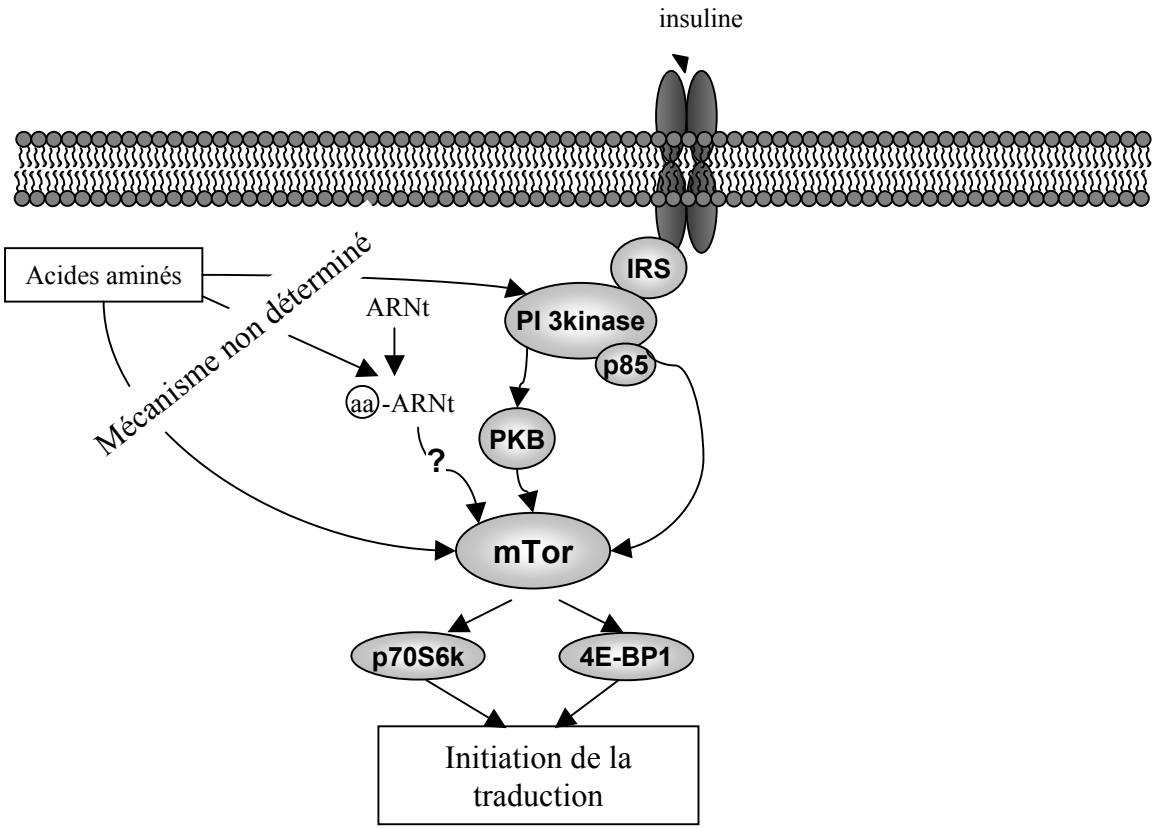


Figure 37: Activation de la voie de signalisation de mTor par l'insuline et les acides aminés. D'après Lynch et al.(2001), Van Sluijtern et al. (2000) et Hinault et al. (2004).

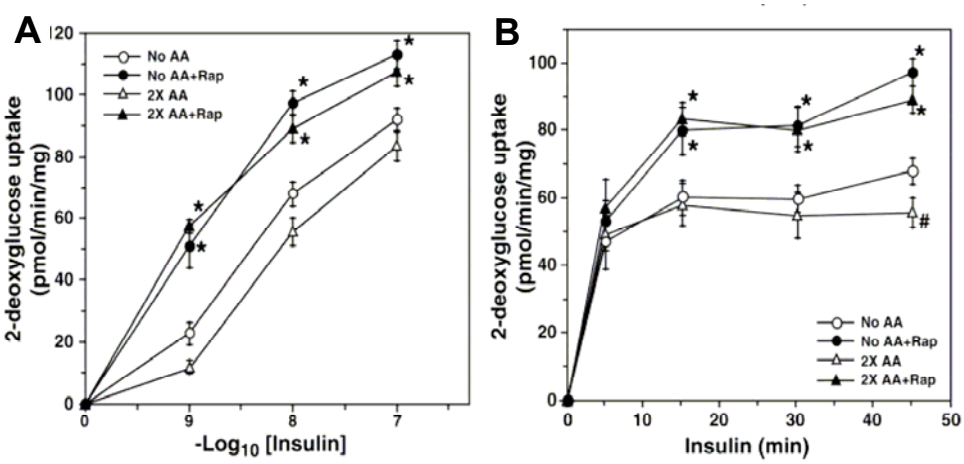


Figure 38: Effet des acides aminés sur le transport de glucose stimulé par l'insuline.

D'après Tremblay et al. (2001).

A : Des lignées adipocytaires 3T3L1 ont été incubées en présence ou non d'acides aminés (AA), d'un inhibiteur de mTOR, la rapamycine (Rap), et d'insuline à différentes concentrations (de 1 à 100 nmol/L) pendant 45 min. En fin d'incubation, la mesure du transport de glucose a été réalisée par la technique du 2DOG.

B : Des lignées adipocytaires 3T3L1 ont été incubées en présence d'insuline à 10 nmol/L plus ou moins des acides aminés et de la rapamycine pendant un temps croissant. En fin d'incubation, la mesure du transport de glucose a été réalisée par la technique du 2DOG.

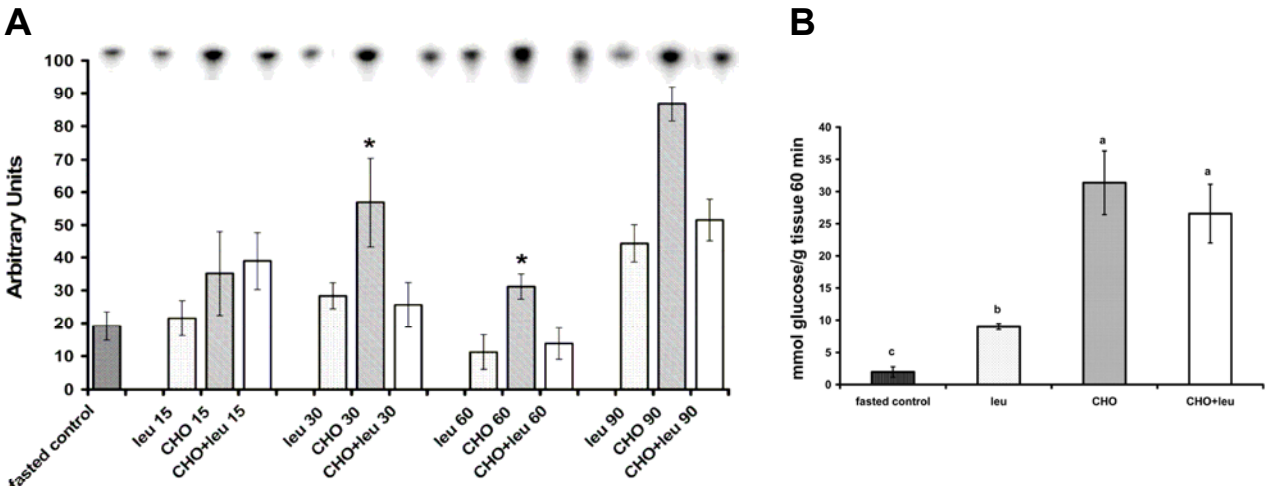


Figure 39: Effet de l'administration de leucine par voie orale sur l'activation de la voie de signalisation de l'insuline et le transport de glucose chez le rat. D'après Baum et al. (2005).

A: Activité de la PI-3-kinase dans le muscle squelettique pendant les 90 min suivant l'administration de 0,27 g de leucine seule (leu), d'un mélange de 2,63 g de glucose et de saccharose (CHO) ou de leucine plus glucose (CHO+leu).

B: Captation de glucose du tissu musculaire squelettique, mesurée pendant 1 heure en réponse à l'administration par voie orale des différents traitements.

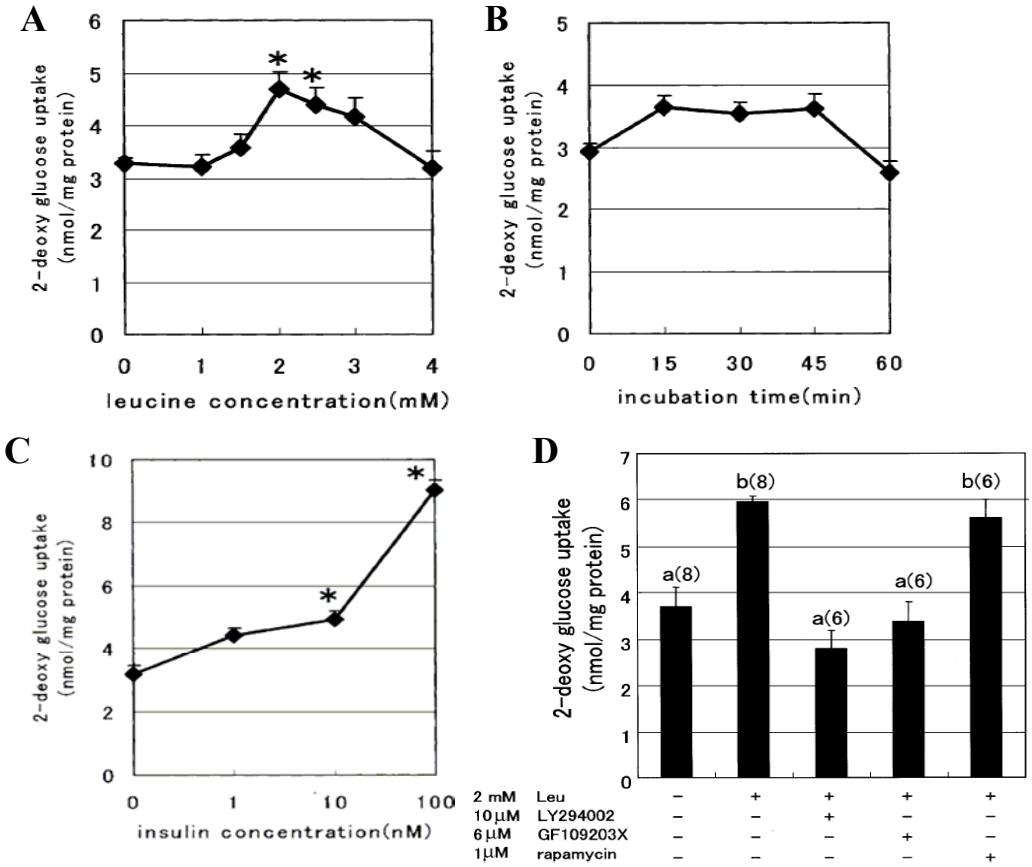


Figure 40: Effet de la leucine et de l'insuline sur la captation de glucose sur muscle isolé. D'après Nishitani et al. (2002).

A : Effet de la concentration en leucine du milieu d'incubation sur le transport de glucose en l'absence d'insuline. Le temps de stimulation à la leucine est de 30 min.

B : Effet du temps d'incubation avec de la leucine à 2 mmol/L sur le transport de glucose.

C : Effet de la concentration en insuline du milieu d'incubation sur le transport de glucose. Le temps de stimulation à la leucine 2mM est de 30 min.

D : Effet d'inhibiteurs de la PI-3-kinase (LY294002), de la PKC (GF109203X) et de mTor (rapamycine) sur l'activation du transport de glucose par la leucine.

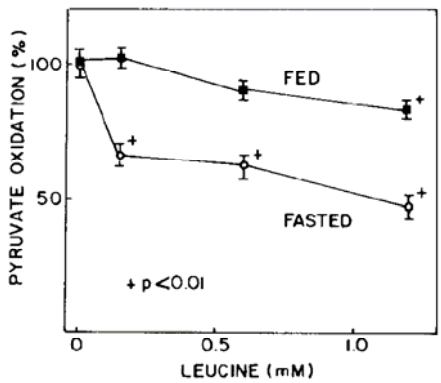


Figure 41: Effet *in vitro* de la leucine sur l'oxydation du pyruvate sur diaphragme de rat isolé. D'après Chang et al. (1977).

Les tissus ont été prélevés sur des rats à jeun (fasted) ou à l'état nourri (fed), incubés en présence de [1-^{14}C]pyruvate et en présence de glucose (5 mmol/L).

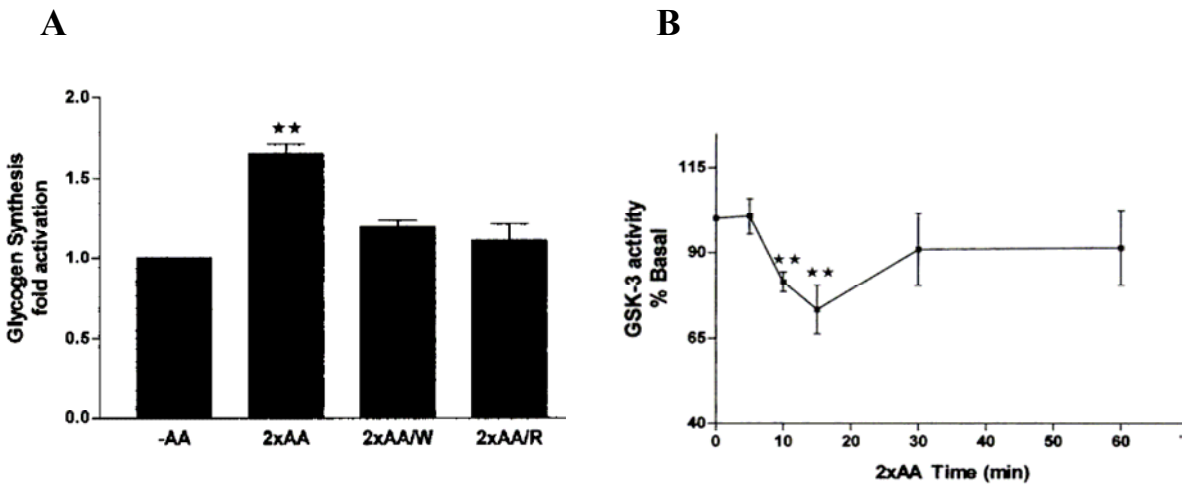


Figure 42: Activation de la synthèse de glycogène musculaire par les acides aminés.

D'après Armstrong et al. (2001).

A. Effet des acides aminés sur la synthèse de glycogène dans des cultures de myoblastes. W: wortmannine, inhibiteur de la PI-3-kinase; R: rapamycine, inhibiteur de mTor.

B. Effet des acides aminés sur l'activité de la glycogène synthase kinase 3, enzyme inhibitrice de la glycogène synthase.

Tableau 3 : Effet d'un apport supplémentaire en arginine sur la régulation de la glycémie et la fonction endothéliale chez des sujets diabétiques de type 2. D'après Piatti et al. (2001).

