



**HAL**  
open science

# Assimilation et distribution de l'azote alimentaire en situation de régime hyperprotéique chez le rat et chez l'homme

Céline Morens

► **To cite this version:**

Céline Morens. Assimilation et distribution de l'azote alimentaire en situation de régime hyperprotéique chez le rat et chez l'homme. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2002. Français. tel-00005628

**HAL Id: tel-00005628**

**<https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00005628>**

Submitted on 5 Apr 2004

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

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

**INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON**

**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON**

présentée et soutenue publiquement par

**Céline MORENS**

Ingénieur Agronome

le 18 Mars 2002

**ASSIMILATION ET DISTRIBUTION DE L'AZOTE ALIMENTAIRE  
EN SITUATION DE REGIME HYPERPROTEIQUE  
CHEZ LE RAT ET CHEZ L'HOMME**

**Directeur de Thèse : Daniel TOME**

**JURY**

Pr. D. Tomé	Président
Pr. M. Krempf	Rapporteur
Dr. P. Patureau-Mirand	Rapporteur
Dr. O. Rampin	Examineur
Dr. C. Gaudichon	Examineur

## Collaborations & Remerciements

Cette thèse (Allocation de Recherche du Ministère de la Recherche n°98399) a été réalisée au sein de l'Unité INRA de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, à Paris, sous la direction du Pr. Daniel Tomé.

Les expérimentations sur volontaires sains, effectuées en collaboration avec ARILAIT et DANONE, ont été, pour leur composante clinique, réalisées dans le service de Gastro-entérologie du Pr. Rautureau, Hôpital Avicenne, Bobigny (93). Merci aux Dr. Benamouzig et Pueyo pour leur accueil et pour leur aide.

Les dosages par GC-C-IRMS ont été réalisés au Dife (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Institut Allemand de Nutrition Humaine) à Bergholz-Rehbrücke sous la direction du Dr. C. C. Metges.

Les travaux de neurophysiologie présentés dans cette thèse ont été effectués dans le laboratoire du Pr. D. W. Gietzen (Food Intake Laboratory et Department of Anatomy, Physiology & Cell Biology) à l'Université de Californie, Davis, USA.

Je remercie le Pr. Daniel Tomé de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir encadré mon travail en temps que directeur de thèse.

Je remercie le Pr. Krempf et le Dr. Patureau-Mirand d'avoir bien voulu être rapporteurs de ce travail et le Dr. Gaudichon et le Dr. Rampin pour leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie très chaleureusement Claire Gaudichon pour son encadrement efficace, son aide, sa disponibilité et ses très nombreux conseils. Je lui exprime ici toute mon amitié.

Mes remerciements vont aussi au Dr. C. C. Metges et à tous ses collaborateurs et étudiantes (K. Petzke, P. Albrecht, D. Ulbricht, J. Everwand) pour leur sympathie et leurs conseils lors de mes séjours en Allemagne (Programme Procope, Ministère des Affaires Etrangères).

Je remercie très chaleureusement le Pr. D. W. Gietzen pour m'avoir accueillie dans son équipe pendant 6 mois qui m'ont permis de découvrir la neurobiologie et ... la Californie. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour son amitié, sa disponibilité et son encadrement efficace. Merci aussi à Hank et à tous les membres du laboratoire (P. S. Teh, J. A. Barret, J.

W. Sharp, L. Magrum, Wendy, Tom et les autres étudiants). Merci enfin à Yvonne et à Kristin.

Je remercie Cécile Bos pour notre fructueux travail effectué lors des expérimentations chez l'homme. Je la remercie aussi pour son importante implication dans l'écriture de l'article associé, et pour son soutien tout au long de la rédaction de ce rapport.

Je tiens également à remercier Catherine Luengo et Sophie Daré pour leur aide, leurs conseils et leur patience. Merci aussi à Gilles Fromentin, Jean-François Huneau, Patrick Even & Christiane Larue-Achagiotis pour les discussions constructives que nous avons pu avoir. Merci à Lina Makarios-Lahham pour sa contribution essentielle à l'étude calorimétrique. Merci à Ahmed Bensaïd et Agnès Baglieri-Marsset pour leur participation aux manip chez le rat. Merci encore à Magali, Véronique, Hélène & François pour leur sympathie et leur soutien. Bon courage à tous les autres étudiants du laboratoire. Merci enfin à Michèle Lésel.

Je terminerai en exprimant de sincères remerciements à ma famille et à mes amis pour leur écoute et leur soutien tout au long de mes pérégrinations doctorales. Merci!

## Table des matières

<b>Liste des figures</b>	<b>8</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>11</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>13</b>
<b>Articles &amp; Communications</b>	<b>15</b>

### A INTRODUCTION GENERALE..... 18

### B DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 25

<b>B.1 ADAPTATION DES PROCESSUS DIGESTIFS ET SPLANCHNIQUES D'ASSIMILATION AUX VARIATIONS DE L'APPORT PROTEIQUE ALIMENTAIRE. ....</b>	<b>25</b>
<b>B.1.1 Vidange gastrique &amp; transit intestinal. ....</b>	<b>25</b>
<b>B.1.2 Enzymes impliquées dans la digestion. ....</b>	<b>28</b>
<b>B.1.3 Absorption et utilisation des AA par les cellules de l'épithélium intestinal.....</b>	<b>29</b>
<b>B.1.4 Métabolisme hépatique.....</b>	<b>30</b>
<i>B.1.4.1 Transport &amp; flux hépatiques d'acides aminés. ....</i>	<i>31</i>
<i>B.1.4.2 Transaminations, désaminations et cycle de l'urée.....</i>	<i>32</i>
<i>B.1.4.3 Cétogénèse et néoglucogénèse. ....</i>	<i>35</i>
<i>B.1.4.4 Synthèses protéiques hépatiques.....</i>	<i>36</i>
<b>B.2 ADAPTATION DU METABOLISME INTERMEDIAIRE ET DES ZONES PERIPHERIQUES CORPORELLES A DES VARIATIONS QUALITATIVES &amp; QUANTITATIVES DE L'APPORT PROTEIQUE ALIMENTAIRE.....</b>	<b>38</b>
<b>B.2.1 Acides aminés plasmatiques.....</b>	<b>38</b>
<b>B.2.2 Métabolisme des acides aminés dans le muscle squelettique.....</b>	<b>39</b>
<i>B.2.2.1 Effet d'un apport exogène d'acides aminés ou de protéines.....</i>	<i>39</i>
<i>B.2.2.2 Mécanisme de contrôle de la synthèse protéique musculaire. ....</i>	<i>40</i>
<i>B.2.2.2.1 Par les acides aminés à chaîne latérale ramifiée et par la leucine tout particulièrement?.....</i>	<i>41</i>
<i>B.2.2.2.2 Par l'insuline?.....</i>	<i>41</i>
<i>B.2.2.3 Y-a-t-il un effet du niveau d'apport protéique alimentaire sur la synthèse protéique musculaire?.....</i>	<i>42</i>
<i>B.2.2.4 Autres utilisations métaboliques des acides aminés au niveau musculaire.....</i>	<i>43</i>
<b>B.2.3 Métabolisme des acides aminés dans le rein.....</b>	<b>44</b>
<i>B.2.3.1 Synthèse et dégradation protéiques rénales. ....</i>	<i>44</i>
<i>B.2.3.2 Fonction majeure du rein : l'excrétion des déchets du métabolisme azoté. ....</i>	<i>44</i>
<b>B.2.4 Autres organes périphériques.....</b>	<b>45</b>
<i>B.2.4.1 Peau.....</i>	<i>45</i>
<i>B.2.4.2 Cerveau. ....</i>	<i>46</i>
<i>B.2.4.3 Poumons.....</i>	<i>46</i>
<b>B.2.5 Flux inter-organes d'acides aminés. Synthèse &amp; dégradation protéique au niveau du corps entier.....</b>	<b>47</b>
<i>B.2.5.1 Résumé des flux inter-organes importants d'acides aminés. ....</i>	<i>47</i>
<i>B.2.5.2 Effet d'un apport protéique alimentaire sur la synthèse et la dégradation des protéines corporelles. ....</i>	<i>48</i>
<b>B.3 CONTROLE DE L'INGESTION PROTEIQUE .....</b>	<b>49</b>
<b>B.3.1 Système central impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire. ....</b>	<b>50</b>
<i>B.3.1.1 Zones cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire.....</i>	<i>50</i>
<i>B.3.1.2 Monoamines cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire. ....</i>	<i>52</i>
<i>B.3.1.3 Autres neurotransmetteurs centraux : neuropeptides impliquées dans la transmission cérébrale des signaux périphériques (leptine et insuline). ....</i>	<i>53</i>

<b>B.3.2 Réduction de la prise alimentaire observée lors de la première ingestion d'un régime hyperprotéique.....</b>	<b>54</b>
<b>B.3.3 Hypothèses avancées pour expliquer le contrôle de l'ingestion protéique.....</b>	<b>55</b>
<i>B.3.3.1 Phénomènes pré-absorptifs (digestifs).....</i>	<i>55</i>
<i>B.3.3.2 Phénomènes post-absorptifs.....</i>	<i>57</i>
<b>C TRAVAUX PERSONNELS .....</b>	<b>62</b>
<b>D MATERIELS &amp; METHODES .....</b>	<b>63</b>
<b>D.1 PRINCIPE DES EXPERIMENTATIONS. ....</b>	<b>63</b>
<b>D.1.1 Principes de l'utilisation des isotopes stables. ....</b>	<b>63</b>
<b>D.1.2 Marquage de l'azote exogène. ....</b>	<b>63</b>
<b>D.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>64</b>
<b>D.2.1 ETUDE 1 : Effet de la source protéique alimentaire (Lait ou Soja) sur le métabolisme digestif de l'azote et des acides aminés alimentaires. ....</b>	<b>64</b>
<i>D.2.1.1 Mesure de la digestibilité cœcale des protéines de lait et de soja chez le rat.....</i>	<i>65</i>
<i>D.2.1.2 Mesure de la digestibilité iléale des acides aminés des protéines de lait et de soja chez l'homme.....</i>	<i>65</i>
<b>D.2.2 ETUDE 2 : Effets d'une variation aiguë de ou chronique du niveau d'apport protéique alimentaire sur le métabolisme protéique postprandial chez le rat. ....</b>	<b>66</b>
<i>D.2.2.1 Suivi postprandial de l'azote exogène après un repas hyperprotéique chez le rat adapté ou non à un niveau d'apport élevé en protéines. ....</i>	<i>66</i>
D.2.2.1.1 Conditionnement des animaux. ....	66
D.2.2.1.2 Protocole expérimental. ....	67
<i>D.2.2.2 Effet d'une augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire sur la thermogénèse postprandiale. ....</i>	<i>67</i>
D.2.2.2.1 Conditionnement des animaux. ....	67
D.2.2.2.2 Implantation d'un cathéter jugulaire pour le prélèvement chronique de sang. ....	68
D.2.2.2.3 Calorimétrie.....	68
<i>D.2.2.3 Variations des concentrations en neurotransmetteurs dans 3 zones cérébrales en relation avec les modifications de la prise alimentaire induites par un régime hyperprotéique chez le rat.....</i>	<i>69</i>
D.2.2.3.1 Conditionnement des animaux. ....	69
D.2.2.3.2 Protocole expérimental. ....	69
<b>D.2.3 ETUDE 3 : Influence d'une adaptation à un régime hyperprotéique sur l'utilisation postprandiale des protéines alimentaires chez l'homme. Effet de la source protéique (lait ou soja). ....</b>	<b>70</b>
<i>D.2.3.1 Volontaires.....</i>	<i>70</i>
<i>D.2.3.2 Régimes d'adaptation.....</i>	<i>71</i>
<i>D.2.3.3 Repas expérimentaux. ....</i>	<i>71</i>
<i>D.2.3.4 Protocole expérimental.....</i>	<i>72</i>
<b>D.3 TECHNIQUES ANALYTIQUES. ....</b>	<b>72</b>
<b>D.3.1 Enzymatiques (Urée, ammoniac, créatinine, glucose). ....</b>	<b>72</b>
<b>D.3.2 Dosages hormonaux (Insuline, glucagon, Insulin-like growth factor (IGF-1), cortisol, growth hormone (GH) &amp; leptine). ....</b>	<b>73</b>
<b>D.3.3 Analyse des acides aminés dans le plasma &amp; dans les contenus intestinaux. .</b>	<b>73</b>
<i>D.3.3.1 Préparation des échantillons.....</i>	<i>73</i>
<i>D.3.3.2 Principe du dosage. ....</i>	<i>74</i>
<i>D.3.3.3 Analyseur Bio-Tek (St Quentin-en-Yvelines).....</i>	<i>74</i>
<b>D.3.4 Analyses élémentaires et isotopiques. ....</b>	<b>75</b>
<i>D.3.4.1 Préparation des échantillons.....</i>	<i>75</i>
D.3.4.1.1 Séparation des fractions protéique et non protéique des tissus. ....	75
D.3.4.1.2 Extraction de l'urée et de l'ammoniac urinaires & de l'urée plasmatique.....	75
D.3.4.1.3 Urines. ....	76
D.3.4.1.4 Plasma. ....	76
<i>D.3.4.2 Préparation des esters N-Pivaloyl-2-Propyl d'acides aminés (NPP-AA).....</i>	<i>76</i>

D.3.4.2.1	Extraction des acides aminés.....	76
D.3.4.2.2	Préparation des NPP-AA.....	77
D.3.4.3	Mesures de l'azote totale et de l'enrichissement en <sup>15</sup> N des échantillons par couplage Analyseur Élémentaire / Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique.....	78
D.3.4.3.1	L'analyseur élémentaire.....	78
D.3.4.3.2	Le Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique.....	79
D.3.4.4	Couplage GC-C-IRMS pour la mesure de l'enrichissement isotopique de chaque acide aminé.....	80
<b>D.3.5</b>	<b>Dosage des neuromédiateurs par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....</b>	<b>80</b>
D.3.5.1	Préparation des échantillons.....	80
D.3.5.2	Dosage des neuromédiateurs par HPLC.....	81
<b>D.4</b>	<b>CALCULS &amp; STATISTIQUES.....</b>	<b>81</b>
<b>D.4.1</b>	<b>Mesures de digestibilité.....</b>	<b>81</b>
D.4.1.1	Flux d'azote dans l'intestin.....	81
D.4.1.2	Azote exogène et endogène dans le tube digestif.....	81
D.4.1.3	Acides aminés exogènes.....	82
D.4.1.4	Digestibilités.....	82
D.4.1.4.1	Chez le rat : digestibilité cæcale.....	82
D.4.1.4.2	Chez l'homme : digestibilité iléale.....	83
<b>D.4.2</b>	<b>Mesure de la distribution postprandiale de l'azote alimentaire.....</b>	<b>83</b>
D.4.2.1	Dans les effluents intestinaux.....	83
D.4.2.2	Dans les tissus.....	83
D.4.2.3	Dans les produits d'oxydation.....	84
D.4.2.4	Calcul de l'Utilisation Postprandiale Protéique Nette (UPPN).....	85
D.4.2.5	Dans les acides aminés plasmatiques.....	85
<b>D.4.3</b>	<b>Calorimétrie : calcul des oxydations glucidique, lipidique et protéique postprandiales.....</b>	<b>86</b>
D.4.3.1	Oxydation protéique (Pox).....	86
D.4.3.2	Oxydations glucidique et lipidique (Gox et Lox).....	86
<b>D.4.4</b>	<b>Expression des résultats hormonaux.....</b>	<b>86</b>
<b>D.4.5</b>	<b>Expression des résultats concernant les neuromédiateurs.....</b>	<b>86</b>
<b>D.4.6</b>	<b>Statistiques.....</b>	<b>87</b>
<b>E</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>88</b>
<b>E.1</b>	<b>METABOLISME INTESTINAL ET DIGESTIBILITE DE L'AZOTE ET DES ACIDES AMINES ALIMENTAIRES ET ENDOGENES.....</b>	<b>88</b>
<b>E.1.1</b>	<b>Evaluation de la digestibilité de l'azote et des acides aminés alimentaires chez le rat.....</b>	<b>88</b>
E.1.1.1	Quantités d'azote et d'acides aminés individuels retrouvés dans le tractus digestif.....	88
E.1.1.2	Digestibilités des acides aminés alimentaires individuels et de l'azote alimentaire.....	88
<b>E.1.2</b>	<b>Flux et digestibilité iléale de l'azote et des acides aminés alimentaires et endogène chez l'homme.....</b>	<b>89</b>
E.1.2.1	Azote endogène et alimentaire dans les échantillons iléaux.....	89
E.1.2.2	Composition des pertes azotées d'origine endogène.....	89
E.1.2.3	Composition des pertes azotées d'origine alimentaire.....	90
E.1.2.4	Digestibilités des AA individuels et de l'azote.....	90
<b>E.1.3</b>	<b>Contribution des pertes iléales journalières aux besoins en AA.....</b>	<b>91</b>
<b>E.2</b>	<b>EFFETS D'UNE VARIATION AIGUË OU CHRONIQUE DU NIVEAU D'APPORT PROTEIQUE SUR LE METABOLISME PROTEIQUE POSTPRANDIAL CHEZ LE RAT.....</b>	<b>91</b>
<b>E.2.1</b>	<b>Prise alimentaire, croissance, caractéristiques biochimiques et neurochimiques des animaux.....</b>	<b>92</b>
E.2.1.1	Prise alimentaire et croissance au cours de l'adaptation.....	92
E.2.1.2	Caractéristiques biochimiques et composition corporelle des animaux à la fin de la période d'adaptation.....	93