	Group 1			Group 2			
	Placebo 1st month	Placebo 2nd month	Difference*	Placebo 1st month	L-Arginine 2nd month	Difference*	Normal subjects
Basic							
Plasma glucose (mmol/l)	7.3 ± 0.1	7.3 ± 0.2	–0.03 ± 0.15	7.0 ± 0.3	6.4 ± 0.4	–0.52 ± 0.24	5.0 ± 0.2†
Endogenous glucose production (μmol·kg^{-1}·min^{-1})	17.8 ± 1.3	17.8 ± 1.4	+0.2 ± 0.6	18.0 ± 1.3	16.4 ± 0.9	–1.7 ± 0.8	11.3 ± 1.3†
cGMP (nmol/l)	2.43 ± 0.27	2.44 ± 0.25	+0.01 ± 0.07	2.76 ± 0.35	4.43 ± 0.54‡	+1.67 ± 0.52§	4.93 ± 0.33†
Forearm blood flow (ml·100 ml forearm^{-1}·min^{-1})	2.03 ± 0.26	2.11 ± 0.23	+0.09 ± 0.07	2.19 ± 0.26	3.01 ± 0.22‡	+0.82 ± 0.18‖	2.87 ± 0.24
Peripheral vascular resistance (UI)	46.0 ± 4.9	43.3 ± 5.2	–2.7 ± 3.6	43.0 ± 3.9	27.6 ± 1.9‡	–15.3 ± 3.0‖	31.4 ± 2.8
Euglycemic clamp							
Steady-state plasma glucose	5.7 ± 0.2	5.7 ± 0.3	+0.08 ± 0.04	5.4 ± 0.1	5.2 ± 0.2	–0.30 ± 0.12	5.0 ± 0.1†
Endogenous glucose production (μmol·kg^{-1}·min^{-1})	6.22 ± 1.16	6.77 ± 0.61	+0.50 ± 1.93	6.11 ± 0.33	4.29 ± 0.39‡	–2.09 ± 0.61‖	4.96 ± 0.18†
M value (μmol·kg^{-1}·min^{-1})	11.3 ± 2.0	11.7 ± 1.6	+0.39 ± 1.10	11.3 ± 1.1	15.1 ± 1.3‡	+3.96 ± 0.77‖	24.2 ± 0.7†
Forearm blood flow (ml·100 ml forearm^{-1}·min^{-1})	2.46 ± 0.26	2.36 ± 0.24	–0.10 ± 0.35	2.80 ± 0.28	3.32 ± 0.24	+0.52 ± 0.11	3.10 ± 0.29
Peripheral vascular resistance (UI)	37.1 ± 3.4	37.7 ± 3.8	+1.19 ± 5.28	32.4 ± 3.5	29.6 ± 5.3	–2.68 ± 3.89	28.3 ± 2.5

Les sujets ont reçu pendant 3g d'arginine 3 fois par jour pendant 1 mois.
M value: débit de glucose perfusé pendant le clamp euglycémique hyperinsulinémique.
†$P < 0.01$ vs. groups 1 and 2; ‡$P < 0.05$ vs. placebo 1 month; §$P < 0.001$ vs. group 1; \$P < 0.05$ vs. group 1.

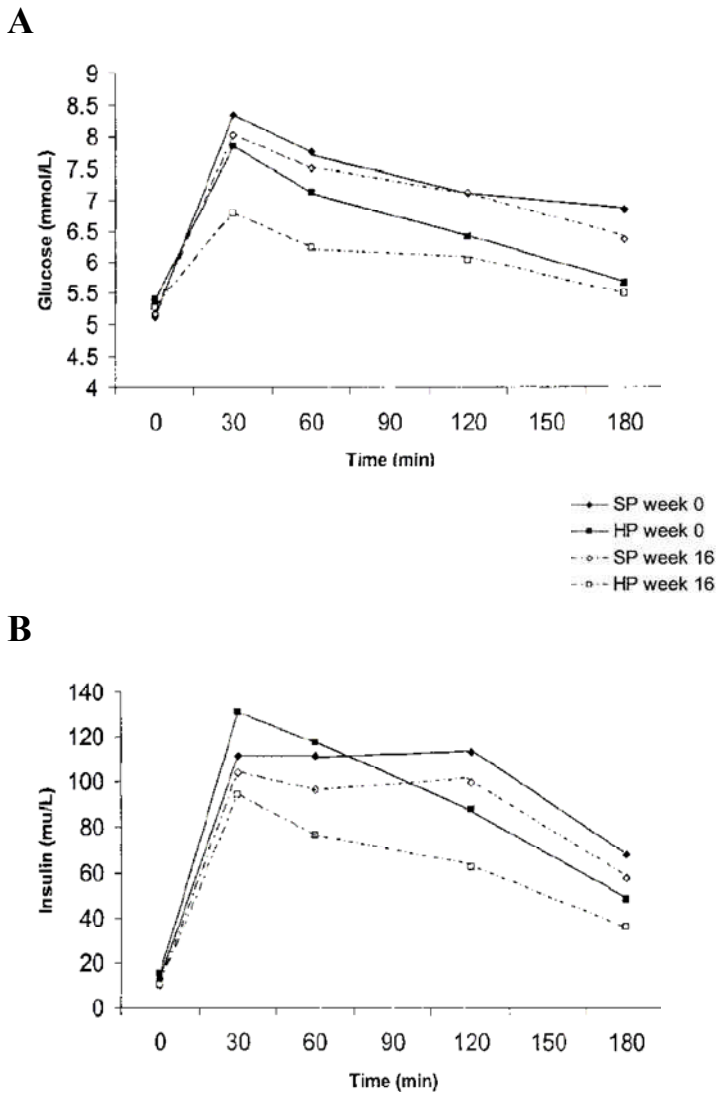


Figure 43: Concentrations plasmatiques en glucose (A) et en insuline (B) lors d'un test de tolérance orale au glucose chez des sujets obèses insulino-résistants suite à 16 semaines de consommation d'un régime normoprotéique (SP) ou hyperprotéique (HP).

D'après Farnsworth et al. (2003).

Lors des 12 premières semaines, l'apport énergétique était restreint à 6 MJ/jour, puis élevé à 8,2 MJ/jour pendant les 4 semaines suivantes.

Tableau 4 : Effet quantitatif et qualitatif de l'apport protéique sur l'insulino-sensibilité chez des rats rendus insulino-résistants par la consommation d'un régime hyperlipidique.

D'après Belobrajdic et al. (2004).

		Red meat		Whey protein		ANOVA		
Variable	Baseline	8%	32%	8%	32%	Type	Density	T × D
Insulin, *pmol/L*	156 ± 46	208 ± 39	222 ± 36	169 ± 39	92 ± 36	0.03	NS	NS
Glucose, *mmol/L*	7.1 ± 0.2	6.9 ± 0.5	7.4 ± 0.4	7.3 ± 0.5	7.3 ± 0.4	NS	NS	NS
Insulin:glucose	3.0 ± 0.8	4.3 ± 0.9[a]	4.2 ± 0.9[a]	3.3 ± 0.9[ab]	1.7 ± 0.9[b]	0.019	NS	0.047

[1] Values are means ± SEM, $n = 8$. Means in a row with superscripts without a common letter differ, $P < 0.05$.
[2] Not significant, $P > 0.05$.

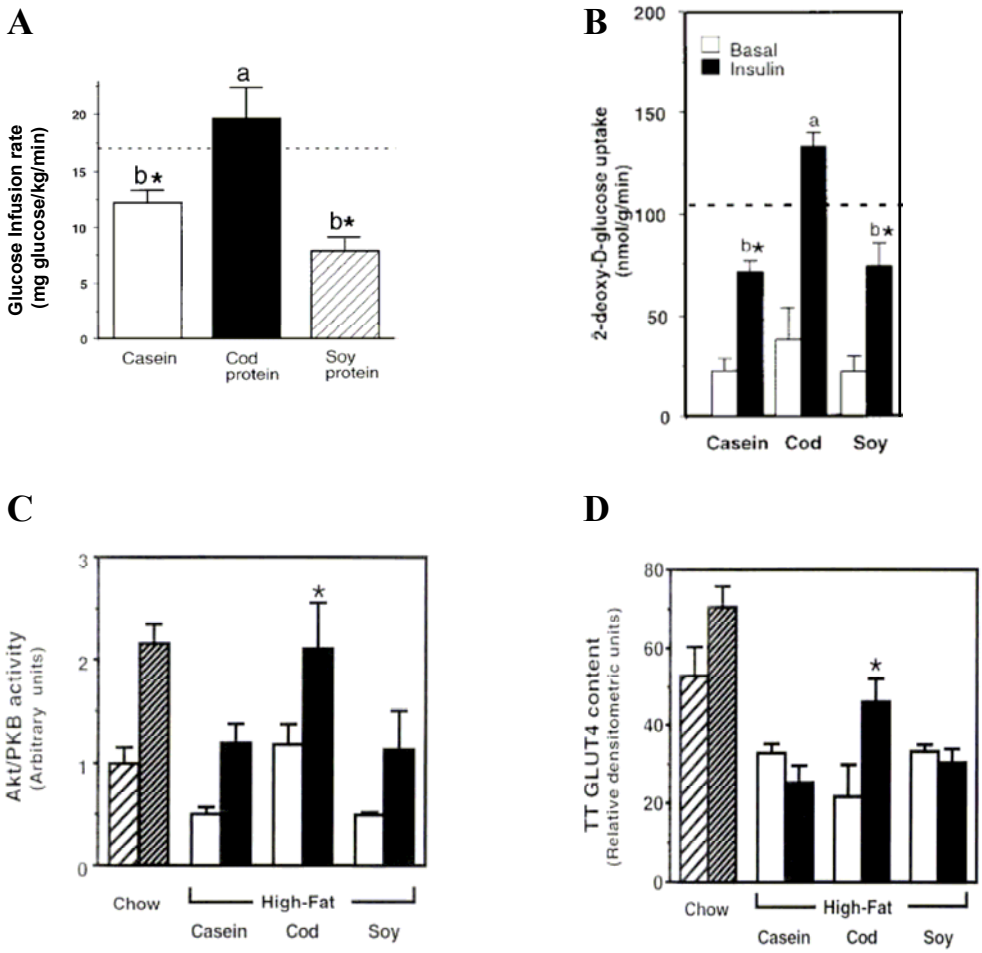


Figure 44 : Effet de la source protéique sur la régulation de la glycémie chez le rat.

D'après Lavigne et al. (2001) et Tremblay et al. (2003).

Les rats ont reçu un régime standard (chow) ou un régime hyperlipidique (high-fat) où 22% de l'énergie est fournie sous forme de protéines de lait (casein), de morue (cod) ou de soja (soy) pendant 4 semaines.

A: Insulino-sensibilité périphérique, évaluée par le débit de glucose perfusé lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique. B: Transport de glucose mesuré in vivo sur du tissu musculaire en condition hyperinsulinémique. C: Activation de la protéine PKB en réponse à une stimulation à l'insuline dans le muscle squelettique. D: Translocation de Glut 4 dans le muscle squelettique.

Tableau 5 : Composition des régimes expérimentaux NP, HP et HPL (g/kg d'aliment).

REGIME	NP	HP	HPL
Protéines	140	530	530 dont 370 d'α-lactalbumine
Saccharose	100,3	46,5	46,5
Amidon de maïs	622,4	286,2	286,2
Composé vitaminique AIN 93 VX	10	10	10
Composé minéral AIN 93M	35	35	35
Huile de soja	40	40	40
Cellulose	50	50	50
Bitartrate de choline	2,3	2,3	2,3
Energie métabolisable ($kJ.g^{-1}$)	14,6	14,6	14,6

Tableau 6: Concentrations hépatiques en glutathion, activité et expression hépatique de la γ-glutamylcystéine synthase et concentrations plasmatiques et hépatiques des protéines carbonylées chez les rats NP, HP et NPr.

	NP	**PF**	**HP**	**Effet Apport énergétique**	**Effet Apport protéique**
GSH (µmol/L)	4890 ± 1083	4454 ± 899	4284 ± 1089	NS	NS
GSSG (µmol/L)	175 ± 56	192 ± 58	175 ± 69	NS	NS
GSSG/GSH (%)	3,5 ± 0,8	4,3 ± 1,0	3,9 ± 1,1	NS	NS
Activité GCL (mol GC.min^{-1}.mg^{-1} de prot)	1140 ± 545	ND	821 ± 76	NS	NS
GCLc (UA)	11.3^{a} ± 0.4	10.9^{a} ± 0.4	8.1^{b} ± 0.8	P<0.1	P<0.001
GCLr (UA)	51.6 ± 2.0	42.6 ± 6.1	56.5 ± 6.0	NS	NS
PC plasmatiques (nmol.mg^{-1} de prot)	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	NS	NS
PC hépatiques (nmol.mg^{-1} de prot)	6.8 ± 5.4	7.2 ± 2.7	4.8 ± 2.1	NS	NS

GSH, glutathion total ; GSSG, glutathion oxydé ; GCLc, sous-unité catalytique de la γ-glutamylcystéine synthase ; GCLr, sous-unité régulatrice de la γ-glutamylcystéine synthase.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=5 à 8 par groupe. Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes (comparaisons obtenues à l'aide de contrastes, dans le modèle mixte).

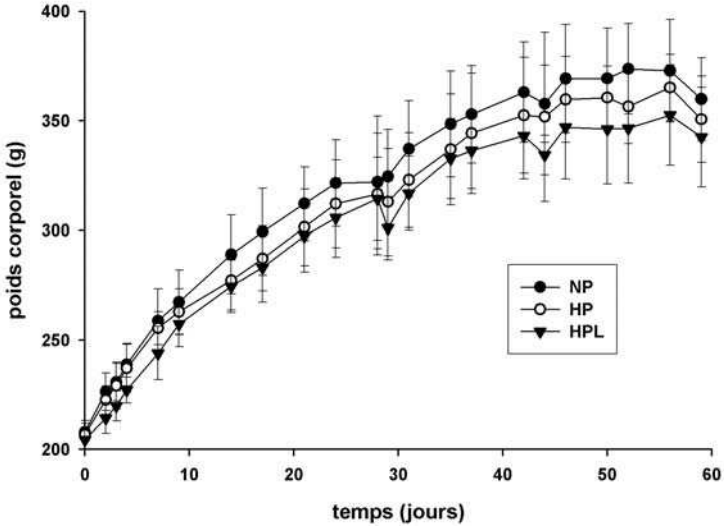


Figure 45 : Croissance pondérale de rats nourris ad libitum pendant 8 semaines avec les régimes NP, HP et HPL.

La croissance des rats HPL et du groupe HP+HPL est significativement inférieure à celle des rats NP. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=8 par groupe.

Tableau 7 : Composition corporelle moyenne après 8 semaines de consommation ad libitum des régimes NP, HP et HPL.