E.2.1.3	<i>Variations des concentrations en neurotransmetteurs dans 3 zones cérébrales en relation avec les modifications de la prise alimentaire induites par un régime hyperprotéique chez le rat.</i>	94
<b>E.2.2</b>	<b>Cinétiques d'absorption de l'azote alimentaire et évolution postprandiale des acides aminés plasmatiques chez des rats ingérant un régime hyperprotéique pour la première fois ou après adaptation.</b>	<b>95</b>
E.2.2.1	<i>Cinétiques luminales.</i>	95
E.2.2.2	<i>Evolution postprandiale des concentrations plasmatiques en acides aminés.</i>	96
E.2.2.3	<i>Enrichissement individuel en <sup>15</sup>N des pools plasmatiques d'acides aminés.</i>	97
<b>E.2.3</b>	<b>Oxydations protéique, glucidique et lipidique et thermogénèse postprandiales lors d'une augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire.</b>	<b>98</b>
E.2.3.1	<i>Modifications postprandiales des oxydations protéique, glucidique et lipidique.</i>	98
E.2.3.2	<i>Effet thermique du repas.</i>	98
<b>E.2.4</b>	<b>Désamination et production d'urée.</b>	<b>99</b>
<b>E.2.5</b>	<b>Cinétiques d'incorporation de l'azote alimentaire dans les tissus. Répartition de l'azote alimentaire dans les différents pools azotés de l'organisme 5 heures après le repas.</b>	<b>100</b>
E.2.5.1	<i>Muqueuses de l'intestin grêle.</i>	100
E.2.5.2	<i>Protéines plasmatiques et foie.</i>	101
E.2.5.3	<i>Rein.</i>	101
E.2.5.4	<i>Muscles squelettiques.</i>	102
<b>E.2.6</b>	<b>Extrapolation à l'ingéré journalier.</b>	<b>103</b>
<b>E.3</b>	<b>EFFET DU NIVEAU HABITUEL D'APPORT PROTEIQUE (NORMO OU HYPERPROTEIQUE) ET DE LA SOURCE PROTEIQUE DU REPAS (LAIT OU SOJA) SUR L'UTILISATION POSTPRANDIALE DE L'AZOTE ET DES ACIDES AMINES ALIMENTAIRES CHEZ L'HOMME.</b>	<b>103</b>
<b>E.3.1</b>	<b>Paramètres biochimiques mesurés à jeun.</b>	<b>104</b>
<b>E.3.2</b>	<b>Evolution postprandiale des concentrations plasmatiques en glucose, insuline et glucagon et en acides aminés.</b>	<b>104</b>
E.3.2.1	<i>Glucose, insuline et glucagon.</i>	104
E.3.2.2	<i>Acides aminés.</i>	105
<b>E.3.3</b>	<b>Désamination.</b>	<b>105</b>
<b>E.3.4</b>	<b>Incorporation de l'azote alimentaire dans les protéines plasmatiques.</b>	<b>107</b>
<b>F</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>108</b>
<b>F.1</b>	<b>PHENOMENES DE DESAMINATION ET DE SYNTHESE PROTEIQUE SPLANCHNIQUES.</b>	<b>109</b>
<b>F.2</b>	<b>METABOLISME INTERMEDIAIRE ET METABOLISME PROTEIQUE PERIPHERIQUE.</b>	<b>113</b>
<b>F.3</b>	<b>RETRO-CONTROLE VIA LA PRISE ALIMENTAIRE ET LES CINETIQUES DIGESTIVES.</b>	<b>119</b>
<b>F.4</b>	<b>CONSEQUENCES POUR LA DEFINITION DES BESOINS ET POUR L'EVALUATION DE LA QUALITE DES PROTEINES.</b>	<b>123</b>
<b>G</b>	<b>CONCLUSIONS GENERALES &amp; PERSPECTIVES.</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCES</b>		<b>131</b>



## Liste des figures

- Figure 1 : Définition de l'apport protéique de sécurité.
- Figure 2 : Contribution des différents nutriments aux apports énergétiques quotidiens dans la population française.
- Figure 3 : Schéma de la digestion des protéines.
- Figure 4 : Effet du niveau d'apport protéique sur la vidange gastrique de la phase solide du repas, chez le rat.
- Figure 5 : Effet du niveau d'apport protéique sur le taux de disparition de l'azote depuis le tractus gastro-intestinal (estomac + intestin), chez le rat.
- Figure 6 : Vidange gastrique évaluée 40 min après l'ingestion d'un repas (peptones) chez des rats adaptés pendant 21 jours à un régime hyper-, normo-, ou hypoprotéique.
- Figure 7 : Vidange gastrique évaluée 40 min après l'ingestion d'un repas (peptones) chez des rats adaptés pendant 7, 14, 21 ou 30 jours à un régime hyper- ou hypoprotéique.
- Figure 8 : Transit intestinal mesuré chez des chiens perfusés avec des solutions de protéines de soja concentrées à 0, 50, 100 et 200 g.l<sup>-1</sup>.
- Figure 9 : Niveau d'activité de 2 enzymes digestives pancréatiques (Trypsine et Chymotrypsine) après 3 jours d'un régime normo- (25% caséine) ou hyper- (60% caséine) protéique, chez le rat.
- Figure 10 : Catabolisme intestinal des acides aminés.
- Figure 11 : Synthèse protéique au niveau de la muqueuse intestinale dans le jéjunum et l'iléon de patients ayant subi une iléostomie et dans le duodénum de volontaires sains.
- Figure 12 : Flux de captation ou de libération des acides aminés par le foie chez des rats consommant un régime à 15 ou à 60% de caséine.
- Figure 13 : Effet de l'apport protéique alimentaire sur l'activité de la glutamate-alanine transaminase hépatique.
- Figure 14 : Cycle de l'urée.
- Figure 15 : Relation entre apport alimentaire en azote et production d'urée chez le jeune volontaire sain.
- Figure 16 : Flux d'urée au travers des viscères drainées par la veine porte, du foie et des organes splanchniques à l'état post-absorptif et 2 heures après le début d'une perfusion entérale de repas protéiques à base de caséine ou de protéines de soja, chez des porcs en bonne santé.
- Figure 17 : Métabolisme hépatique des acides aminés.
- Figure 18 : Estimation, *in vivo*, du taux de synthèse protéique hépatique en fonction de l'apport protéique alimentaire.
- Figure 19 : Variations postprandiales des concentrations en acides aminés plasmatiques en fonction de la teneur en protéines du régime.
- Figure 20 : Effet de la teneur en caséine du régime sur les concentrations plasmatiques d'acides aminés mesurées 1 heure après le début du repas, chez des rats adaptés.
- Figure 21 : Effets d'un apport protéique sur la synthèse protéique du muscle squelettique chez des rats soumis à un jeûne de 18 heures et ré-alimentés avec un régime contenant 0 ou 20% de protéines pendant 1 heure.
- Figure 22 : Evolution des taux de synthèse des protéines musculaires au cours de la perfusion d'un mélange d'acides aminés, chez l'homme.
- Figure 23 : Taux de synthèse et de dégradation protéiques dans les muscles de la paroi abdominale chez des souris soumises pendant 5 jours à un régime à 4% de caséine et ensuite soumises à différentes conditions nutritionnelles.
- Figure 24 : Effet de la perfusion d'un mélange équilibré d'acides aminés sur le flux entrant de leucine dans le muscle squelettique.
- Figure 25 : Voies potentielles d'activation de l'initiation de la traduction dans les cellules musculaires, impliquant leucine et insuline.
- Figure 26 : Effet d'une perfusion d'insuline sur le taux de synthèse des protéines musculaires chez le volontaire sain au repos.
- Figure 27 : Effet d'un repas à 25% ou 0% de protéines suivi ou non d'un traitement à la diazoxide (qui entraîne une déficience en insuline) sur la synthèse et la dégradation protéiques

- musculaires, chez le rat.
- Figure 28 : Métabolisme des acides aminés au niveau de 2 organes périphériques, le muscle et le rein.
- Figure 29 : Corrélation entre synthèse et dégradation protéiques au niveau cutané chez le lapin.
- Figure 30 : Effet du passage de l'état post-absorptif à l'état nourri sur le métabolisme protéique pulmonaire chez l'homme sain.
- Figure 31 : Estimation du turn-over protéique corporel quotidien chez un homme adulte de 70 kg.
- Figure 32 : Echanges inter-organes de certains acides aminés et de leurs métabolites.
- Figure 33 : Principaux sites d'action des neuropeptides intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire.
- Figure 34 : Métabolisme de la dopamine.
- Figure 35 : Voies de biosynthèse et de dégradation de la 5-HT (sérotonine).
- Figure 36 : Prise alimentaire de rats préalablement adaptés pendant 10 jours à un régime contenant 5% de protéines et soumis ensuite à un régime à 5, 25, 50 ou 75% de caséine.
- Figure 37 : Transmission des signaux sensoriels d'origine viscérale par le nerf vague.
- Figure 38 : Aspects dynamiques du métabolisme des acides aminés et des protéines corporels.
- Figure 39 : Protocole expérimental utilisé dans l'ETUDE 2.
- Figure 40 : Cage à métabolisme.
- Figure 41 : Localisation de l'Area Postrema (APo), du Noyau du Tractus Solitaire (NTS) et de l'Hypothalamus Latéral (LH) sur des coupes transversales et horizontales de cerveau de rat.
- Figure 42 : Protocole expérimental utilisé dans l'ETUDE 3.
- Figure 43 : Schéma du couplage Analyseur Élémentaire / Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique.
- Figure 44 : Azote alimentaire provenant des acides aminés ou non retrouvé dans le tube digestif des rats 6h après l'ingestion d'un repas mixte contenant des protéines de lait ou de soja.
- Figure 45 : Flux d'azote endogène dans l'iléon terminal de volontaires sains ayant ingéré un repas contenant des protéines de lait ou de soja.
- Figure 46 : Apparition de l'azote alimentaire dans l'iléon terminal de sujets ayant ingéré un repas contenant des protéines de lait ou de soja.
- Figure 47 : Flux d'acides aminés endogènes indispensables ou non dans les digesta iléaux des volontaires sains ayant ingéré des protéines de lait ou de soja.
- Figure 48 : Apparition des acides aminés alimentaires individuels dans les digesta iléaux chez des volontaires sains ayant ingéré des protéines de lait ou de soja.
- Figure 49 : Prise alimentaire des animaux pendant la période d'adaptation.
- Figure 50 : Prise de poids cumulée des rats pendant la période d'adaptation.
- Figure 51 : Evolution des concentrations en neuromédiateurs dans le NTS après le repas test.
- Figure 52 : Evolution des concentrations en neuromédiateurs dans le l'APo après le repas test.
- Figure 53 : Evolution des concentrations en neuromédiateurs dans le LH après le repas test.
- Figure 54 : Vidange gastrique après absorption du repas test.
- Figure 55 : Azote exogène restant dans les contenus digestifs 5 heures après le repas.
- Figure 56 : Azote alimentaire présent dans la lumière intestinale en fonction du temps après le repas test.
- Figure 57 : Flux d'absorption intestinale après le repas test.
- Figure 58 : Concentrations plasmatiques des acides aminés après ingestion du repas test.
- Figure 59 : Pourcentage d'acides aminés portant un azote exogène dans le pool plasmatique total (Groupe AP-14).
- Figure 60 : Pourcentage d'acides aminés portant un azote exogène dans le pool plasmatique total (Groupe AP-50).
- Figure 61 : Pourcentage d'acides aminés portant un azote exogène dans le pool plasmatique total (Groupe HP-50).
- Figure 62 : Oxydation protéique postprandiale après ingestion des repas test.
- Figure 63 : Variations de l'oxydation glucidique et lipidique au dessus du niveau basal après ingestion des repas test.

- Figure 64 : Effet thermique des repas test.
- Figure 65 : Azote exogène dans le pool d'urée corporelle, excrété dans l'urée urinaire et désamination totale après ingestion du repas test.
- Figure 66 : Azote alimentaire et azote total transféré dans l'urée corporelle et urinaire après ingestion du repas test.
- Figure 67 : Incorporation de l'azote exogène dans les fractions protéique et non protéique des tissus prélevés.
- Figure 68 : Extrapolation : répartition quotidienne de l'azote alimentaire chez des rats adaptés à un régime normo- (14%) ou hyper- (50%) protéique.
- Figure 69 : Evolution postprandiale des concentrations plasmatiques en glucose, insuline et glucagon. Aires sous la courbe, calculées entre 0 et 8 heures.
- Figure 70 : Variations postprandiales des concentrations plasmatiques en acides aminés.
- Figure 71 : Azote exogène dans le pool d'urée corporelle, excrété dans l'urée urinaire et désamination totale après le repas test.
- Figure 72 : Production d'urée totale, endogène et exogène sur les 8 heures qui suivent le repas test.
- Figure 73 : Azote alimentaire incorporé dans les protéines plasmatiques pendant les 8 heures qui suivent l'ingestion du repas test.
- Figure 74 : Evaluation des quantités d'azote d'origine alimentaire ou endogène déposé chaque jour dans les protéines tissulaires chez des rats consommant un régime normo- ou hyperprotéique.

## Liste des tableaux

- Tableau 1 : Distribution des pertes azotées corporelles chez l'homme.
- Tableau 2 : Besoins en acides aminés du rat adulte et de l'homme.
- Tableau 3 : Estimations des besoins en acides aminés à différentes périodes de la vie : FAO/OMS/UNU (1985) et M. I. T.
- Tableau 4 : PD-CAAS et UPPN de quelques protéines alimentaires.
- Tableau 5 : Contribution des différents types d'aliments consommés aux apports protéiques quotidiens dans la population française.
- Tableau 6 : Possibles effets métaboliques indésirables des régimes hyperprotéiques chez l'être humain adulte : résultats expérimentaux et épidémiologiques.
- Tableau 7 : FSR des protéines de la muqueuse intestinale.
- Tableau 8 : Localisation des fonctions métaboliques hépatiques.
- Tableau 9 : Effet du niveau d'apport protéique sur l'activité des systèmes hépatiques de transport des acides aminés.
- Tableau 10 : Effet de la teneur en protéines du régime sur quelques paramètres biochimiques hépatiques.
- Tableau 11 : Effet du niveau d'apport protéique sur les activités des enzymes de cycle de l'urée et sur les déshydrogénases et transaminases du foie.
- Tableau 12 : Paramètres cinétiques de l'urée à différents niveaux d'apport protéique.
- Tableau 13 : Données biochimiques concernant les principales protéines plasmatiques.
- Tableau 14 : FSR des protéines hépatiques, constitutives ou exportées, chez des sujets consommant un régime normal.
- Tableau 15 : FSR des protéines de muscle squelettique mesurés chez des sujets à jeun.
- Tableau 16 : Effet de l'apport d'acides aminés (par voie veineuse ou gastrique) ou de protéines (par voie gastrique) sur les FSR des protéines de muscle squelettique.
- Tableau 17 : Effet du niveau habituel d'apport protéique sur le taux de synthèse des protéines du muscle squelettique.
- Tableau 18 : Classification des acides aminés en fonction de leur utilisation métabolique au niveau musculaire.
- Tableau 19 : Effets aigus d'un apport protéique sur le métabolisme corporel.
- Tableau 20 : Effet du niveau d'apport protéique sur la croissance de rats préalablement nourris avec un régime à 5% de protéines pendant 10 jours.
- Tableau 21 : Croissance et prise alimentaire de rats pendant une période d'adaptation à un régime contenant de 5 à 75% de caséine.
- Tableau 22 : Enrichissement individuel des acides aminés composant les protéines utilisées dans les protocoles expérimentaux.
- Tableau 23 : Composition des régimes utilisés chez les rats dans l'ETUDE 2, parties "Métabolisme postprandial de l'azote alimentaire" et "Calorimétrie".
- Tableau 24 : Composition des régimes et utilisés chez les rats dans l'ETUDE 2, partie "Neuromédiateurs".
- Tableau 25 : Caractéristiques des volontaires au début de la partie clinique de l'ETUDE 3.
- Tableau 26 : Composition du milieu d'extraction des neurotransmetteurs cérébraux.
- Tableau 27 : Acides aminés alimentaires présents dans l'intestin grêle et le caecum de rats 6h après l'ingestion d'un repas mixte contenant des protéines de lait ou de soja.
- Tableau 28 : Digestibilité de l'azote et des acides aminés alimentaires après l'ingestion de protéines de lait ou de soja chez le rat.
- Tableau 29 : Contribution relative des acides aminés et des autres composés azotés au flux d'azote endogène dans l'iléon terminal de volontaires sains ayant ingéré un repas contenant des protéines de lait ou de soja.
- Tableau 30 : Contribution relative des acides aminés et des autres composés azotés aux quantités cumulées d'azote alimentaire retrouvé dans l'iléon terminal de volontaires sains ayant ingéré un repas contenant des protéines de lait ou de soja.