Poids (g)	NP	HP	HPL	Effet régime♣
Poids vif	359,9±18,9[a]	346,7±20,8[ab]	330,0±17,4[b]	P < 0,05
Foie	10,6±1,4[a]	9,9±0,8[a]	10,2±0,9[a]	NS
TA épidydimaire	8,6±1,4[a]	7,6±1,4[ab]	6,2±1,0[b]	P < 0,05
TA périrénal	11,0±3,2[a]	8,2±1,2[b]	5,5±0,8[c]	P < 0,0001
TA sous-cutané	9,3±2,4[a]	7,9±1,7[ab]	6,2±0,7[b]	P < 0,05
TA blanc total	28,9±6,6[a]	23,7±3,4[a]	17,8±1,7[b]	P < 0,05
TA brun	0,8±0,1[a]	0,7±0,2[ab]	0,5±0,1[b]	P < 0,05
Carcasse	161,4±6,9[a]	159,9±8,9[a]	152,5±9,7[a]	NS

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type de n=8 rats par groupe.

TA : tissu adipeux ; ♣ Estimé par un test de F de Fisher, obtenu à l'aide d'un modèle mixte

Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes (comparaisons obtenues à l'aide de contrastes, dans le modèle mixte).

Tableau 8: Concentrations plasmatiques en acides aminés à jeun et à l'état nourri chez des rats ayant reçu pendant 8 semaines les régimes NP, HP et HPL ad libitum.

	nourri			**à jeun**		
µmoles/l	**NP**	**HP**	**HPL**	**NP**	**HP**	**HPL**
Aspartate	334±139[a]	53±27[a]	51±21[a]			
Thréonine	854±390[a]	789±431[a]	835±332[a]	448±165[c]	223±31[c]	265±35[c]
Sérine	547±211[a]	586±329[a]	474±190[a]	310±70[c]	278±33[c]	317±38[ac]
Asparagine	110±34[a]	230±102[b]	111±25[a]	56±13[c]	64±9[c]	74±11[a c]
Glutamate	244±70[a]	210±85[a]	289±81[a]	173±59[c]	109±37[c]	131±30[ac]
Glutamine	803±494[a]	812±607[a]	599±327[a]	757±167[a]	709±49[a]	877±120[a]
Glycine	587±246[a]	345±124[b]	397±80[b]	466±166[c]	283±29[d]	401±29[cd]
Alanine	1640±577[a]	1737±1029[a]	1592±557[a]	608±249[c]	517±86[c]	576±88[c]
Citrulline	404±144[a]	357±196[a]	326±58[a]	323±53[ac]	162±26[d]	230±61[a cd]
Valine	451±122[a]	1123±692[b]	972±355[b]	255±24[ac]	255±39[c]	285±57[c]
Cystine	69±18[a]	94±19[a]	130±40[b]	48±11[ac]	55±5[c]	52±13[c]
Methionine	145±40[a]	283±132[b]	133±33[a]	71±13[c]	73±11[c]	89±18[c]
Isoleucine	194±46[a]	426±222[b]	450±147[b]	115±8[ac]	109±15[c]	129±27[c]
Leucine	379±117[a]	927±574[b]	922±330[b]	184±9[ac]	200±31[c]	218±38[c]
Tyrosine	239±80[a]	490±226[b]	401±112[b]	109±28[c]	115±40[c]	118±21[c]
Phénylalanine	159±49[a]	245±84[b]	195±45[ab]	91±19[c]	84±8[c]	97±20[c]
Ornithine	107±35[a]	136±60[a]	85±55[a]	67±8[c]	42±8[c]	56±10[c]
Lysine	1107±415[a]	1667±922[a]	1590±437[a]	612±145[ac]	592±114[c]	665±110[c]
Histidine	158±53[a]	201±61[a]	162±34[a]	86±16[c]	89±13[c]	94±13[c]
Arginine	206±68[a]	454±199[b]	316±107[ab]	186±52[a c]	188±47[c]	201±14[c]
Proline	405±42[a]	455±225[a]	180±57[b]	149±34[c]	110±27[bc]	128±13[c]
AAR	1028 ±283[a]	2476±1486[b]	2345±829[b]	555±38[a c]	565±83[c]	633±118[c]
IAA	3460±1013[a]	5580±2943[b]	5095±1472[b]	1939±394[ac]	1721±156[c]	1997±192[c]

Les dosages ont été réalisés à partir d'échantillons de sang prélevés par l'intermédiaire d'un cathéter positionné dans la veine cave et les données à l'état nourri ont été obtenues à partir d'échantillons prélevés aléatoirement au cours de la période postprandiale.

AAR: acides aminés à chaîne latérale ramifiée; IAA: acides aminés indispensables.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=5 ou 7 par groupe. Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes (comparaisons obtenues à l'aide de contrastes, dans le modèle mixte).

Tableau 9 : Concentrations plasmatiques en acides aminés au cours de la période postprandiale (t=0: début de l'ingestion d'un repas calibré) chez des rats ayant reçu pendant 4 semaines les régimes HS_0, HS_1, HS_2 et HSa.

	Temps (min)	Tau	Asp	Threo	Ser	Aspar	Glut	Gln	Cys	Gly	Ala	Cit	Val
HS_1	0	94 ± 17	48 ± 16	266 ± 82 [a]	208 ± 65 [a]	29 ± 10	116 ± 29	332 ± 52	343 ± 72	216 ± 61	346 ± 68	57 ±13	141 ± 33
HS_1	45	90 ± 14	35 ± 9	235 ± 57 [b]	172 ± 41[b]	23 ± 7	100 ± 40	315 ± 20	342 ± 46	168 ± 49	430 ± 104	52 ± 13	121 ± 22
HS_1	135	78 ± 20	38 ± 4	229 ± 57 [b]	181 ± 42 [ab]	38 ± 8	100 ± 34	330 ± 64	317 ± 59	181 ± 44	456 ± 76	57 ± 17	135± 28
HS_2	0	114 ± 7	56 ± 10	315 ± 47	223 ± 25	25 ± 13	103 ± 28	362 ± 69	323 ± 64 [a]	276 ± 61	347 ± 13	60 ± 7	155 ± 12
HS_2	45	120 ± 40	37 ± 8	280 ± 57	187 ± 37	26 ± 11	81 ± 23	373 ± 93	402 ± 90 [b]	197 ± 46	437 ± 71	56 ± 8	128 ± 36
HS_2	135	100 ± 16	48 ±7	278 ± 53	184 ± 23	28 ± 9	93 ± 23	331 ± 73	336 ± 39 [ab]	214 ± 33	436± 70	59 ± 10	132 ± 27
HS_0	0	68 ± 13	64 ± 19	375 ± 38 [a]	228 ± 26 [a]	36 ± 10	130 ± 12	424 ± 84	366 ± 21 [a]	238 ± 46	383 ± 53	72 ± 13	183 ± 27 [a]
HS_0	45	63 ± 17	44 ± 15	310 ± 66 [b]	188 ± 48 [b]	42 ± 10	121 ± 55	355 ± 90	328 ± 72 [ab]	155 ± 51	429 ± 87	55 ± 6	150 ± 30 [b]
HS_0	135	46 ± 10	39 ± 12	287 ± 55 [b]	180 ± 27 [b]	42 ± 9	106 ± 36	339 ± 62	261 ± 20 [b]	143 ± 19	445 ± 68	53 ± 4	154 ± 4 [ab]
HSa	0	79 ± 16	54 ± 15	375 ± 132	204 ± 45	26 ± 10	121 ± 29	327 ± 70	315 ± 79	230 ± 53	324 ± 50	54 ± 7	129 ± 24
HSa	45	79 ± 19	50 ± 15	394 ± 140	213 ± 61	41 ± 12	99 ± 41	341 ± 87	335 ± 93	182 ± 51	418 ± 37	53 ± 9	137 ± 28
HSa	135	64 ± 12	45 ± 4	388 ± 69	218 ± 34	37 ±19	103 ± 23	290 ± 31	314 ± 41	177 ± 34	397 ± 67	51 ± 13	124 ± 22

	Temps (min)	Met	Isoleu	Leu	Tyr	Phe	Orn	Lys	His	Arg	Pro
HS_1	0	22 ± 5 [a]	69±20	106±28	60 ± 17	50 ± 12	51 ± 20	361 ± 96	44 ± 15	63 ± 41	126 ± 37 [a]
HS_1	45	34 ± 16 [b]	55 ± 14	84 ± 27	46 ± 13	43 ± 11	65 ± 61	290 ± 72	46 ± 15	26 ± 28	198 ± 26 [b]
HS_1	135	33 ± 8 [ab]	64 ± 21	100 ± 29	40 ± 15	48 ± 14	51 ± 31	335 ± 75	54 ± 14	47 ± 23	188 ± 62[b]
HS_2	0	21 ± 11 [a]	77 ± 10 [a]	117 ± 10	52 ± 4	55 ± 4	72 ± 12	363 ± 51	49 ± 8	69 ± 6	115 ± 11[a]
HS_2	45	34 ± 11 [b]	53 ± 18 [b]	87 ± 36	49 ± 15	51 ± 12	66 ± 38	328 ± 78	46 ± 11	50 ± 18	175 ± 39[b]
HS_2	135	27 ± 8 [ab]	64 ± 13 [ab]	96 ± 25	48 ± 8	52 ± 7	43 ± 5	323 ± 67	59 ± 17	64 ± 10	189 ± 48[b]
HS_0	0	24 ± 8	87 ± 12	136 ± 16	57 ± 9	63 ± 6	74 ± 18	360 ± 76	49 ± 8	66 ± 19	129 ± 28[a]
HS_0	45	28 ± 7	70 ± 19	113 ± 32	56 ± 12	52 ± 10	54 ± 20	288 ± 94	46 ± 19	63 ± 30	215 ± 9 [b]
HS_0	135	29 ± 14	72 ± 13	117 ± 18	48 ± 14	49 ± 10	45 ± 16	295 ± 76	52 ± 12	59 ± 25	203 ± 33[b]
HSa	0	21 ± 6 [a]	64 ± 15	97 ± 22	50 ± 11	49 ± 11	70 ± 37	292 ± 64	41 ± 14	57 ± 25	130 ± 29
HSa	45	32 ± 7 [b]	72 ± 15	120 ± 22	54 ± 8	46 ± 8	47 ± 14	311 ± 94	48 ± 21	55 ± 21	136 ± 27
HSa	135	23 ± 8 [ab]	63 ± 12	109 ± 29	44 ± 18	50 ± 9	46 ± 33	286 ± 57	51 ± 22	46 ± 13	138 ± 24

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM, n=5 à 7 rats par groupe. Pour un groupe de rat et un acide aminé donné, les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes (comparaisons obtenues à l'aide de contrastes, dans le modèle mixte).

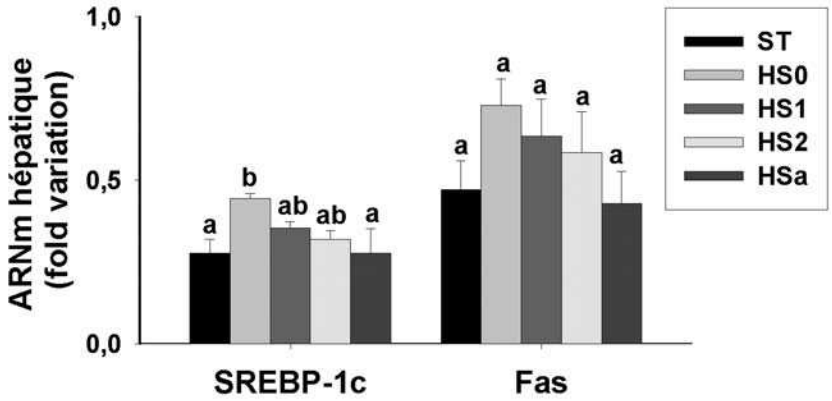


Figure 46: Expression hépatique du stérol regulatory binding protein-1c (SREBP-1c) et de la fatty acid synthase (Fas) chez des rats nourris pendant 6 semaines avec les régimes NP (T), HS_0, HS_1 et HS_2.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SEM, n=4 à 5 rats par groupe. Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes (comparaisons obtenues à l'aide de contrastes, dans le modèle mixte).

Tableau 10 : Composition des régimes expérimentaux HS_0, P14-800 et P30-800 (g/kg d'aliment).

	HS_0	P14-800	P30-800
Protéines totales de lait	140	0	0
P800	0	140	315
Saccharose	722,7	722,7	547,7
Amidon de maïs	0	0	0
Composé vitaminique AIN 93 VX	10	10	10
Composé minéral AIN 93M	35	35	35
Huile de soja	40	40	40
Cellulose	50	50	50
Bitartrate de choline	2,3	2,3	2,3
Energie métabolisable (kJ)	15,2	15,1	14,7

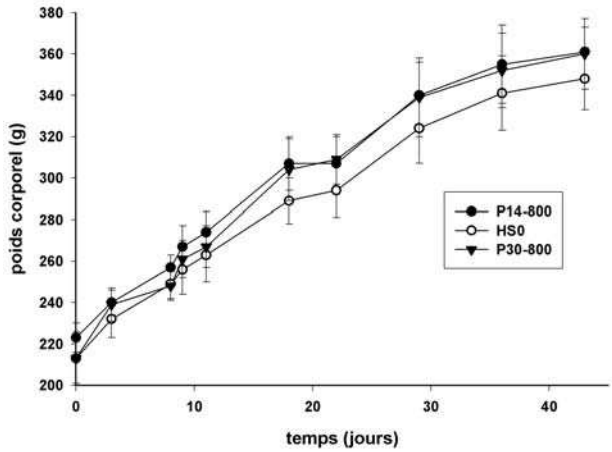


Figure 47: Croissance pondérale de rats nourris pendant 7 semaines avec les régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=8 par groupe. La nature du régime n'affectait pas significativement la croissance pondérale.

Tableau 11: Composition corporelle de rats nourris pendant 7 semaines avec les régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

Poids (g)	P14-800	HS_0	P30-800
poids vif	361 ± 12 [a]	348 ± 15 [a]	360 ± 17 [a]
foie	10 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
TA périrénal	12 ± 3	11 ± 2	11 ± 2
TA épididymaire	11 ± 2 [a]	9 ± 1 [b]	9 ± 1 [b]
TA souscutané	20 ± 5	17 ± 5	17 ± 3
TA viscéral	23 ± 4 [a]	19 ± 3 [b]	20 ± 3 [ab]

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=8 rats par groupe.