- Tableau 31 : Valeurs de digestibilité vraie calculées pour l'azote et les acides aminés individuels après ingestion de protéines de lait ou de soja chez le volontaire sain.
- Tableau 32 : Pertes iléales journalières en acides aminés endogènes et alimentaires chez le volontaire sain ingérant des protéines de lait ou de soja. Comparaison avec les apports recommandés.
- Tableau 33 : Poids et teneur totale en azote protéique et non protéique des organes collectés chez les rats après la période d'adaptation.
- Tableau 34 : Urémie, teneurs plasmatiques en acides aminés et en protéines chez les rats à jeun après la période d'adaptation.
- Tableau 35 : Activité dopaminergique (exprimée par le ration DOPAC / DA) dans les différentes zones cérébrales prélevées avant et 3, 4 et 5 heures après l'ingestion du repas test.
- Tableau 36 : Activité dopaminergique (exprimée par le ration HVA / DA) dans les différentes zones cérébrales prélevées avant et 3, 4 et 5 heures après l'ingestion du repas test.
- Tableau 37 : Quantités cumulées d'acides aminés enrichis en azote alimentaire ayant transité via le pool plasmatique pendant les 5 heures qui ont suivi le repas expérimental.
- Tableau 38 : Distribution de l'azote alimentaire entre les différents pools azotés corporels 5 heures après le repas.
- Tableau 39 : Taux de synthèse protéique des muqueuses intestinales calculés 1 heure après l'ingestion du repas test.
- Tableau 40 : Données cliniques mesurées chez les sujets à jeun après une semaine d'adaptation au régime normo- ou hyperprotéique.
- Tableau 41 : Résultats des tests statistiques réalisés sur les valeurs d'aire sous la courbe calculées pour les acides aminés plasmatiques.

## Liste des abréviations

- AA** : Acide(s) Aminé(s)
- ALT** : Alanine Aminotransférase
- AP-14** : Groupe des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas test à 14% de protéines de lait totales
- AP-14 calo** : Groupe des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas test à 14% de protéines de lait totales dans l'étude de calorimétrie
- AP-50** : Groupe des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas à 50% de protéines de lait totales
- AP-50 calo** : Groupe des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas test à 50% de protéines de lait totales
- AP** : Régime normoprotéique
- APo** : Area Postrema
- Arc** : Arcuate Nucleus – Noyau Caudé
- AST** : Aspartate Aminotransférase
- AT%** : Atom Pourcent
- AACLR** : Acides aminés à chaîne latérale ramifiée
- cAP-14** : Groupe des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas test à 14% de caséine
- cAP-50** : Groupe des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas test à 50% de caséine
- CART** : Cocaine and amphetamine regulated transcript
- CCK** : Cholecystokinine
- cHP-50** : Groupe des rats adaptés à un régime hyperprotéique et ingérant un repas test à 50% de caséine
- CRF** : Corticotropin-releasing factor
- CSP-1** : Carbamoyl-Phosphatase 1
- DA** : Dopamine
- AANI** : Acides aminés non indispensables
- DigNAA** : Digestibilité de l'Azote calculée à partir des digestibilités individuelles des Acides Aminés
- DigN** : Digestibilité de l'Azote
- DMH** : Dorsomedial hypothalamic nucleus – Noyau hypothalamique latéral
- DOPAC** : Acide dihydroxyphénylacétique
- DRN** : Dorsal raphe nucleus – Noyau du Raphé dorsal
- EA-IRMS** : Couplage Analyseur élémentaire – Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique
- eIF** : Facteur eucaryote d'initiation
- FSR** : Fractional Synthesis Rate – Taux de Synthèse
- GABA** :  $\gamma$  - Amino- Butyric - Acid
- GC-C-IRMS** : Couplage Chromatographie Gazeuse – Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique avec interface de Combustion
- GLP-1** : Glucagon-like peptide
- 5-HIAA** : Acide 5-hydroxyindole acétique
- HP** : Régime hyperprotéique

**5-HT** : 5-hydroxytryptamine ou Sérotonine  
**HVA** : Acide HomoVanillique  
**AAI** : Acides aminés indispensables  
**IMC** : Indice de Masse Corporelle  
**LCS** : Liquide cérébro-spinal  
**LHA** : Lateral hypothalamic area – Aire hypothalamique latérale  
**AALN** : Acides aminés larges neutres  
**LPB** : Lateral parabrachial nucleus – Noyau parabrachial latéral  
**MS** : Matière sèche  
**MCH** : Melanin-concentrating hormone  
**mTOR** : Mammalian target of Rapamycin  
**NP** : Non protéique  
**NE** : Norepinephrine  
**NPY** : Neuropeptide Y  
**NTS** : Nucleus of the tractus solitarius – Noyau du tractus solitaire  
**OTC** : Ornithine transcarbamoylase  
**OXY** : Oxytocine  
**PC** : Poids corporel  
**POMC** : Pro-opiomelanocortin  
**PVN** : Paraventricular nucleus – Noyau paraventriculaire  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**TCA** : Acide Trichloroacétique  
**TH** : Tyrosine Hydroxylase  
**TRH** : Thyrotrophin-releasing hormone  
**UPPN** : Utilisation Postprandiale Protéique Nette  
**VMH** : Ventromedial hypothalamic nucleus – Noyau hypothalamique ventromédian

## Articles & Communications

### Articles

- ◆ **Morens C.**, Gaudichon C., Metges C.C., Fromentin G., Baglieri A., Even P.C., Huneau J.F., Tomé D. A high-protein meal exceeds anabolic and catabolic capacities in rats adapted to a normal protein diet. *J. Nutr.* 130 : 2312-2321, 2000.
- ◆ **Morens C.**, Gaudichon C., Fromentin G., Marsset-Baglieri A., Bensaïd A., Larue-Achagiotis C., Luengo C., Tomé D. Daily delivery of dietary nitrogen to the periphery is stable in rats adapted to increased protein intake. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281 : E826-E836, 2001.
- ◆ Bensaïd A., Tomé D., Gietzen D., Even P. C., **Morens C.**, Gausserès N. & Fromentin G. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiology & Behavior, sous presse.*
- ◆ Gaudichon C., Bos C., **Morens C.**, Petzke K. J., Mariotti F., Everwand J., Benamouzig R., Daré S., Tomé D., Metges C. C. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans after ingestion of milk or soy protein and contribution to requirements. *En révision pour Gastroenterology.*
- ◆ **Morens C.**, Makarios-Lahham L., Gaudichon C., Fromentin G., Tomé D., Even P.C. Postprandial protein/energy metabolism in rats fed a high protein diet for the first time. *Soumis à American Journal of Physiology, Regulatory, integrative and comparative physiology.*
- ◆ **Morens C.**, Bos C., Pueyo E. M., Benamouzig R., Gausserès N., Tomé D., Gaudichon C. Influence of a high protein adaptation on postprandial utilization of dietary protein in humans. *Soumis à American Journal of Clinical Nutrition.*
- ◆ Bensaïd A., Tomé D., L'Heureux-Bouron D., Even P. C., Gietzen D., **Morens C.**, Gaudichon C. & Fromentin G. A high milk protein diet does not induce a conditioned food aversion in rats. *En préparation.*
- ◆ Lacroix M., Jean C., **Morens C.**, Gaudichon C., Tomé D. & Larue-Achagiotis C. Metabolic pathways of dietary nitrogen in the spontaneous high-protein eater rat. *En préparation.*

### Communications

- ◆ **Morens C.**, Gaudichon C., Metges C.C., Fromentin G., Even P.C., Luengo C., Daré S., Tomé D. Utilisation splanchnique des acides aminés alimentaires lors d'une surcharge aiguë de protéines marquées à l'azote <sup>15</sup>N chez le rat. AFERO 1999, Dijon, France. (Communication)
- ◆ Fromentin G., Even P.C., Gaudichon C., **Morens C.**, Baglieri A., Larue-Achagiotis C., Tomé D. Les modifications du rythme de prise alimentaire chez des rats nourris pour la première fois avec un régime hyperprotéique font davantage apparaître les propriétés satiétogènes qu'aversionnelles de ce nouveau régime. AFERO 1999, Dijon, France. (Poster)