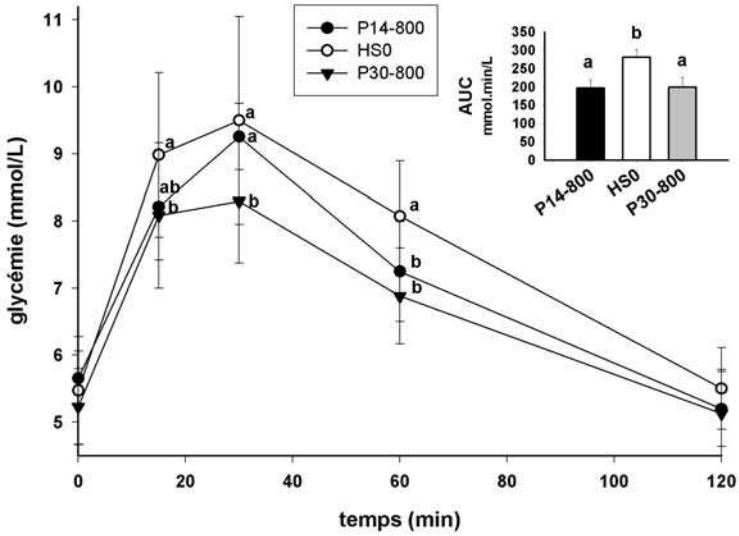


Figure 48 : Glycémies lors du test oral de tolérance au glucose après 7 semaines de consommation des régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=8 rats par groupe. Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes. La nature du régime affectait significativement la cinétique de la glycémie au cours du test oral de tolérance au glucose.

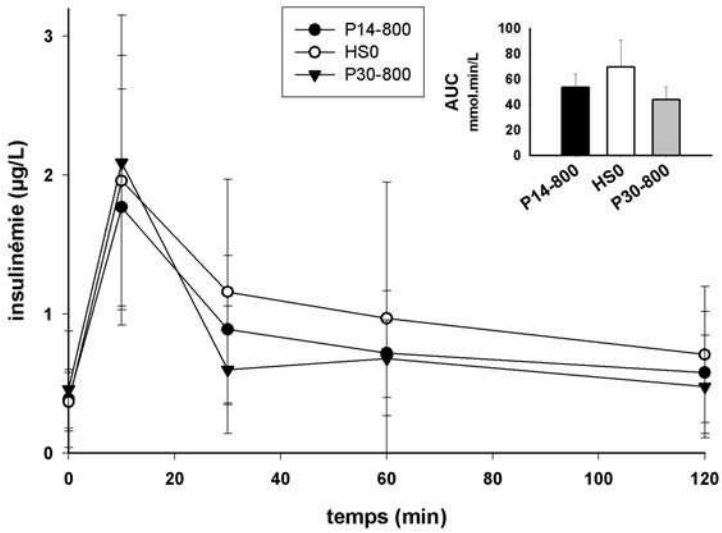


Figure 49 : Insulinémies lors du test oral de tolérance au glucose après 7 semaines de consommation des régimes P14-800, HS_0 ou P30-800 .

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=8 rats par groupe. Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes. La nature du régime n'affectait pas la cinétique de l'insulinémie au cours du test oral de tolérance au glucose.

Tableau 12: Statut en glutathion de rats nourris pendant 7 semaines avec les régimes P14-800, HS_0 ou P30-800.

		P14-800	**HS_0**	**P30-800**	**Effet type de protéines**
	GSH	517 ± 94[ab]	408 ± 106[b]	578 ± 152[a]	<0,1
sang	**GSSG**	67 ± 26	83 ± 36	74 ± 26	NS
	rapport (%)	13 ± 4 [a]	21 ± 8 [b]	13 ± 5 [a]	<0,05
	GSH	3632 ± 1616	4204 ± 1806	3746 ± 852	NS
foie	**GSSG**	92 ± 32	168 ± 133	111 ± 45	NS
	rapport (%)	3 ± 1	4 ± 2	3 ± 1	<0,1
	GSH	362 ± 133	330 ± 60	411 ± 98	NS
muscle	**GSSG**	27 ± 21	39 ± 28	35 ± 24	NS
	rapport (%)	8 ± 5	13 ± 12	10 ± 10	NS
	GSH	1127 ± 217	1137 ± 272	1104 ± 430	NS
cœur	**GSSG**	132 ± 134	159 ± 122	93 ± 28	NS
	rapport (%)	11 ± 10	14 ± 8	9 ± 2	NS

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type, n=8 rats par groupe. Les moyennes ne partageant pas un même indice sont significativement différentes (comparaisons obtenues à l'aide de contrastes, dans le modèle mixte).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahlborg G, Felig P, Hagenfeldt L, Hendler R, Wahren J. (1974) Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest* **53**:1080-1090.

Aizawa T, Sato Y, Ishihara F, Taguchi N, Komatsu M, Suzuki N, Hashizume K, Yamada T. (1994) ATP-sensitive K+ channel-independent glucose action in rat pancreatic beta-cell. *Am J Physiol* **266**:C622-627.

Ammon HP, Hehl KH, Enz G, Setiadi-Ranti A, Verspohl EJ. (1986) Cysteine analogues potentiate glucose-induced insulin release in vitro. *Diabetes* **35**:1390-1396.

Ammon HP, Klumpp S, Fuss A, Verspohl EJ, Jaeschke H, Wendel A, Muller P. (1989) A possible role of plasma glutathione in glucose-mediated insulin secretion: in vitro and in vivo studies in rats. *Diabetologia* **32**:797-800.

Ammon HP, Muller PH, Eggstein M, Wintermantel C, Aigner B, Safayhi H, Stutzle M, Renn W. (1992) Increase in glucose consumption by acetylcysteine during hyperglycemic clamp. A study with healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* **42**:642-645.

Anderson GH, Tecimer SN, Shah D, Zafar TA. (2004) Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *J Nutr* **134**:3011-3015.

Anderson ME. (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* **113**:548-555.

Armstrong JL, Bonavaud SM, Toole BJ, Yeaman SJ. (2001) Regulation of glycogen synthesis by amino acids in cultured human muscle cells. *J Biol Chem* **276**:952-956.

Arnal MA, Mosoni L, Boirie Y, Houlier ML, Morin L, Verdier E, Ritz P, Antoine JM, Prugnaud J, Beaufrere B, Mirand PP. (1999) Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *Am J Clin Nutr* **69**:1202-1208.

Arrigo AP. (1999) Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* **27**:936-944.

Asante-Appiah E, Kennedy BP. (2003) Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**:E663-670.

Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathe V, Huneau JF, Tome D. (2006) Liver glyconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess ? *Am J Physiol*:

Baba NH, Sawaya S, Torbay N, Habbal Z, Azar S, Hashim SA. (1999) High protein vs high carbohydrate hypoenergetic diet for the treatment of obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**:1202-1206.

Badaloo A, Reid M, Forrester T, Heird WC, Jahoor F. (2002) Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am J Clin Nutr* **76**:646-652.

Bagley PJ, Stipanuk MH. (1995) Rats fed a low protein diet supplemented with sulfur amino acids have increased cysteine dioxygenase activity and increased taurine production in hepatocytes. *J Nutr* **125**:933-940.

Baquet A, Hue L, Meijer AJ, van Woerkom GM, Plomp PJ. (1990) Swelling of rat hepatocytes stimulates glycogen synthesis. *J Biol Chem* **265**:955-959.

Barbagallo M, Dominguez LJ, Tagliamonte MR, Resnick LM, Paolisso G. (1999a) Effects of glutathione on red blood cell intracellular magnesium: relation to glucose metabolism. *Hypertension* **34**:76-82.

Barbagallo M, Dominguez LJ, Tagliamonte MR, Resnick LM, Paolisso G. (1999b) Effects of vitamin E and glutathione on glucose metabolism: role of magnesium. *Hypertension* **34**:1002-1006.

Baron AD, Tarshoby M, Hook G, Lazaridis EN, Cronin J, Johnson A, Steinberg HO. (2000) Interaction between insulin sensitivity and muscle perfusion on glucose uptake in human skeletal muscle: evidence for capillary recruitment. *Diabetes* **49**:768-774.

Barrett EJ, Gusberg R, Ferrannini E, Tepler J, Felig P, Jacob R, Smith D, DeFronzo RA. (1986) Amino acid and glucose metabolism in the postabsorptive state and following amino acid ingestion in the dog. *Metabolism* **35**:709-717.

Barrett WC, DeGnore JP, Konig S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB. (1999) Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry* **38**:6699-6705.

Barthel A, Schmoll D. (2003) Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E685-692.

Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, Le Roux CW, Thomas EL, Bell JD, Withers DJ. (2006) Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* **4**:223-233.

Baum JI, Layman DK, Freund GG, Rahn KA, Nakamura MT, Yudell BE. (2006) A reduced carbohydrate, increased protein diet stabilizes glycemic control and minimizes adipose tissue glucose disposal in rats. *J Nutr* **136**:1855-1861.

Baum JI, O'Connor JC, Seyler JE, Anthony TG, Freund GG, Layman DK. (2005) Leucine reduces the duration of insulin-induced PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**:E86-91.

Bauman PF, Smith TK, Bray TM. (1988) The effect of dietary protein and sulfur amino acids on hepatic glutathione concentration and glutathione-dependent enzyme activities in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* **66**:1048-1052.

Beaufrère B. (2002) [Amino acid metabolism in normal individuals]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*:93-103.

Belfiore F. (2000) Insulin sensitivity indexes calculated from oral glucose tolerance test data. *Diabetes Care* **23**:1595-1596.

Belfiore F, Iannello S, Volpicelli G. (1998) Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol Genet Metab* **63**:134-141.

Bella DL, Hahn C, Stipanuk MH. (1999a) Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol* **277**:E144-153.

Bella DL, Hirschberger LL, Hosokawa Y, Stipanuk MH. (1999b) Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo. *Am J Physiol* **276**:E326-335.

Belobrajdic DP, McIntosh GH, Owens JA. (2004) A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in wistar rats. *J Nutr* **134**:1454-1458.

Bensaid A, Tome D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gausseres N, Fromentin G. (2002) Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol Behav* **75**:577-582.

Bensaid A, Tome D, L'Heureux-Bouron D, Even P, Gietzen D, Morens C, Gaudichon C, Larue-Achagiotis C, Fromentin G. (2003) A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav* **78**:311-320.

Bessesen DH. (2001) The role of carbohydrates in insulin resistance. *J Nutr* **131**:2782S-2786S.

Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. (2000) A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr* **130**:1531-1535.

Blachier F, Leclercq-Meyer V, Marchand J, Woussen-Colle MC, Mathias PC, Sener A, Malaisse WJ. (1989) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Functional response of islets to L-arginine and L-ornithine. *Biochim Biophys Acta* **1013**:144-151.

Blazquez R, Lopez Quijada C. (1970) The effect of a high-protein diet on plasma glucose concentration, insulin sensitivity and plasma insulin in rats. *J Endocrinol* **46**:445-451.

Blom WA, Lluch A, Stafleu A, Vinoy S, Holst JJ, Schaafsma G, Hendriks HF. (2006) Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am J Clin Nutr* **83**:211-220.

Blomstrand E, Eliasson J, Karlsson HK, Kohnke R. (2006) Branched-chain amino acids activate key enzymes in protein synthesis after physical exercise. *J Nutr* **136**:269S-273S.

Bode AM, Foster JD, Nordlie RC. (1992) Glyconeogenesis from L-proline involves metabolite inhibition of the glucose-6-phosphatase system. *J Biol Chem* **267**:2860-2863.

Boden G, Ruiz J, Kim CJ, Chen X. (1996) Effects of prolonged glucose infusion on insulin secretion, clearance, and action in normal subjects. *Am J Physiol* **270**:E251-258.

Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. (2005) Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* **142**:403-411.

Boden G, Tappy L. (1990) Effects of amino acids on glucose disposal. *Diabetes* **39**:1079-1084.

Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K, Heistad DD, Lentz SR. (2000) Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:1557-1564.

Bois-Joyeux B, Chanez M, Azzout B, Peret J. (1986) Studies on the early changes in rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate and enzymes in response to a high protein diet. *J Nutr* **116**:446-454.

Bois-Joyeux B, Chanez M, Peret J. (1987) Changes in rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase activity during three days of consumption of a high protein diet or starvation. *Diabete Metab* **13**:543-548.

Bolea S, Pertusa JA, Martin F, Sanchez-Andres JV, Soria B. (1997) Regulation of pancreatic beta-cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *Pflugers Arch* **433**:699-704.

Bonadonna RC, Saccomani MP, Del Prato S, Bonora E, DeFronzo RA, Cobelli C. (1998) Role of tissue-specific blood flow and tissue recruitment in insulin-mediated glucose uptake of human skeletal muscle. *Circulation* **98**:234-241.

Bonnefont-Rousselot D. (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**:561-568.

Borel MJ, Williams PE, Jabbour K, Levenhagen D, Kaizer E, Flakoll PJ. (1998) Parenteral glutamine infusion alters insulin-mediated glucose metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **22**:280-285.

Bos C, Metges CC, Gaudichon C, Petzke KJ, Pueyo ME, Morens C, Everwand J, Benamouzig R, Tome D. (2003) Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. *J Nutr* **133**:1308-1315.

Brand-Miller JC, Colagiuri S, Gan ST. (2000) Insulin sensitivity predicts glycemia after a protein load. *Metabolism* **49**:1-5.

Brehm BJ, Seeley RJ, Daniels SR, D'Alessio DA. (2003) A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:1617-1623.

Brennan L, Corless M, Hewage C, Malthouse JP, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. (2003) 13C NMR analysis reveals a link between L-glutamine metabolism, D-glucose metabolism and gamma-glutamyl cycle activity in a clonal pancreatic beta-cell line. *Diabetologia* **46**:1512-1521.

Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* **414**:813-820.

Brozinick JT, Jr., Roberts BR, Dohm GL. (2003) Defective signaling through Akt-2 and -3 but not Akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: potential role in insulin resistance. *Diabetes* **52**:935-941.

Buse MG, Biggers JF, Friderici KH, Buse JF. (1972) Oxidation of branched chain amino acids by isolated hearts and diaphragms of the rat. The effect of fatty acids, glucose, and pyruvate respiration. *J Biol Chem* **247**:8085-8096.

Busserolles J, Rock E, Gueux E, Mazur A, Grolier P, Rayssiguier Y. (2002a) Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br J Nutr* **87**:337-342.

Busserolles J, Zimowska W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A, Gueux E, Grolier P. (2002b) Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression
Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Life Sci* **71**:1303-1312.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. (2005) Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* **11**:183-190.

Cai J, Sun WM, Lu SC. (1995) Hormonal and cell density regulation of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression. *Mol Pharmacol* **48**:212-218.

Calbet JA, MacLean DA. (2002) Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *J Nutr* **132**:2174-2182.

Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y, Leeman R, Kutlu B, Kruhoffer M, Orntoft T, Eizirik DL. (2001) A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **276**:48879-48886.

Cavarape A, Feletto F, Mercuri F, Quagliaro L, Daman G, Ceriello A. (2001) High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *J Endocrinol Invest* **24**:838-845.

Ceriello A. (2003) The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia* **46 Suppl 1**:M9-16.

Ceriello A, Bortolotti N, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Ezsol Z, Tonutti L, Taboga C. (1998) Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* **28**:329-333.

Ceriello A, Motz E. (2004) Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:816-823.

Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, Marra G, Tonutti L, Taboga C, Motz E. (2002) Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* **25**:1439-1443.

Chang TW, Goldberg AL. (1978) Leucine inhibits oxidation of glucose and pyruvate in skeletal muscles during fasting. *J Biol Chem* **253**:3696-3701.