- ◆ **Morens C.**, Gaudichon C., Metges C.C., Fromentin G., Even P.C., Luengo C., Daré S., Tomé D. Dietary nitrogen utilization by the splanchnic bed in rats fed a [<sup>15</sup>N]-labeled high protein meal for the first time. FASEB 1999, Washington DC, USA. *Faseb J. 13: A82 abstract 116.9.* (Poster)
- ◆ Even P.C., Roseau S., Fromentin G., **Morens C.**, Gaudichon C., Tomé D. Postprandial changes in substrate oxidation after feeding for the first time a high protein diet. FASEB 1999, Washington DC, USA. *Faseb J. 13: A82 abstract 116.10.* (Poster)
- ◆ **Morens C.**, Gaudichon C., Metges C.C., Fromentin G., Baglieri A., Even P.C., Tomé D. Postprandial protein and energy metabolism in rats fed a high protein meal. LA NAPOULE 1999, France. (Communication)
- ◆ **Morens C.**, Gaudichon C., Fromentin G., Baglieri A., Tomé D. Metabolic utilization of dietary nitrogen in response to a high protein diet in rats. FASEB 2000, San Diego, USA. *Faseb J.14: A745 abstract 519.9.* (Poster)
- ◆ **Morens C.**, Pueyo M.E., Bos C., Gaudichon C., Benamouzig R., Luengo C., Fouillet H., Tomé D. Dietary nitrogen excretion after ingestion of [<sup>15</sup>N]-milk, [<sup>15</sup>N]-soy, or [<sup>15</sup>N]-wheat proteins at two levels of protein intake in man. FASEB 2000, San Diego, USA. *Faseb J.14: A745 abstract 519.10.* (Poster)
- ◆ Bos C., Gaudichon C., Petzke K.J., **Morens C.**, Mahé S., Everwand J., Tomé D., Metges C.C. Delivery kinetics of [<sup>15</sup>N]-labeled soy and milk amino acids in ileal digesta in human subjects. FASEB 2000, San Diego, USA. *Faseb J.14: A745 abstract 519.6.* (Poster)
- ◆ Gaudichon C., Metges C.C., Bos C., Pueyo M.E., **Morens C.**, Petzke K.J., Everwand J., Benamouzig R., Tomé D. Appearance of [<sup>15</sup>N]-labeled soy and milk amino acids in plasma of human subjects. FASEB 2000, San Diego, USA. *Faseb J. 14: A745 abstract 519.8.* (Poster)
- ◆ Everwand J., Bos C., Gaudichon C., **Morens C.**, Mahé S., Petzke K.J., Tomé D., Metges C.C. Absorption kinetics of dietary amino acids from milk and soy protein in human subjects. Wissenschaftlicher Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung 2000, Bonn, Allemagne. (Poster)
- ◆ Tomé D., **Morens C.**, Jean C., Gaudichon C., Fromentin G. Food intake and metabolic adaptations in rats fed a high protein diet. SSIB 2000, Dublin, Irlande. (Communication)
- ◆ Bos C., **Morens C.**, Pueyo M.E., Benamouzig R., Tomé D., Gaudichon C. Influence d'un régime hyperprotéique sur l'utilisation métabolique des protéines de lait. Réunion des CNRH 2000, Marseille, France. (Poster)
- ◆ Jean C., Lacroix M., **Morens C.**, Gaudichon C., Tomé D., Larue-Achagiotis C. Orientations métaboliques de l'azote alimentaire chez le rat consommant spontanément un niveau élevé de protéines. AFN 2000, Tours, France. (Communication)
- ◆ Bos C., **Morens C.**, Pueyo M. E., Benamouzig R., Tomé D., Gaudichon C. Does increasing habitual protein intake modify the contribution of dietary amino acids to free amino acid metabolic pools? FASEB 2001, Orlando, USA. *Faseb J. 15: A730 abstract 577.4* (Communication)

- ◆ Lacroix M., Jean C., Gaudichon C., **Morens C.**, Tomé D., Larue-Achagiotis C. The metabolic adaptation to high protein intake is similar in mixed meal-fed and self-selecting rats. FASEB 2001, Orlando, USA. *Faseb J. 15: A269 abstract 235.5* (Poster)
- ◆ Lacroix M., **Morens C.**, Gaudichon C., Huneau J. F., Larue-Achagiotis C., Tomé D. La consommation d'un régime hyperprotéique chez le rat entraîne à long terme une réduction de la masse adipeuse. AFERO/SNDLF/AFN, Paris, 2001. (Communication)
- ◆ **Morens C.**, Teh P. S., Barrett J. A., Sharp J. W., Tomé D., Gietzen D. W. Effect of a high protein diet on neurotransmitter metabolism in the Lateral Hypothalamus (LH), Area Postrema (AP) and Nucleus of the Solitary Tract (NTS) in rats. FASEB 2002, New Orleans, USA. (Communication)
- ◆ Bensaïd A., Tomé D., L'Heureux-Bouron D., Even P. C., Gietzen D. W., **Morens C.**, Gaudichon C., Fromentin G. A high protein diet does not induce a conditioned food aversion in rats. FASEB 2002, New Orleans, USA. (Communication)

## **A INTRODUCTION GENERALE**

Selon les conceptions généralement admises, la qualité de l'apport protéique alimentaire correspond à sa capacité à couvrir les besoins de l'organisme en azote et en acides aminés (AA) pour assurer la croissance et l'entretien des tissus. Cette capacité dépend de la quantité de protéines dans le régime, de la composition de ces protéines en acides aminés indispensables (AAI), mais aussi de leur digestibilité et du métabolisme des AA absorbés. Les besoins physiologiques en AA sont fonction de la croissance et du statut physiologique du sujet. Les besoins nutritionnels sont calculés en tenant compte de la biodisponibilité et de l'efficacité d'utilisation de la protéine. Les apports alimentaires recommandés prennent en compte les variations individuelles concernant les besoins et les apports recommandés. De nombreuses incertitudes persistent cependant concernant le niveau et la nature des besoins en protéines et en acides aminés de l'homme et la validité des recommandations nutritionnelles.

### ***La détermination des besoins en protéines et en acides aminés et de la qualité de l'apport protéique chez l'homme est un sujet de débat :***

Les besoins physiologiques en AA représentent d'une part les besoins associés à l'accrétion protéique nette (comme en cas de croissance ou d'allaitement) et d'autre part les besoins associés à l'entretien. Les besoins nutritionnels représentent les quantités d'AA devant être ingérées afin de satisfaire l'ensemble des besoins métaboliques, la question de la biodisponibilité étant alors essentielle.

Les besoins concernant l'accrétion protéique nette relative à la croissance sont directement fonction du taux de dépôt protéique et de la composition en AA de la protéine déposée et sont, par conséquent, assez facilement quantifiables. Il est, par contre, beaucoup plus difficile de quantifier les besoins d'entretien. Des problèmes à la fois techniques et conceptuels se posent. Ainsi, les estimations obtenues par les méthodes des bilans azoté ou carboné ne donnent pas les mêmes résultats et sont sujettes à de nombreuses discussions (Millward, 2001). Il existe, de fait, de réelles différences entre le métabolisme azoté et le métabolisme carboné qui peuvent expliquer des résultats discordants. En outre, une partie non négligeable des AA alimentaires est utilisée à des fins énergétiques ou comme précurseurs de composés azotés physiologiquement importants (créatine, glutathion, monoxyde d'azote). Des données assez précises ont cependant pu être obtenues concernant les pertes azotées quotidiennes (Tableau 1).

Il faut aussi définir les besoins en AA indispensables (AAI), c'est-à-dire ceux que l'organisme n'est pas capable de synthétiser. Rose *et al.* (1954) ont mis en évidence l'existence d'AAI, et ceci par la méthode du bilan azoté. Chez l'homme, neuf AA sont considérés comme indispensables (lysine, histidine, tryptophane, phénylalanine, leucine, isoleucine, thréonine, méthionine et valine), les autres étant les AA non indispensables (AANI). Certains AA comme l'arginine, la proline, la glutamine, la cystéine et, sous réserve, la glycine sont cependant considérés comme "conditionnellement" indispensables (Young & Borgonha, 1999). Ainsi, il a été démontré que si la synthèse endogène d'arginine était constante, son niveau de dégradation était très variable selon l'état physiologique du sujet d'où un possible besoin accru en cet AA dans les états cataboliques prononcés (Yu *et al.*, 1995). Il a aussi été démontré que la synthèse de proline était limitante chez le porc nouveau-né (Ball *et al.*, 1986).

Les premières valeurs d'apports recommandés en AA ont été évaluées à partir des travaux de Rose (1957) et de quelques autres auteurs réalisés chez l'homme jeune en bonne santé (Tableau 2). Young et ses collaborateurs du Massachusetts Institute of Technology (M. I. T.) ont proposé une réévaluation des besoins, après un ensemble d'études basées sur des techniques de traceurs, remettant en cause les recommandations initiales FAO/OMS/UNU (Tableau 3). En effet, ces travaux plus récents critiquent l'utilisation inadéquate de la technique du bilan azoté pour la définition des besoins en AA conduisant à une sous-estimation des besoins réels, l'équilibre azoté pouvant être obtenu à différents niveaux d'ingestion protéique sans que ceci n'indique une adéquation entre l'ingéré et les exigences organiques. De plus, certains schémas expérimentaux seraient inadaptés (phase de récupération après une période de sous-nutrition, nombre de sujets trop faible, apport énergétique trop élevé, sous-estimation des pertes azotées...). Ainsi, les techniques plus récentes du bilan direct du traceur – "direct tracer balance technique" (Young et collaborateurs) et de l'oxydation de l'AA indicateur – "indicator AA oxidation method" – (Pencharz et collaborateurs) aboutissent à des besoins 2 à 3 fois supérieurs à ceux initialement déterminés (FAO/OMS/UNU). Par exemple 19,0 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour la thréonine (Wilson *et al.*, 2000), ou 5 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour le tryptophane (Lazaris-Brunner *et al.*, 1998).