Channon KM. (2004) Tetrahydrobiopterin: regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* **14**:323-327.

Chao CL, Kuo TL, Lee YT. (2000) Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation* **101**:485-490.

Clark MG, Wallis MG, Barrett EJ, Vincent MA, Richards SM, Clerk LH, Rattigan S. (2003) Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**:E241-258.

Clark S, Konstantopoulos N. (1993) Sulphydryl agents modulate insulin- and epidermal growth factor (EGF)-receptor kinase via reaction with intracellular receptor domains: differential effects on basal versus activated receptors. *Biochem J* **292**:217-223.

Coggins M, Lindner J, Rattigan S, Jahn L, Fasy E, Kaul S, Barrett E. (2001) Physiologic hyperinsulinemia enhances human skeletal muscle perfusion by capillary recruitment. *Diabetes* **50**:2682-2690.

Cotgreave IA, Gerdes RG. (1998) Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun* **242**:1-9.

Cresenzi CL, Lee JI, Stipanuk MH. (2003) Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J Nutr* **133**:2697-2702.

Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G. (2001) Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* **50**:740-746.

Cui R, Iso H, Pi J, Kumagai Y, Yamagishi K, Tanigawa T, Shimamoto T. (2006) Metabolic syndrome and urinary cGMP excretion in general population. *Atherosclerosis*:

Cushman SW, Wardzala LJ. (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* **255**:4758-4762.

Czech MP, Lawrence JC, Jr., Lynn WS. (1974a) Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:4173-4177.

Czech MP, Lawrence JC, Jr., Lynn WS. (1974b) Hexose transport in isolated brown fat cells. A model system for investigating insulin action on membrane transport. *J Biol Chem* **249**:5421-5427.

Daly M. (2003) Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state. *Am J Clin Nutr* **78**:865S-872S.

Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballevre O, Beaufrere B. (2001) The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**:E340-348.

Darmaun D, Smith SD, Sweeten S, Sager BK, Welch S, Mauras N. (2005) Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes* **54**:190-196.

De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, Balsano F. (1998) Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* **47**:993-997.

Del Guerra S, Lupi R, Marselli L, Masini M, Bugliani M, Sbrana S, Torri S, Pollera M, Boggi U, Mosca F, Del Prato S, Marchetti P. (2005) Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes. *Diabetes* **54**:727-735.

Dentin R, Pegorier JP, Benhamed F, Foufelle F, Ferre P, Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C. (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J Biol Chem* **279**:20314-20326.

Di Buono M, Wykes LJ, Cole DE, Ball RO, Pencharz PB. (2003) Regulation of sulfur amino acid metabolism in men in response to changes in sulfur amino acid intakes. *J Nutr* **133**:733-739.

Dickinson DA, Levonen AL, Moellering DR, Arnold EK, Zhang H, Darley-Usmar VM, Forman HJ. (2004) Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element. *Free Radic Biol Med* **37**:1152-1159.

Diniz YS, Rocha KK, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Novelli Filho JL, Cicogna AC, Novelli EL. (2006) Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol* **543**:151-157.

Doi M, Yamaoka I, Fukunaga T, Nakayama M. (2003) Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun* **312**:1111-1117.

Doi M, Yamaoka I, Nakayama M, Mochizuki S, Sugahara K, Yoshizawa F. (2005) Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity. *J Nutr* **135**:2103-2108.

Dominy JE, Jr., Hirschberger LL, Coloso RM, Stipanuk MH. (2006) Regulation of cysteine dioxygenase degradation is mediated by intracellular cysteine levels and the ubiquitin-26 S proteasome system in the living rat. *Biochem J* **394**:267-273.

Droge W. (2005) Oxidative enhancement of insulin receptor signaling: experimental findings and clinical implications. *Antioxid Redox Signal* **7**:1071-1077.

Drucker DJ. (2006) The biology of incretin hormones. *Cell Metab* **3**:153-165.

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. (2001) Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* **108**:1341-1348.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12222-12226.

Dudek SM, Semenkovich CF. (1995) Essential amino acids regulate fatty acid synthase expression through an uncharged transfer RNA-dependent mechanism. *J Biol Chem* **270**:29323-29329.

Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. (2001) Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **104**:342-345.

Edgerton DS, Cardin S, Emshwiller M, Neal D, Chandramouli V, Schumann WC, Landau BR, Rossetti L, Cherrington AD. (2001) Small increases in insulin inhibit hepatic glucose production solely caused by an effect on glycogen metabolism. *Diabetes* **50**:1872-1882.

Eisenstein AB, Strack I, Gallo-Torres H, Georgiadis A, Miller ON. (1979) Increased glucagon secretion in protein-fed rats: lack of relationship to plasma amino acids. *Am J Physiol* **236**:E20-27.

El Midaoui A, Wu R, de Champlain J. (2002) Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens* **20**:1407-1412.

Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. (2002) Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* **106**:2067-2072.

Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2003) Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* **52**:1-8.

Fafournoux P, Remesy C, Demigne C. (1982) Stimulation of amino acid transport into liver cells from rats adapted to a high-protein diet. *Biochem J* **206**:13-18.

Faipoux R, Tome D, Bensaid A, Morens C, Oriol E, Bonnano LM, Fromentin G. (2006) Yeast proteins enhance satiety in rats. *J Nutr* **136**:2350-2356.

Farnsworth E, Luscombe ND, Noakes M, Wittert G, Argyiou E, Clifton PM. (2003) Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. *Am J Clin Nutr* **78**:31-39.

Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A, Halimi S. (1997) Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr* **127**:103-107.

Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R. (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* **106**:466-472.

Ferrannini E, DeFronzo RA, Gusberg R, Tepler J, Jacob R, Aaron M, Smith D, Barrett EJ. (1988) Splanchnic amino acid and glucose metabolism during amino acid infusion in dogs. *Diabetes* **37**:237-245.

Fieseler P, Bridenbaugh S, Nustede R, Martell J, Orskov C, Holst JJ, Nauck MA. (1995) Physiological augmentation of amino acid-induced insulin secretion by GIP and GLP-I but not by CCK-8. *Am J Physiol* **268**:E949-955.

Finkelstein JD, Martin JJ, Harris BJ. (1988) Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem* **263**:11750-11754.

Flakoll PJ, Kulaylat M, Frexes-Steed M, Hill JO, Abumrad NN. (1991) Amino acids enhance insulin resistance to exogenous glucose infusion in overnight-fasted humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **15**:123-127.

Flakoll PJ, Wentzel LS, Rice DE, Hill JO, Abumrad NN. (1992) Short-term regulation of insulin-mediated glucose utilization in four-day fasted human volunteers: role of amino acid availability. *Diabetologia* **35**:357-366.

Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. (1966a) Insulin secretion in response to protein ingestion. *J Clin Invest* **45**:1479-1486.

Floyd JC, Jr., Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. (1966b) Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* **45**:1487-1502.

Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12737-12742.

Forslund AH, Hambraeus L, van Beurden H, Holmback U, El-Khoury AE, Hjorth G, Olsson R, Stridsberg M, Wide L, Akerfeldt T, Regan M, Young VR. (2000) Inverse relationship between protein intake and plasma free amino acids in healthy men at physical exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**:E857-867.

Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* **9**:160-168.

Frank GD, Eguchi S, Motley ED. (2005) The role of reactive oxygen species in insulin signaling in the vasculature. *Antioxid Redox Signal* **7**:1053-1061.

Frid AH, Nilsson M, Holst JJ, Bjorck IM. (2005) Effect of whey on blood glucose and insulin responses to composite breakfast and lunch meals in type 2 diabetic subjects. *Am J Clin Nutr* **82**:69-75.

Fridlyand LE, Philipson LH. (2004) Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? *Diabetes* **53**:1942-1948.

Frisbee JC, Stepp DW. (2001) Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**:H1304-1311.

Fukagawa NK. (2006) Sparing of methionine requirements: evaluation of human data takes sulfur amino acids beyond protein. *J Nutr* **136**:1676S-1681S.

Fukagawa NK, Ajami AM, Young VR. (1996) Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. *Am J Physiol* **270**:E209-214.

Fulghesu AM, Ciampelli M, Muzj G, Belosi C, Selvaggi L, Ayala GF, Lanzone A. (2002) N-acetyl-cysteine treatment improves insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **77**:1128-1135.

Gameiro A, Reimann F, Habib AM, O'Malley D, Williams L, Simpson AK, Gribble FM. (2005) The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line. *J Physiol* **569**:761-772.

Ganafa AA, Socci RR, Eatman D, Silvestrova N, Abukhalaf IK, Bayorh MA. (2002) Acute inhibition of glutathione biosynthesis alters endothelial function and blood pressure in rats. *Eur J Pharmacol* **454**:217-223.

Gannon MC, Nuttall FQ. (2004) Effect of a high-protein, low-carbohydrate diet on blood glucose control in people with type 2 diabetes. *Diabetes* **53**:2375-2382.

Gannon MC, Nuttall FQ, Lane JT, Burmeister LA. (1992) Metabolic response to cottage cheese or egg white protein, with or without glucose, in type II diabetic subjects. *Metabolism* **41**:1137-1145.

Gannon MC, Nuttall FQ, Saeed A, Jordan K, Hoover H. (2003) An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* **78**:734-741.

Gannon MC, Nuttall JA, Damberg G, Gupta V, Nuttall FQ. (2001) Effect of protein ingestion on the glucose appearance rate in people with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:1040-1047.

Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. (2002a) The metabolic response to ingested glycine. *Am J Clin Nutr* **76**:1302-1307.

Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. (2002b) Oral arginine does not stimulate an increase in insulin concentration but delays glucose disposal. *Am J Clin Nutr* **76**:1016-1022.

Gao ZY, Li G, Najafi H, Wolf BA, Matschinsky FM. (1999) Glucose regulation of glutaminolysis and its role in insulin secretion. *Diabetes* **48**:1535-1542.

Gaudichon C, Mahe S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Dare S, Van Oycke M, Ferriere F, Rautureau J, Tome D. (1999) Net postprandial utilization of [15N]-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *J Nutr* **129**:890-895.

Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E, Salaun-Martin C. (2005) Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **31**:233-242.

Gilon P, Ravier MA, Jonas JC, Henquin JC. (2002) Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* **51 Suppl 1**:S144-151.

Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. (1997) Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* **95**:1783-1790.

Godsland IF, Jeffs JA, Johnston DG. (2004) Loss of beta cell function as fasting glucose increases in the non-diabetic range. *Diabetologia* **47**:1157-1166.

Goldfine AB, Beckman JA, Betensky RA, Devlin H, Hurley S, Varo N, Schonbeck U, Patti ME, Creager MA. (2006) Family history of diabetes is a major determinant of endothelial function. *J Am Coll Cardiol* **47**:2456-2461.

Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. (2005) Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* **54**:311-321.

Goodpaster BH, Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. (1999) Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* **48**:839-847.

Gopaul NK, Manraj MD, Hebe A, Lee Kwai Yan S, Johnston A, Carrier MJ, Anggard EE. (2001) Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia* **44**:706-712.

Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, Vidal H, Lefai E. (2005) Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J Lipid Res* **46**:697-705.

Greiwe JS, Kwon G, McDaniel ML, Semenkovich CF. (2001) Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**:E466-471.

Griffith OW. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* **27**:922-935.

Griffith OW, Bridges RJ, Meister A. (1979a) Transport of gamma-glutamyl amino acids: role of glutathione and gamma-glutamyl transpeptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:6319-6322.

Griffith OW, Meister A. (1979b) Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5606-5610.

Gromada J, Rorsman P. (2004) New insights into the regulation of glucagon secretion by glucagon-like peptide-1. *Horm Metab Res* **36**:822-829.

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87**:99-109.

Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF, Macedo MP. (2003) Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G588-594.

Guarino MP, Correia NC, Lautt WW, Macedo MP. (2004) Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G527-532.

Guarino MP, Macedo MP. (2006) Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol* **147**:959-965.

Gustafson LA, Neeft M, Reijngoud DJ, Kuipers F, Sauerwein HP, Romijn JA, Herling AW, Burger HJ, Meijer AJ. (2001) Fatty acid and amino acid modulation of glucose cycling in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* **358**:665-671.

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. (2002) Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **105**:1656-1662.

Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, Giacca A, Fantus IG. (2003) N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E744-753.

Haesler E, Schneiter P, Temler E, Jequier E, Tappy L. (1994) Effects of infused amino acids and lipids on glucose metabolism in healthy lean humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* **18**:307-312.

Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. (2003) Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Br J Nutr* **89**:239-248.

Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohe L, Packer L. (1997) Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* **6**:321-338.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**:177-189.

Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. (1998) Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* **273**:14484-14494.

Harber MP, Schenk S, Barkan AL, Horowitz JF. (2005) Effects of dietary carbohydrate restriction with high protein intake on protein metabolism and the somatotropic axis. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:5175-5181.

Haruta T, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM, Olefsky JM, Kobayashi M. (2000) A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* **14**:783-794.

Heffetz D, Rutter WJ, Zick Y. (1992) The insulinomimetic agents H2O2 and vanadate stimulate tyrosine phosphorylation of potential target proteins for the insulin receptor kinase in intact cells. *Biochem J* **288**:631-635.

Hellerstein MK, Neese RA, Linfoot P, Christiansen M, Turner S, Letscher A. (1997) Hepatic gluconeogenic fluxes and glycogen turnover during fasting in humans. A stable isotope study. *J Clin Invest* **100**:1305-1319.

Hellman B, Sehlin J, Taljedal I. (1971) Uptake of alanine, arginine and leucine by mammalian pancreatic beta-cells. *Endocrinology* **89**:1432-1439.

Henriksen EJ, Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ. (1997) Stimulation by alpha-lipoic acid of glucose transport activity in skeletal muscle of lean and obese Zucker rats. *Life Sci* **61**:805-812.

Hildebrandt W, Hamann A, Krakowski-Roosen H, Kinscherf R, Dugi K, Sauer R, Lacher S, Nobel N, Bodens A, Bellou V, Edler L, Nawroth P, Droge W. (2004) Effect of thiol antioxidant on body fat and insulin reactivity. *J Mol Med* **82**:336-344.

Hinault C, Mothe-Satney I, Gautier N, Lawrence JC, Jr., Van Obberghen E. (2004) Amino acids and leucine allow insulin activation of the PKB/mTOR pathway in normal adipocytes treated with wortmannin and in adipocytes from db/db mice. *Faseb J* **18**:1894-1896.

Hinault C, Mothe-Satney I, Gautier N, Van Obberghen E. (2006) Amino acids require glucose to enhance, through phosphoinositide-dependent protein kinase 1, the insulin-activated protein kinase B cascade in insulin-resistant rat adipocytes. *Diabetologia*:

Hirsch S, Ronco AM, Vasquez M, de la Maza MP, Garrido A, Barrera G, Gattas V, Glasinovic A, Leiva L, Bunout D. (2004) Hyperhomocysteinemia in healthy young men and elderly men with normal serum folate concentration is not associated with poor vascular reactivity or oxidative stress. *J Nutr* **134**:1832-1835.