Ces incertitudes sur le niveau réel des besoins en AA rendent délicate l'évaluation de la qualité de l'apport protéique. Une protéine de bonne qualité est définie comme une protéine dont la composition en AA assure un apport suffisant d'AAI tout en étant extrêmement digeste (protéines de l'œuf de poule, du lait de vache, de la viande et du poisson). Les points critiques de l'évaluation de la qualité d'une protéine alimentaire sont le choix du profil de référence, de la méthode de mesure de la digestibilité et du mode de

calcul et d'expression des indices traduisant les résultats obtenus. Pendant plusieurs décennies, la méthode utilisée reposait sur le calcul du Ratio d'Efficacité Protéique qui évaluait la capacité de la protéine à assurer la croissance chez de jeunes rats. Depuis 1990, la FAO recommande l'utilisation des techniques d'indice (indice chimique et plus récemment le PD-CAAS, Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score). Le PD-CAAS évalue la composition en AAI rapportée aux besoins de l'homme et pondérée par la digestibilité de la protéine (Schaafsma, 2000). Plusieurs critiques peuvent cependant être formulées sur ce type d'approche. Ainsi, le PD-CAAS (1) ne prend pas en compte les capacités d'une protéine ayant une teneur en AAI élevée à compléter une protéine déficiente; (2) son calcul implique l'utilisation, pour tous les AA, d'une même digestibilité, celle de la protéine, or les AA individuels n'ont peut-être pas tous des digestibilités équivalentes ; (3) le calcul ne prend pas en compte le niveau d'apport habituel en protéines qui influence très significativement l'utilisation métabolique des protéines alimentaires. Les méthodes *in vivo*, telle la mesure de l'Utilisation Protéique Postprandiale Nette (UPPN), devraient donc être utilisées afin de compléter et de moduler les résultats obtenus par les méthodes d'indice (Tomé & Bos, 2000). Le tableau 4 présente des valeurs de PD-CAAS et d'UPPN de quelques protéines couramment utilisées dans l'alimentation humaine.

***Les populations occidentales ont tendance à consommer des quantités de protéines nettement supérieures aux apports alimentaires recommandés :***

Les apports alimentaires recommandés ont pour but de formuler des recommandations pour des populations et les problèmes majeurs qui se posent alors sont la validité des marqueurs et les variations interindividuelles. Une des premières recommandations, établie en 1979, en Angleterre (Jackson, 2001), proposait que les protéines représentent 10% des apports énergétiques quotidiens (Department of Health and Social Security, 1979). Cette recommandation était fondée sur le fait que ce niveau d'apport correspondait à l'apport moyen dans la population, et comme la population semblait globalement en bonne santé, ce niveau d'apport devait être adéquat. En 1985, de nouvelles recommandations ont été publiées par la FAO/OMS/UNU. Dans le rapport publié par le groupe de travail, les besoins en protéines sont définis comme "*correspondant à la valeur minimale de l'apport protéique alimentaire qui équilibre les pertes azotées de l'organisme chez un sujet dont l'équilibre énergétique est assuré et dans l'hypothèse d'une activité physique modérée*". Le travail préparatoire incluait la collecte d'informations dans le monde entier, une étude des différences dues à l'âge et au sexe, la prise en compte des interactions avec le bilan énergétique, des études à court et à long termes.

L'ensemble des données collectées a amené à une estimation du besoin moyen en protéines à 0,63 g de protéines de bonne qualité et très digestes par kg de poids corporel. Pour établir, à partir de cette estimation des besoins moyens, une valeur suffisante pour tenir compte des variations individuelles au sein d'un groupe d'individus (c'est-à-dire le niveau d'apport de sécurité, Figure 1), il a d'abord fallu estimer les coefficients de variation des besoins. Les données obtenues permettent de chiffrer celui-ci à 16,2%. En admettant que la variance des observations s'explique pour moitié par les variations chez le même sujet (variabilité biologique et erreurs de mesure) et pour l'autre par les variations d'un sujet à l'autre, le groupe de travail a estimé à 12,5% la véritable valeur du coefficient de variation des besoins protéiques de l'adulte. Par conséquent, il a été admis qu'une valeur supérieure de 25% (2 écart-types) à la moyenne des besoins physiologiques devrait couvrir les besoins de la totalité des sujets de la population à l'exception de 2,5% d'entre eux. Un apport quotidien de 0,75 g de protéines de bonne qualité par kg de poids corporel doit donc correspondre à l'apport minimal de sécurité.

Dans les pays occidentaux, la consommation habituelle en protéines dépasse souvent les apports recommandés par la FAO et l'OMS. Une étude réalisée en France en 1993–1994 montre par exemple que les Français consomment en moyenne 17,3% de leur ingéré énergétique quotidien sous la forme de protéines ( $16,6 \pm 3,0\%$  pour les hommes et  $18,1 \pm 3,8\%$  chez les femmes), ce qui correspond à des apports moyens compris entre 1,3 et 1,6  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ , soit entre 1,6 et 2 fois les recommandations établies par la FAO/OMS (Figure 2). Le pourcentage de protéines dans l'ingéré quotidien varie en fonction du niveau énergétique de la ration. Ainsi, chez l'homme, les protéines représentent  $19 \pm 3\%$ ,  $17 \pm 3\%$  et  $15 \pm 2\%$  de l'énergie ingérée dans la journée pour un apport total en énergie faible, moyen ou élevé, respectivement. Chez les femmes, les chiffres obtenus sont  $21 \pm 5\%$ ,  $18 \pm 3\%$  et  $16 \pm 3\%$ , respectivement (Rigaud *et al.*, 1997). Les protéines consommées sont majoritairement d'origine animale (63% chez l'homme et 62% chez la femme, Tableau 5). Des résultats tout à fait similaires ont été obtenus pour la population allemande (Adolf *et al.*, 1994) et la population américaine (Hu, 1999).

Il est donc clair que, au moins dans les sociétés occidentales, la consommation en protéines satisfait largement les besoins corporels et est même 1,5 à 2 fois supérieure aux apports recommandés. Les conséquences physiologiques de cet apport élevé en protéines restent encore peu connues. D'une part, les études expérimentales qui portent sur l'ingestion chronique d'un régime hyperprotéique ont en général une durée limitée et ne permettent pas de se prononcer sur les effets à long terme d'un tel régime. D'autre part, les études épidémiologiques qui, elles, pourraient permettre d'étendre la période d'étude sont soumises

à des biais variés et à des effets confondants qui rendent hasardeuse l'obtention de lien de cause à effet (Metges & Barth, 2000).

***Si de nombreuses données concernant les effets métaboliques d'un apport inférieur aux besoins corporels sont disponibles, il y a par contre beaucoup moins de résultats sur les effets à moyen et long terme d'une alimentation riche en protéines :***

Un certain nombre de conséquences favorables ou défavorables des régimes hyperprotéiques ont pu être mises en évidence, mais les résultats sont très controversés, et les données sont d'autant plus difficiles à interpréter que le niveau d'apport protéique, le type de protéine ou la durée d'observation sont très variables d'une étude à l'autre (Tableau 6).

Ainsi, un régime hyperprotéique entraînerait chez le rat en croissance un gain protéique plus important (Thonney & Ross, 1987). L'extrapolation de ces résultats à l'homme adulte pose des problèmes et les conséquences d'un régime hyperprotéique sur la masse maigre chez l'homme restent à être clairement évaluées. Garlick *et al.* (1999) rapportent ainsi que si une alimentation riche en protéines résulte initialement en une rétention protéique accrue, avec un recyclage plus important des protéines corporelles en réponse aux repas, ni la méthode du bilan azoté, ni celle des traceurs isotopiques ne possèdent une sensibilité suffisante permettant de détecter une augmentation des tissus maigres chez l'homme adulte. Il semble par contre que la performance athlétique puisse être améliorée par un régime hyperprotéique (ADA, 2000) et que la combinaison exercice/régime hyperprotéique promeuve la rétention azotée, à condition que l'apport énergétique soit satisfaisant (Metges & Barth, 2000). Une alimentation riche en protéines aurait aussi des effets bénéfiques sur la croissance (Kashyap & Heird, 1994), sur les défenses immunitaires (Durnin *et al.*, 1999), ainsi qu'un effet protecteur contre le développement des maladies cardio-vasculaires (Godfrey & Barker, 2000).

A l'inverse, une corrélation positive entre l'Indice de Masse Corporelle (IMC) et la part des protéines dans l'ingéré énergétique a aussi été rapportée. Toutefois ceci pourrait être dû à une sous-évaluation des apports alimentaires non protéiques d'où un pourcentage faussement élevé attribué aux protéines (Voss *et al.*, 1998). Une consommation élevée de protéines pendant l'enfance a aussi été associée à un développement ultérieur de l'obésité (Rolland-Cachera *et al.*, 1995 ; Parizkova & Rolland-Cachera, 1997). La sensibilité à l'insuline serait diminuée lors de la consommation d'un régime hyperprotéique, avec parallèlement un effet inverse sur la libération de glucose hépatique (Linn *et al.*, 1996).