Hoppe C, Molgaard C, Vaag A, Barkholt V, Michaelsen KF. (2005) High intakes of milk, but not meat, increase s-insulin and insulin resistance in 8-year-old boys. *Eur J Clin Nutr* **59**:393-398.

Hoy M, Maechler P, Efanov AM, Wollheim CB, Berggren PO, Gromada J. (2002) Increase in cellular glutamate levels stimulates exocytosis in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* **531**:199-203.

Huang CS, Chang LS, Anderson ME, Meister A. (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**:19675-19680.

Hum S, Koski KG, Hoffer LJ. (1992) Varied protein intake alters glutathione metabolism in rats. *J Nutr* **122**:2010-2018.

Iiboshi Y, Papst PJ, Kawasome H, Hosoi H, Abraham RT, Houghton PJ, Terada N. (1999) Amino acid-dependent control of p70(s6k). Involvement of tRNA aminoacylation in the regulation. *J Biol Chem* **274**:1092-1099.

Iritani N, Sugimoto T, Fukuda H, Komiya M, Ikeda H. (1997) Dietary soybean protein increases insulin receptor gene expression in Wistar fatty rats when dietary polyunsaturated fatty acid level is low. *J Nutr* **127**:1077-1083.

Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Wollheim CB. (2003) Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. *Nat Cell Biol* **5**:330-335.

Iwashita S, Mikus C, Baier S, Flakoll PJ. (2006) Glutamine supplementation increases postprandial energy expenditure and fat oxidation in humans. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **30**:76-80.

Jackson AA, Gibson NR, Lu Y, Jahoor F. (2004) Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *Am J Clin Nutr* **80**:101-107.

Jacob S, Ruus P, Hermann R, Tritschler HJ, Maerker E, Renn W, Augustin HJ, Dietze GJ, Rett K. (1999) Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radic Biol Med* **27**:309-314.

Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ. (1996) The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes* **45**:1024-1029.

Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V. (2000) Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic beta cells to palmitate is dependent on the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* **49**:532-536.

Jahoor F, Jackson A, Gazzard B, Philips G, Sharpstone D, Frazer ME, Heird W. (1999) Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthesis rate. *Am J Physiol* **276**:E205-211.

Jahoor F, Peters EJ, Wolfe RR. (1990) The relationship between gluconeogenic substrate supply and glucose production in humans. *Am J Physiol* **258**:E288-296.

Jean C, Rome S, Mathe V, Huneau JF, Aattouri N, Fromentin G, Achagiotis CL, Tome D. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J Nutr* **131**:91-98.

Jiang G, Zhang BB. (2003) Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**:E671-678.

Johnston CS, Day CS, Swan PD. (2002) Postprandial thermogenesis is increased 100% on a high-protein, low-fat diet versus a high-carbohydrate, low-fat diet in healthy, young women. *J Am Coll Nutr* **21**:55-61.

Jourd'heuil D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. (2000) Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med* **28**:409-417.

Jungas RL, Halperin ML, Brosnan JT. (1992) Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev* **72**:419-448.

Kabir M, Rizkalla SW, Quignard-Boulange A, Guerre-Millo M, Boillot J, Ardouin B, Luo J, Slama G. (1998) A high glycemic index starch diet affects lipid storage-related enzymes in normal and to a lesser extent in diabetic rats. *J Nutr* **128**:1878-1883.

Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, Nyska A, Wachsman JT, Ames BN, Basu S, Brot N, Fitzgerald GA, Floyd RA, George M, Heinecke JW, Hatch GE, Hensley K, Lawson JA, Marnett LJ, Morrow JD, Murray DM, Plastaras J, Roberts LJ, 2nd, Rokach J, Shigenaga MK, Sohal RS, Sun J, Tice RR, Van Thiel DH, Wellner D, Walter PB, Tomer KB, Mason RP, Barrett JC. (2005) Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free Radic Biol Med* **38**:698-710.

Kaloyianni M, Freedland RA. (1990) Contribution of several amino acids and lactate to gluconeogenesis in hepatocytes isolated from rats fed various diets. *J Nutr* **120**:116-122.

Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. (1999) Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* **48**:2398-2406.

Karabatas LM, De Bruno LF, Pastorale C, Lombardo YB, Basabe JC. (2000) Branched-chain amino acid-enriched diet: effects on insulin secretion and cellular immune aggression. *Proc Soc Exp Biol Med* **224**:159-165.

Kawasaki T, Kashiwabara A, Sakai T, Igarashi K, Ogata N, Watanabe H, Ichiyanagi K, Yamanouchi T. (2005) Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Br J Nutr* **93**:613-618.

Kettelhut IC, Foss MC, Migliorini RH. (1980) Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high-protein diet. *Am J Physiol* **239**:R437-444.

Khamaisi M, Kavel O, Rosenstock M, Porat M, Yuli M, Kaiser N, Rudich A. (2000) Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. *Biochem J* **349**:579-586.

Khan MA, Gannon MC, Nuttall FQ. (1992) Glucose appearance rate following protein ingestion in normal subjects. *J Am Coll Nutr* **11**:701-706.

Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI. (2004a) PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **114**:823-827.

Kim SK, Woodcroft KJ, Khodadadeh SS, Novak RF. (2004b) Insulin signaling regulates gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:99-108.

Kim YB, Kotani K, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. (2003) Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes* **52**:1935-1942.

Kitabchi AE, Temprosa M, Knowler WC, Kahn SE, Fowler SE, Haffner SM, Andres R, Saudek C, Edelstein SL, Arakaki R, Murphy MB, Shamoon H. (2005) Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin. *Diabetes* **54**:2404-2414.

Klatt P, Lamas S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* **267**:4928-4944.

Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, Lamas S. (1999) Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *Faseb J* **13**:1481-1490.

Klaus S. (2005) Increasing the protein:carbohydrate ratio in a high-fat diet delays the development of adiposity and improves glucose homeostasis in mice. *J Nutr* **135**:1854-1858.

Kohli R, Meininger CJ, Haynes TE, Yan W, Self JT, Wu G. (2004) Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* **134**:600-608.

Konukoglu D, Hatemi H, Ozer EM, Gonen S, Akcay T. (1997) The erythrocyte glutathione levels during oral glucose tolerance test. *J Endocrinol Invest* **20**:471-475.

Koska J, Blazicek P, Marko M, Grna JD, Kvetnansky R, Vigas M. (2000) Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. *Physiol Res* **49 Suppl 1**:S95-100.

Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, Lowell BB. (2003) Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest* **112**:1831-1842.

Krebs M, Brehm A, Krssak M, Anderwald C, Bernroider E, Nowotny P, Roth E, Chandramouli V, Landau BR, Waldhausl W, Roden M. (2003) Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* **46**:917-925.

Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhausl W, Roden M. (2002) Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* **51**:599-605.

Krieger-Brauer HI, Kather H. (1992) Human fat cells possess a plasma membrane-bound H2O2-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* **89**:1006-1013.

Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* **101**:676-681.

Kurpad AV, Regan MM, Varalakshmi S, Gnanou J, Young VR. (2004) Daily requirement for total sulfur amino acids of chronically undernourished Indian men. *Am J Clin Nutr* **80**:95-100.

Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, Tome D, Huneau JF. (2004) A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side-effects in Wistar male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **20**:20.

Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ. (1999) F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* **377**:89-92.

Lautt WW. (1999) The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* **77**:553-562.

Lautt WW. (2004) A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *J Pharmacol Sci* **95**:9-17.

Lavigne C, Marette A, Jacques H. (2000) Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**:E491-500.

Lavigne C, Tremblay F, Asselin G, Jacques H, Marette A. (2001) Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**:E62-71.

Lawrence JC, Jr. (1992) Signal transduction and protein phosphorylation in the regulation of cellular metabolism by insulin. *Annu Rev Physiol* **54**:177-193.

Lawrence JC, Jr., Larner J. (1978) Activation of glycogen synthase in rat adipocytes by insulin and glucose involves increased glucose transport and phosphorylation. *J Biol Chem* **253**:2104-2113.

Layman DK. (2003) The role of leucine in weight loss diets and glucose homeostasis. *J Nutr* **133**:261S-267S.

Layman DK. (2004) Protein quantity and quality at levels above the RDA improves adult weight loss. *J Am Coll Nutr* **23**:631S-636S.

Layman DK, Baum JI. (2004) Dietary protein impact on glycemic control during weight loss. *J Nutr* **134**:968S-973S.

Layman DK, Shiue H, Sather C, Erickson DJ, Baum J. (2003) Increased dietary protein modifies glucose and insulin homeostasis in adult women during weight loss. *J Nutr* **133**:405-410.

Lee JI, Kang J, Stipanuk MH. (2006) Differential regulation of glutamate-cysteine ligase subunit expression and increased holoenzyme formation in response to cysteine deprivation. *Biochem J* **393**:181-190.

Lee JI, Londono M, Hirschberger LL, Stipanuk MH. (2004) Regulation of cysteine dioxygenase and gamma-glutamylcysteine synthetase is associated with hepatic cysteine level. *J Nutr Biochem* **15**:112-122.

Lejeune MP, Westerterp KR, Adam TC, Luscombe-Marsh ND, Westerterp-Plantenga MS. (2006) Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *Am J Clin Nutr* **83**:89-94.

Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. (1996) Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* **98**:24-29.

Leung YM, Ahmed I, Sheu L, Gao X, Hara M, Tsushima RG, Diamant NE, Gaisano HY. (2006) Insulin regulates islet alpha-cell function by reducing KATP channel sensitivity to adenosine 5'-triphosphate inhibition. *Endocrinology* **147**:2155-2162.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**:346-357.

L'Heureux-Bouron D, Tome D, Bensaid A, Morens C, Gaudichon C, Fromentin G. (2004a) A very high 70%-protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats. *J Nutr* **134**:1512-1515.

L'Heureux-Bouron D, Tome D, Bensaid A, Morens C, Lacroix M, Huneau JF, Fromentin G. (2004b) Preabsorptive factors are not the main determinants of intake depression induced by a high-protein diet in the rat. *Physiol Behav* **81**:499-504.

Li J, DeFea K, Roth RA. (1999) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* **274**:9351-9356.

Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. (2002) Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* **106**:987-992.

Lind C, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I, Cotgreave IA. (1998) Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **247**:481-486.

Ling PR, Mueller C, Smith RJ, Bistrian BR. (2003) Hyperglycemia induced by glucose infusion causes hepatic oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats. *Metabolism* **52**:868-874.

Linn T, Geyer R, Prassek S, Laube H. (1996) Effect of dietary protein intake on insulin secretion and glucose metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:3938-3943.

Linn T, Santosa B, Gronemeyer D, Aygen S, Scholz N, Busch M, Bretzel RG. (2000) Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. *Diabetologia* **43**:1257-1265.

Liu YJ, Cheng H, Drought H, MacDonald MJ, Sharp GW, Straub SG. (2003) Activation of the KATP channel-independent signaling pathway by the nonhydrolyzable analog of leucine, BCH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E380-389.

Liu Z, Wu Y, Nicklas EW, Jahn LA, Price WJ, Barrett EJ. (2004) Unlike insulin, amino acids stimulate p70S6K but not GSK-3 or glycogen synthase in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**:E523-528.

Lu SC, Ge JL, Kuhlenkamp J, Kaplowitz N. (1992) Insulin and glucocorticoid dependence of hepatic gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthesis in the rat. Studies in cultured hepatocytes and in vivo. *J Clin Invest* **90**:524-532.

Lu SC, Kuhlenkamp J, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N. (1991) Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest* **88**:260-269.

Lu SC, Sun WM, Yi J, Ookhtens M, Sze G, Kaplowitz N. (1996) Role of two recently cloned rat liver GSH transporters in the ubiquitous transport of GSH in mammalian cells. *J Clin Invest* **97**:1488-1496.

Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. (1995) Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5817-5821.

Luscombe ND, Clifton PM, Noakes M, Parker B, Wittert G. (2002) Effects of energy-restricted diets containing increased protein on weight loss, resting energy expenditure, and the thermic effect of feeding in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**:652-657.

Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Yu YM, Lu XM, Zurakowski D, Tompkins RG, Ajami AM, Young VR, Castillo L. (2000) Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:5071-5076.

Ma SW, Tomlinson B, Benzie IF. (2005) A study of the effect of oral glucose loading on plasma oxidant:antioxidant balance in normal subjects. *Eur J Nutr* **44**:250-254.

Maechler P, Kennedy ED, Pozzan T, Wollheim CB. (1997) Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic beta-cells. *Embo J* **16**:3833-3841.

Malaisse WJ, Hutton JC, Carpinelli AR, Herchuelz A, Sener A. (1980) The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release: metabolism and cationic effects of leucine. *Diabetes* **29**:431-437.

Malmezat T, Breuille D, Capitan P, Mirand PP, Obled C. (2000) Glutathione turnover is increased during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr* **130**:1239-1246.

Manders RJ, Wagenmakers AJ, Koopman R, Zorenc AH, Menheere PP, Schaper NC, Saris WH, van Loon LJ. (2005) Co-ingestion of a protein hydrolysate and amino acid mixture with carbohydrate improves plasma glucose disposal in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* **82**:76-83.

Manning PJ, Sutherland WH, Walker RJ, Williams SM, De Jong SA, Ryalls AR, Berry EA. (2004) Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associated parameters in overweight subjects. *Diabetes Care* **27**:2166-2171.

Manzella D, Grella R, Esposito K, Cacciapuoti F, Arciello A, Giugliano D, Paolisso G. (2005) Oral amino acid administration decreases oxidative stress and improves brachial reactivity in elderly individuals. *Am J Hypertens* **18**:858-863.

Marfella R, Quagliaro L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. (2001) Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *J Clin Invest* **108**:635-636.

Mariotti F, Simbelie KL, Makarios-Lahham L, Huneau JF, Laplaize B, Tome D, Even PC. (2004) Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. *J Nutr* **134**:128-131.

Martin F, Soria B. (1995) Amino acid-induced [Ca2+]i oscillations in single mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* **486**:361-371.

Matsuda M, DeFronzo RA. (1999) Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* **22**:1462-1470.

May JM, de Haen C. (1979a) The insulin-like effect of hydrogen peroxide on pathways of lipid synthesis in rat adipocytes. *J Biol Chem* **254**:9017-9021.

May JM, de Haen C. (1979b) Insulin-stimulated intracellular hydrogen peroxide production in rat epididymal fat cells. *J Biol Chem* **254**:2214-2220.

McArthur LH, Kelly WF, Gietzen DW, Rogers QR. (1993) The role of palatability in the food intake response of rats fed high-protein diets. *Appetite* **20**:181-196.

McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF. (2004) Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* **27**:538-546.

McSorley PT, Bell PM, Young IS, Atkinson AB, Sheridan B, Fee JP, McCance DR. (2005) Endothelial function, insulin action and cardiovascular risk factors in young healthy adult offspring of parents with Type 2 diabetes: effect of vitamin E in a randomized double-blind, controlled clinical trial. *Diabet Med* **22**:703-710.

Meakins TS, Persaud C, Jackson AA. (1998) Dietary supplementation with L-methionine impairs the utilization of urea-nitrogen and increases 5-L-oxoprolinuria in normal women consuming a low protein diet. *J Nutr* **128**:720-727.

Melancon S, Bachelard H, Badeau M, Bourgoin F, Pitre M, Lariviere R, Nadeau A. (2006) Effects of high-sucrose feeding on insulin resistance and hemodynamic responses to insulin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H2571-2581.

Menon V, Ram M, Dorn J, Armstrong D, Muti P, Freudenheim JL, Browne R, Schunemann H, Trevisan M. (2004) Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabet Med* **21**:1346-1352.

Metges CC, Yu YM, Cai W, Lu XM, Wong S, Regan MM, Ajami A, Young VR. (2000) Oxoproline kinetics and oxoproline urinary excretion during glycine- or sulfur amino acid-free diets in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**:E868-876.

Meyer C, Dostou JM, Gerich JE. (1999) Role of the human kidney in glucose counterregulation. *Diabetes* **48**:943-948.

Meyer KA, Kushi LH, Jacobs DR, Jr., Slavin J, Sellers TA, Folsom AR. (2000) Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. *Am J Clin Nutr* **71**:921-930.

Micke P, Beeh KM, Buhl R. (2002) Effects of long-term supplementation with whey proteins on plasma glutathione levels of HIV-infected patients. *Eur J Nutr* **41**:12-18.

Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, de Champlain J. (2003) Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* **16**:173-179.

Minehira K, Vega N, Vidal H, Acheson K, Tappy L. (2004) Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**:1291-1298.

Moellering D, McAndrew J, Patel RP, Cornwell T, Lincoln T, Cao X, Messina JL, Forman HJ, Jo H, Darley-Usmar VM. (1998) Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch Biochem Biophys* **358**:74-82.

Moldeus P, Cotgreave IA. (1994) N-acetylcysteine. *Methods Enzymol* **234**:482-492.

Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. (2006) Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *Jama* **295**:1681-1687.

Moran LJ, Luscombe-Marsh ND, Noakes M, Wittert GA, Keogh JB, Clifton PM. (2005) The satiating effect of dietary protein is unrelated to postprandial ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:5205-5211.

Morand C, Rios L, Moundras C, Besson C, Remesy C, Demigne C. (1997) Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. *J Nutr Biochem* **8**:246-255.

Morens C, Gaudichon C, Fromentin G, Marsset-Baglieri A, Bensaid A, Larue-Achagiotis C, Luengo C, Tome D. (2001) Daily delivery of dietary nitrogen to the periphery is stable in rats adapted to increased protein intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**:E826-836.

Moriarty-Craige SE, Jones DP. (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* **24**:481-509.

Morifuji M, Sakai K, Sanbongi C, Sugiura K. (2005) Dietary whey protein increases liver and skeletal muscle glycogen levels in exercise-trained rats. *Br J Nutr* **93**:439-445.

Moundras C, Remesy C, Demigne C. (1993) Dietary protein paradox: decrease of amino acid availability induced by high-protein diets. *Am J Physiol* **264**:G1057-1065.

Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L. (1965) Transsulfuration in mammals. Microassays and tissue distributions of three enzymes of the pathway. *J Biol Chem* **240**:4382-4392.

Mukherjee SP, Lynn WS. (1977) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in adipocyte plasma membrane and its activation by insulin. Possible role in the hormone's effects on adenylate cyclase and the hexose monophosphate shunt. *Arch Biochem Biophys* **184**:69-76.

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. (2002) Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**:E1180-1190.

Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, Anuradha CV. (2005) Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore Med J* **46**:82-87.

Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha SW, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JR, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, King GL. (2006) Activation of vascular protein kinase C-beta

inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* **55**:691-698.

Newgard CB, Moore SV, Foster DW, McGarry JD. (1984) Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. *J Biol Chem* **259**:6958-6963.

Newsholme P, Brennan L, Rubi B, Maechler P. (2005) New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin Sci (Lond)* **108**:185-194.

Nicolaidis S, Rowland N, Meile MJ, Marfaing-Jallat P, Pesez A. (1974) A flexible technique for long term infusions in unrestrained rats. *Pharmacol Biochem Behav* **2**:131-136.

Nijpels G, van der Wal PS, Bouter LM, Heine RJ. (1994) Comparison of three methods for the quantification of beta-cell function and insulin sensitivity. *Diabetes Res Clin Pract* **26**:189-195.

Nilsson M, Stenberg M, Frid AH, Holst JJ, Bjorck IM. (2004) Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *Am J Clin Nutr* **80**:1246-1253.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* **404**:787-790.

Nishitani S, Matsumura T, Fujitani S, Sonaka I, Miura Y, Yagasaki K. (2002) Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem Biophys Res Commun* **299**:693-696.

Nishitani S, Takehana K, Fujitani S, Sonaka I. (2005) Branched-chain amino acids improve glucose metabolism in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**:G1292-1300.

Nkabyo YS, Gu LH, Jones DP, Ziegler TR. (2006) Thiol/disulfide redox status is oxidized in plasma and small intestinal and colonic mucosa of rats with inadequate sulfur amino acid intake. *J Nutr* **136**:1242-1248.

Nomiyama T, Igarashi Y, Taka H, Mineki R, Uchida T, Ogihara T, Choi JB, Uchino H, Tanaka Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Murayama K, Kawamori R, Watada H, Bannai S, Kitamura E. (2004) Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1
Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:639-647.

Nuttall FQ, Gannon MC. (1991) Plasma glucose and insulin response to macronutrients in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes Care* **14**:824-838.

Nuttall FQ, Gannon MC, Jordan K. (2004) The metabolic response to ingestion of proline with and without glucose. *Metabolism* **53**:241-246.

Nuttall FQ, Mooradian AD, Gannon MC, Billington C, Krezowski P. (1984) Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes Care* **7**:465-470.

Ogihara T, Asano T, Katagiri H, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Fujishiro M, Kushiyama A, Fukushima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Gotoh Y, Komuro I, Fujita T. (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia* **47**:794-805.

Ohneda A, Parada E, Eisentraut AM, Unger RH. (1968) Characterization of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids. *J Clin Invest* **47**:2305-2322.

Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. (1993) Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* **92**:514-519.

Ookhtens M, Kaplowitz N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* **18**:313-329.

Pacy PJ, Price GM, Halliday D, Quevedo MR, Millward DJ. (1994) Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses of protein synthesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. *Clin Sci (Lond)* **86**:103-116.

Pagliassotti MJ, Prach PA. (1997) Increased net hepatic glucose output from gluconeogenic precursors after high-sucrose diet feeding in male rats. *Am J Physiol* **272**:R526-531.

Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. (1996) Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol* **271**:R1319-1326.

Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F. (1993) Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* **57**:650-656.

Paolisso G, Di Maro G, Pizza G, D'Amore A, Sgambato S, Tesauro P, Varricchio M, D'Onofrio F. (1992a) Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol* **263**:E435-440.

Paolisso G, Giugliano D, Pizza G, Gambardella A, Tesauro P, Varricchio M, D'Onofrio F. (1992b) Glutathione infusion potentiates glucose-induced insulin secretion in aged patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* **15**:1-7.

Papakonstantinou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Zampelas A, Skoumas Y, Stefanadis C. (2005) Food group consumption and glycemic control in people with and without type 2 diabetes: the ATTICA study. *Diabetes Care* **28**:2539-2540.

Parker B, Noakes M, Luscombe N, Clifton P. (2002) Effect of a high-protein, high-monounsaturated fat weight loss diet on glycemic control and lipid levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**:425-430.

Parks EJ. (2002) Dietary carbohydrate's effects on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentrations. *Br J Nutr* **87 Suppl 2**:S247-253.

Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. (2003) Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* **333**:19-39.

Patti ME, Brambilla E, Luzi L, Landaker EJ, Kahn CR. (1998) Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J Clin Invest* **101**:1519-1529.

Pawlak DB, Kushner JA, Ludwig DS. (2004) Effects of dietary glycaemic index on adiposity, glucose homoeostasis, and plasma lipids in animals. *Lancet* **364**:778-785.

Peret J, Chanez M, Cota J, Macaire I. (1975) Effects of quantity and quality of dietary protein and variation in certain enzyme activities on glucose metabolism in the rat. *J Nutr* **105**:1525-1534.

Pessin JE, Saltiel AR. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**:165-169.

Peters LP, Teel RW. (2003) Effects of high sucrose diet on body and liver weight and hepatic enzyme content and activity in the rat. *In Vivo* **17**:61-65.

Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, Elliott HL, Connell JM. (1996) Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* **93**:1331-1333.

Petzke KJ, Elsner A, Proll J, Thielecke F, Metges CC. (2000) Long-term high protein intake does not increase oxidative stress in rats. *J Nutr* **130**:2889-2896.

Petzke KJ, Friedrich M, Metges CC, Klaus S. (2005) Long-term dietary high protein intake up-regulates tissue specific gene expression of uncoupling proteins 1 and 2 in rats. *Eur J Nutr* **44**:414-421.

Petzke KJ, Proll J, Bruckner J, Metges CC. (1999) Plasma protein carbonyl concentration is not enhanced by chronic intake of high-protein diets in adult rats. *J Nutr Biochem* **10**:268-273.

Peyrollier K, Hajduch E, Blair AS, Hyde R, Hundal HS. (2000) L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 S6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of system A amino acid transport. *Biochem J* **350 Pt 2**:361-368.

Piatti PM, Monti F, Fermo I, Baruffaldi L, Nasser R, Santambrogio G, Librenti MC, Galli-Kienle M, Pontiroli AE, Pozza G. (1994) Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. *Metabolism* **43**:1481-1487.

Piatti PM, Monti LD, Valsecchi G, Magni F, Setola E, Marchesi F, Galli-Kienle M, Pozza G, Alberti KG. (2001) Long-term oral L-arginine administration improves peripheral and hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **24**:875-880.

Pichon L, Huneau JF, Fromentin G, Tome D. (2006) A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J Nutr* **136**:1256-1260.

Pilkis SJ, Granner DK. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* **54**:885-909.

Pisters PW, Restifo NP, Cersosimo E, Brennan MF. (1991) The effects of euglycemic hyperinsulinemia and amino acid infusion on regional and whole body glucose disposal in man. *Metabolism* **40**:59-65.

Popov D, Costache G, Georgescu A, Enache M. (2002) Beneficial effects of L-arginine supplementation in experimental hyperlipemia-hyperglycemia in the hamster. *Cell Tissue Res* **308**:109-120.

Porszasz R, Legvari G, Nemeth J, Literati PN, Szolcsanyi J, Szilvassy Z. (2002) The sensory nitrergic nature of the hepatic insulin sensitizing substance mechanism in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol* **443**:211-212.

Postic C, Dentin R, Girard J. (2004) Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* **30**:398-408.

Rabasa-Lhoret R, Laville M. (2001) [How to measure insulin sensitivity in clinical practice?]. *Diabetes Metab* **27**:201-208.

Radziuk J, Pye S. (2001) Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev* **17**:250-272.

Raguso CA, Regan MM, Young VR. (2000) Cysteine kinetics and oxidation at different intakes of methionine and cystine in young adults. *Am J Clin Nutr* **71**:491-499.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**:785-789.

Reid M, Badaloo A, Forrester T, Jahoor F. (2006) In vivo rates of erythrocyte glutathione synthesis in adults with sickle cell disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**:E73-79.

Remesy C, Demigne C, Aufrere J. (1978) Inter-organ relationships between glucose, lactate and amino acids in rats fed on high-carbohydrate or high-protein diets. *Biochem J* **170**:321-329.

Rennie MJ, Tipton KD. (2000) Protein and amino acid metabolism during and after exercise and the effects of nutrition. *Annu Rev Nutr* **20**:457-483.

Rerat A, Simoes-Nunes C, Mendy F, Vaissade P, Vaugelade P. (1992) Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *Br J Nutr* **68**:111-138.

Ribeiro RT, Duarte-Ramos F, Macedo MP. (2001) The action of hepatic insulin sensitizing substance is decreased in rats on a high-sucrose diet. *Proc West Pharmacol Soc* **44**:31-32.

Ribeiro RT, Lautt WW, Legare DJ, Macedo MP. (2005) Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia* **48**:976-983.

Richie JP, Jr., Komninou D, Leutzinger Y, Kleinman W, Orentreich N, Malloy V, Zimmerman JA. (2004) Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. *Nutrition* **20**:800-805.

Richman PG, Meister A. (1975) Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**:1422-1426.

Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. (2006) Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* **55**:928-934.

Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. (2003) Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* **52**:581-587.

Robinson TM, Sewell DA, Greenhaff PL. (2003) L-arginine ingestion after rest and exercise: effects on glucose disposal. *Med Sci Sports Exerc* **35**:1309-1315.

Rocha DM, Faloona GR, Unger RH. (1972) Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs. *J Clin Invest* **51**:2346-2351.

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. (1996) Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* **97**:2859-2865.

Romerio SC, Linder L, Nyfeler J, Wenk M, Litynsky P, Asmis R, Haefeli WE. (2004) Acute hyperhomocysteinemia decreases NO bioavailability in healthy adults. *Atherosclerosis* **176**:337-344.

Ronner P, Naumann CM, Friel E. (2001) Effects of glucose and amino acids on free ADP in betaHC9 insulin-secreting cells. *Diabetes* **50**:291-300.

Rorsman P, Renstrom E. (2003) Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **46**:1029-1045.

Rossetti L, Rothman DL, DeFronzo RA, Shulman GI. (1989) Effect of dietary protein on in vivo insulin action and liver glycogen repletion. *Am J Physiol* **257**:E212-219.

Roy D, Perreault M, Marette A. (1998) Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am J Physiol* **274**:E692-699.

Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Khamaisi M, Bashan N. (1999) Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* **42**:949-957.

Saltiel AR, Pessin JE. (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol* **12**:65-71.

Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Williams T, Williams M, Gracely EJ, Stern L. (2003) A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* **348**:2074-2081.

Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P, Jr., Reed RL, Jones DP. (1998) Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* **24**:699-704.

Sandstrom ME, Zhang SJ, Bruton J, Silva JP, Reid MB, Westerblad H, Katz A. (2006) Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J Physiol*:

Santure M, Pitre M, Marette A, Deshaies Y, Lemieux C, Lariviere R, Nadeau A, Bachelard H. (2002) Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. *Br J Pharmacol* **137**:185-196.

Schafer FQ, Buettner GR. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**:1191-1212.

Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. (2005) Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **2**:273-280.

Scheen AJ. (2001) [The insulin sensitivity concept]. *Diabetes Metab* **27**:193-200.

Schmid E, El Benna J, Galter D, Klein G, Droge W. (1998) Redox priming of the insulin receptor beta-chain associated with altered tyrosine kinase activity and insulin responsiveness in the absence of tyrosine autophosphorylation. *Faseb J* **12**:863-870.

Schneider K, Laube H, Linn T. (1996) A diet enriched in protein accelerates diabetes manifestation in NOD mice. *Acta Diabetol* **33**:236-240.

Schnyder B, Pittet M, Durand J, Schnyder-Candrian S. (2002) Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**:E87-94.

Schulze MB, Liu S, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Hu FB. (2004) Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am J Clin Nutr* **80**:348-356.

Schwarz JM, Neese RA, Turner S, Dare D, Hellerstein MK. (1995) Short-term alterations in carbohydrate energy intake in humans. Striking effects on hepatic glucose production, de novo lipogenesis, lipolysis, and whole-body fuel selection. *J Clin Invest* **96**:2735-2743.

Schwenk WF, Haymond MW. (1987) Decreased uptake of glucose by human forearm during infusion of leucine, isoleucine, or threonine. *Diabetes* **36**:199-204.

Scott CB, Devore R. (2005) Diet-induced thermogenesis: variations among three isocaloric meal-replacement shakes. *Nutrition* **21**:874-877.

Seelig GF, Simondsen RP, Meister A. (1984) Reversible dissociation of gamma-glutamylcysteine synthetase into two subunits. *J Biol Chem* **259**:9345-9347.

Sen CK, Packer L. (2000) Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* **72**:653S-669S.

Sener A, Best LC, Yates AP, Kadiata MM, Olivares E, Louchami K, Jijakli H, Ladriere L, Malaisse WJ. (2000) Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release: comparison between the cationic amino acid and its methyl ester. *Endocrine* **13**:329-340.

Sener A, Malaisse WJ. (2002) The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Insulinotropic action of L-alanine. *Biochim Biophys Acta* **1573**:100-104.

Shaw M, Cohen P, Alessi DR. (1998) The activation of protein kinase B by H2O2 or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *Biochem J* **336**:241-246.

Shepherd PR, Kahn BB. (1999) Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* **341**:248-257.

Shi MM, Kugelman A, Iwamoto T, Tian L, Forman HJ. (1994) Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* **269**:26512-26517.

Shulman GI. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* **106**:171-176.

Sies H, Stahl W, Sevanian A. (2005) Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* **135**:969-972.

Sindelar DK, Chu CA, Rohlie M, Neal DW, Swift LL, Cherrington AD. (1997) The role of fatty acids in mediating the effects of peripheral insulin on hepatic glucose production in the conscious dog. *Diabetes* **46**:187-196.

Skov AR, Toubro S, Ronn B, Holm L, Astrup A. (1999) Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**:528-536.

Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, Ashcroft FM. (1997) Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* **499**:625-635.

Solerte SB, Gazzaruso C, Schifino N, Locatelli E, Destro T, Ceresini G, Ferrari E, Fioravanti M. (2004) Metabolic effects of orally administered amino acid mixture in elderly subjects with poorly controlled type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* **93**:23A-29A.

Song D, Hutchings S, Pang CC. (2005) Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* **508**:205-210.

Stevens J, Ahn K, Juhaeri, Houston D, Steffan L, Couper D. (2002) Dietary fiber intake and glycemic index and incidence of diabetes in African-American and white adults: the ARIC study. *Diabetes Care* **25**:1715-1721.

Stipanuk MH. (2004a) Role of the liver in regulation of body cysteine and taurine levels: a brief review. *Neurochem Res* **29**:105-110.

Stipanuk MH. (2004b) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* **24**:539-577.

Stipanuk MH, Hirschberger LL, Londono MP, Cresenzi CL, Yu AF. (2004) The ubiquitin-proteasome system is responsible for cysteine-responsive regulation of cysteine dioxygenase concentration in liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**:E439-448.

Stipanuk MH, Londono M, Lee JI, Hu M, Yu AF. (2002) Enzymes and metabolites of cysteine metabolism in nonhepatic tissues of rats show little response to changes in dietary protein or sulfur amino acid levels. *J Nutr* **132**:3369-3378.

Straub SG, Sharp GW. (2002) Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* **18**:451-463.

Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE, Schmolzer I, Upson BM, Kapoor O, Szuba A, Malinow MR, Wascher TC, Pachinger O, Cooke JP. (2003) Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **108**:933-938.

Sugiura M, Nakamura M, Ikoma Y, Yano M, Ogawa K, Matsumoto H, Kato M, Ohshima M, Nagao A. (2006) The homeostasis model assessment-insulin resistance index is inversely associated with serum carotenoids in non-diabetic subjects. *J Epidemiol* **16**:71-78.

Sun WM, Huang ZZ, Lu SC. (1996) Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase by protein phosphorylation. *Biochem J* **320**:321-328.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. (1995) Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**:296-299.

Suzuki K, Kono T. (1980) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:2542-2545.

Sydow K, Mondon CE, Cooke JP. (2005) Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med* **10 Suppl 1**:S35-43.

Sydow K, Munzel T. (2003) ADMA and oxidative stress. *Atheroscler Suppl* **4**:41-51.

Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, Kobayashi M. (2001) Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol* **21**:5050-5062.

Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. (2002) Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**:1055-1059.

Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP. (1999) Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10857-10862.

Tannous Dit El Khoury D, Obeid O, Azar ST, Hwalla N. (2006) Variations in Postprandial Ghrelin Status following Ingestion of High-Carbohydrate, High-Fat, and High-Protein Meals in Males. *Ann Nutr Metab* **50**:260-269.

Tappy L, Acheson K, Normand S, Schneeberger D, Thelin A, Pachiaudi C, Riou JP, Jequier E. (1992) Effects of infused amino acids on glucose production and utilization in healthy human subjects. *Am J Physiol* **262**:E826-833.

Tappy L, Jequier E, Schneiter P. (2000) Autoregulation of Glucose Production. *News Physiol Sci* **15**:198-202.

Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y. (1974) Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem (Tokyo)* **75**:93-103.

Tay A, Ozcelikay AT, Altan VM. (2002) Effects of L-arginine on blood pressure and metabolic changes in fructose-hypertensive rats. *Am J Hypertens* **15**:72-77.

Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. (2000) Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**:373-384.

Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. (1997) Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* **46**:1733-1742.

Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. (1999) Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* **274**:10595-10602.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* **57**:145-155.

Traxinger RR, Marshall S. (1989) Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. *J Biol Chem* **264**:20910-20916.

Tremblay F, Krebs M, Dombrowski L, Brehm A, Bernroider E, Roth E, Nowotny P, Waldhausl W, Marette A, Roden M. (2005) Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes* **54**:2674-2684.

Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. (2003) Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. *Diabetes* **52**:29-37.

Tremblay F, Marette A. (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* **276**:38052-38060.

Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, Armstrong D. (2001) Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population

10.1093/aje/154.4.348. *Am. J. Epidemiol.* **154**:348-356.

Usami M, Seino Y, Seino S, Takemura J, Nakahara H, Ikeda M, Imura H. (1982) Effects of high protein diet on insulin and glucagon secretion in normal rats. *J Nutr* **112**:681-685.

Vahouny GV, Adamson I, Chalcarz W, Satchithanandam S, Muesing R, Klurfeld DM, Tepper SA, Sanghvi A, Kritchevsky D. (1985) Effects of casein and soy protein on hepatic and serum lipids and lipoprotein lipid distributions in the rat. *Atherosclerosis* **56**:127-137.

van der Meulen J, Jansman AJ. (1997) Nitrogen metabolism in gastrointestinal tissue of the pig. *Proc Nutr Soc* **56**:535-545.

van Loon LJ, Saris WH, Verhagen H, Wagenmakers AJ. (2000) Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am J Clin Nutr* **72**:96-105.

van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. (2003) Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* **423**:773-777.

Verhoef P, Katan MB. (2004a) A healthy lifestyle lowers homocysteine, but should we care? *Am J Clin Nutr* **79**:713-714.

Verhoef P, Steenge GR, Boelsma E, van Vliet T, Olthof MR, Katan MB. (2004b) Dietary serine and cystine attenuate the homocysteine-raising effect of dietary methionine: a randomized crossover trial in humans. *Am J Clin Nutr* **80**:674-679.

Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V. (1996) Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* **13**:715-719.

Vincent MA, Barrett EJ, Lindner JR, Clark MG, Rattigan S. (2003) Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**:E123-129.

Voutilainen S, Alfthan G, Nyyssonen K, Salonen R, Salonen JT. (1998) Association between elevated plasma total homocysteine and increased common carotid artery wall thickness. *Ann Med* **30**:300-306.

Wagenmakers AJ. (1998) Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv Exp Med Biol* **441**:307-319.

Wahren J, Felig P, Hagenfeldt L. (1976) Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest* **57**:987-999.

Walajtys-Rode E, Williamson JR. (1980) Effects of branched chain alpha-ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. III. Interactions with pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem* **255**:413-418.

Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. (2004) Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* **27**:1487-1495.

Wallace TM, Matthews DR. (2002) The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* **19**:527-534.

Weigle DS, Breen PA, Matthys CC, Callahan HS, Meeuws KE, Burden VR, Purnell JQ. (2005) A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *Am J Clin Nutr* **82**:41-48.

Weinhaus AJ, Poronnik P, Cook DI, Tuch BE. (1995) Insulin secretagogues, but not glucose, stimulate an increase in [Ca2+]i in the fetal rat beta-cell. *Diabetes* **44**:118-124.

Westerterp KR, Wilson SA, Rolland V. (1999) Diet induced thermogenesis measured over 24h in a respiration chamber: effect of diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**:287-292.

White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. (2003) Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal Biochem* **318**:175-180.

White MF. (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**:E413-422.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**:1047-1053.

Wilden PA, Pessin JE. (1987) Differential sensitivity of the insulin-receptor kinase to thiol and oxidizing agents in the absence and presence of insulin. *Biochem J* **245**:325-331.

Williamson DF, Vinicor F, Bowman BA. (2004) Primary prevention of type 2 diabetes mellitus by lifestyle intervention: implications for health policy. *Ann Intern Med* **140**:951-957.

Wolever TM. (2000) Dietary carbohydrates and insulin action in humans. *Br J Nutr* **83**:S97-102.

Wolever TM, Mehling C. (2003) Long-term effect of varying the source or amount of dietary carbohydrate on postprandial plasma glucose, insulin, triacylglycerol, and free fatty acid concentrations in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Clin Nutr* **77**:612-621.

Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. (2004) Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr* **134**:489-492.

Wu L, Nicholson W, Knobel SM, Steffner RJ, May JM, Piston DW, Powers AC. (2003) Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *J Biol Chem* **19**:19.

Yang J, Wong RK, Park M, Wu J, Cook JR, York DA, Deng S, Markmann J, Naji A, Wolf BA, Gao Z. (2006) Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **55**:193-201.

Youngman LD, Park JY, Ames BN. (1992) Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9112-9116.

Yu YM, Ryan CM, Fei ZW, Lu XM, Castillo L, Schultz JT, Tompkins RG, Young VR. (2002) Plasma L-5-oxoproline kinetics and whole blood glutathione synthesis rates in severely burned adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**:E247-258.

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H, Quon MJ. (2000) Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* **101**:1539-1545.

459 références

TITRE : Protéines alimentaires et prévention des dysrégulations glycémiques : effets du glutathion et de l'apport en cystéine

RESUME : S'il est établi que les acides aminés interagissent à différents niveaux avec les mécanismes de la régulation glycémique, le rôle quantitatif et qualitatif de l'apport protéique dans l'homéostasie du glucose reste controversé. Le stress oxydant joue un rôle important dans la pathogenèse de l'insulino-résistance, mais peu d'études ont exploré les effets de modulations de l'apport en cystéine, substrat limitant de la synthèse de glutathion. Après une étude des données bibliographiques portant sur les relations entre l'apport protéique et la régulation glycémique, avec un intérêt particulier porté à l'apport en acides aminés soufrés, nous présentons les résultats de nos études expérimentales réalisées chez le rat. Nous avons exploré les effets de la consommation de régimes hyperprotéiques sur la composition corporelle, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline et nous avons évalué les contributions respectives de la diminution spontanée de l'apport énergétique et de l'augmentation de l'apport protéique dans les effets observés. Par la suite, nous avons étudié les effets d'une augmentation spécifique en aigu et à moyen terme de l'apport en cystéine, apportée par l'intermédiaire d'une source protéique naturellement riche en cystéine (protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine) ou d'un donneur de cystéine (N-acétylcystéine), sur le statut en glutathion et la régulation glycémique chez le rat nourri avec un régime hypersaccharosé, un modèle d'induction nutritionnelle de stress oxydant associé à l'apparition d'une insulino-résistance. Différents paramètres de la régulation glycémique, évaluée à jeun et en dynamique (période postprandiale et provocations glycémiques ou insuliniques), ont été confrontés à des marqueurs du statut redox, du métabolisme du glutathion, de la production et de la biodisponibilité du monoxyde d'azote.

L'augmentation de la fraction protéique de l'alimentation réduit le dépôt adipeux et améliore la régulation glycémique chez le rat sain. Chez le rat nourri avec un régime hypersaccharosé, une augmentation spécifique de l'apport en cystéine améliore le statut en glutathion et prévient le stress oxydant, les dysrégulations glycémiques et la réduction de la biodisponibilité du monoxyde d'azote. Ces résultats suggèrent que des conditions alimentaires conduisant à l'apparition d'un stress oxydant modéré pourraient être associées à une augmentation des besoins en acides aminés soufrés et que la non couverture de ces besoins favorise l'apparition de dysfonctions métaboliques.

MOTS CLES : protéines alimentaires, régimes hyperprotéiques, protéines de lactosérum enrichies en α-lactalbumine, cystéine, N-acétylcystéine, régulation de la glycémie.

TITLE : Dietary protein and the prevention of glycemic dysregulation : effects of glutathione and cysteine intake

ABSTRACT : Although it has been repeatedly demonstrated that amino acids alter several mechanisms involved in glycemic control, the impact of dietary protein quantity and quality on glucose homeostasis is still a matter of debate. Oxidative stress is acknowledged as an initiating factor in the pathogenesis of insulin resistance, but the effects of cysteine intake, the rate-limiting substrate for glutathione synthesis, on glycemic control has been overlooked. Following a review of the literature concerning the interactions between protein intake and glycemic control, with a special focus on sulfur amino acids intake, we present the results of our experimental studies conducted in rats. We investigated the effects of high-protein diets on body composition and glycemic control and evaluated the respective contribution of spontaneous decreased energy intake and increased protein intake in these effects. Thereafter, we focused on the effects of an increase in cysteine intake, using a cysteine-rich protein (whey protein enriched with α-lactalbumine) or a cysteine donor (N-acetylcysteine), on glutathione status and glycemic control in rats fed a high-sucrose diet, a model of diet-induced oxidative stress and insulin resistance. Glucose homeostasis was investigated both in the basal state and after several stimulations (meal, oral glucose load or i.v. insulin bolus) and in parallel, several markers of glutathione status, body redox status, nitric oxide production and bioavailability were assessed.

Increasing protein intake reduced adipose tissue deposition and improved glycemic control in healthy rats. In rats fed a high-sucrose diet, a specific increase in cysteine intake improved glutathione status and prevented oxidative stress, alterations in glycemic control and decreased nitric oxide bioavailability. These results suggest that diet-induced mild oxidative stress leads to an increase in sulfur amino acid requirements and that the noncompletion of these extra requirements could favor the onset of metabolic dysregulations.

KEY WORDS : dietary protein, high-protein diets, whey protein enriched with α-lactalbumin, sulfur amino acids, cysteine, N-acetylcysteine, glycemic control, insulin sensitivity.