Un lien existerait aussi entre l'ingestion d'un régime hyperprotéique et un certain nombre de modifications fonctionnelles et morphologiques : augmentation de la vasopressine plasmatique, de la créatinine excrétée, du taux de filtration glomérulaire, hypertrophie rénale ; modifications de l'hémodynamique rénale, production d'eicosanoïdes dans les tubulures rénales (Bankir & Kriz, 1995 ; Brändle *et al.*, 1996 ; Yanagisawa & Wada, 1998). La forte sollicitation de la fonction rénale en régime hyperprotéique fait qu'un régime légèrement hypoprotéique est souvent recommandé aux patients insuffisants rénaux, car il permet un ralentissement de la détérioration des fonctions rénales chez ces patients (Klahr *et al.*, 1994 ; Maroni & Mitch, 1997). Le fait que la croissance des cellules cancéreuses soit stimulée par un milieu de culture à teneur élevée en AA (Clemens, 1994) pose le problème d'une possible stimulation de la carcinogenèse par un régime hyperprotéique. Ainsi, Chow *et al.* (1994) ont montré l'existence d'un lien entre un régime hyperprotéique et une élévation du risque de cancer rénal tout comme De Stephani *et al.* (1999) ont établi une relation entre une alimentation riche en protéines et une augmentation du risque de cancer du tractus digestif supérieur. Une relation entre apport protéique élevé et cancer de la prostate a aussi été suggérée par une étude épidémiologique (Vlajinac *et al.*, 1997). Enfin plusieurs études démontrent une intervention du niveau d'apport protéique élevé dans le développement du cancer colorectal (Parnaud & Corpet, 1997 ; Trichopoulou *et al.*, 1992 ; Potter & McMichael, 1986).

Une surconsommation de protéines provoquerait une augmentation des pertes calciques au niveau rénal via une augmentation de l'oxydation des AA soufrés entraînant une diminution du taux de réabsorption du calcium au niveau des tubulures rénales (Trilok & Draper, 1989). Cette calciurie pourrait avoir des effets néfastes sur les os. Bien que ce résultat reste controversé, certains auteurs ont démontré un effet néfaste du régime hyperprotéique par rapport au risque de fracture de la hanche (Abelow *et al.*, 1992). D'autres, au contraire, démontraient plus récemment un effet bénéfique de ce type de régime (Heaney, 1998 ; Munger *et al.*, 1999). De plus, le risque de formation d'un calcul rénal serait augmenté, la forme la plus commune du calcul rénal étant composée d'oxalate de calcium qui se développe quand les concentrations en calcium et en oxalate sont élevées dans l'urine. Des études ont ainsi démontré que le risque de formation d'un calcul rénal était augmenté de 250% (tous facteurs de risque combinés) lorsque l'apport en protéines alimentaires animales était augmenté (Robertson & Peacock, 1982 ; Robertson *et al.*, 1979).

Enfin, il a été suggéré, chez le lapin, qu'un régime hyperprotéique entraînait une hypercholestérolémie et le développement de plaques d'athérosclérose (Czarnecki & Kritchevsky, 1993) ; mais ce phénomène doit être spécifique à l'espèce, car il n'a pas été



retrouvé chez le rat ou le porc (Luhman & Beitz, 1993 ; Pfeuffer *et al.*, 1998). Chez l'homme, l'analyse des données de la "Nurses Health Study" montre qu'une prise protéique alimentaire élevée n'induit pas d'augmentation du risque cardio-vasculaire, voire entraîne une légère diminution de celui-ci (Hu *et al.*, 1999).

Dans ce contexte, le but des travaux présentés dans cette thèse était d'évaluer les conséquences métaboliques de l'adaptation à un régime hyperprotéique et plus particulièrement de mettre en évidence comment cette adaptation influence la répartition postprandiale de l'azote alimentaire entre les différents pools azotés de l'organisme. L'influence de la qualité de la protéine ingérée a aussi été évaluée. L'utilisation de protéines alimentaires (lait, soja) intrinsèquement marquées avec un isotope stable ( $^{15}\text{N}$ ) a rendu possible l'obtention d'un bilan postprandial du devenir de l'azote alimentaire dans différentes conditions nutritionnelles chez le rat et chez l'homme. Dans une première partie, et afin de situer le contexte scientifique des travaux réalisés, nous présenterons un exposé bibliographique qui montrera quels sont les processus métaboliques connus qui sont impliqués dans la réponse de l'organisme aux variations quantitatives et qualitatives de l'apport protéique alimentaire. Nous nous attacherons à décrire précisément, étape par étape, comment l'organisme s'acclimate aux variations de l'apport protéique exogène. Cette introduction bibliographique est suivie de l'exposé et de la discussion des travaux personnels réalisés.

## **B DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

Lorsque l'apport protéique alimentaire s'élève tout en restant dans des valeurs physiologiques, l'organisme peut s'adapter au nouveau niveau d'apport par une série de phénomènes métaboliques visant à conserver l'homéostasie corporelle, concept évoqué pour la première fois par le physiologiste Claude Bernard (1813-1878) : "*la constance du milieu intérieur est la condition nécessaire à une vie libre et indépendante*".

Les mécanismes métaboliques d'adaptation aux variations de l'apport protéique alimentaire sont complexes. L'adaptation peut être définie comme la capacité de l'organisme à répondre à un changement de situation. Elle résulte en un état fonctionnel mieux adapté au nouvel environnement qui permet finalement le maintien de l'homéostasie corporelle, même si cette adaptation a un coût métabolique. Cette réponse passe aussi par une régulation de la prise alimentaire et un contrôle de l'absorption intestinale, l'ensemble de ces deux phénomènes permettant d'adapter les quantités d'AA entrant dans le système à l'état métabolique de l'organisme.

Enfin, chez l'homme, l'apport protéique alimentaire, qui se fait lors des repas, est discontinu et la phase postprandiale (état nourri) est de première importance dans la gestion du devenir des protéines ingérées. L'utilisation métabolique postprandiale d'une protéine est influencée par le niveau habituel d'apport mais aussi par la qualité propre de la protéine ingérée. Les interactions entre ces deux catégories de facteurs restent à préciser.

### **B.1 ADAPTATION DES PROCESSUS DIGESTIFS ET SPLANCHNIQUES D'ASSIMILATION AUX VARIATIONS DE L'APPORT PROTEIQUE ALIMENTAIRE.**

#### **B.1.1 Vidange gastrique & transit intestinal.**

Les protéines ingérées sont digérées et absorbées dans le tube digestif (Figure 3). La première étape se déroule au niveau gastrique où les protéines sont dénaturées et partiellement dégradées par la pepsine en présence d'HCl. Les produits de cette dégradation sortent progressivement de l'estomac via le pylore et sont libérés dans l'intestin grêle où ils sont hydrolysés par des enzymes pancréatiques et des enzymes de la membrane de bordure en brosse avant d'être finalement absorbés par la muqueuse.

L'équipe de Peraino (1959) a travaillé sur les facteurs alimentaires affectant la digestion de la caséine chez le rat. Dans leurs travaux, les animaux étaient préalablement adaptés à ingérer leur consommation quotidienne de protéines en une période unique de 2 heures, la même tous les jours et à partir d'un régime à 15% de protéines. Le repas test

était composé de 5 grammes de nourriture (exception faite lorsque la taille du repas était la variable testée) et était ingéré en une vingtaine de minutes. Les auteurs se sont intéressés à l'influence de la taille du repas, de sa teneur en protéines (0, 15, 30 ou 50%) et en lipides et de la nature des glucides ingérés en même temps que la caséine (dextrine ou saccharose) sur certains paramètres caractéristiques de la digestion. La figure 4 présente les résultats obtenus concernant la vidange gastrique en fonction de la teneur en protéines du repas, le glucide utilisé étant alors la dextrine.

Les résultats obtenus montraient que plus la teneur en protéines augmentait, plus la vitesse globale de la vidange gastrique du repas test était réduite. La figure 5 représente les quantités d'azote disparaissant du tractus digestif (estomac + intestin grêle) en fonction de la teneur en protéines du régime. Ces quantités étaient très nettement supérieures dans le cas de l'ingestion du régime à 50% de protéines. De plus, les auteurs démontraient aussi qu'un repas de petite taille était plus rapidement évacué par l'estomac qu'un repas plus important. Les auteurs ont avancé différentes explications aux résultats observés : (a) une modification des caractéristiques physiques du régime due à l'augmentation de la teneur en protéines ou (b) le fait qu'une teneur plus élevée en protéines dans l'estomac pourrait avoir un effet tampon plus marqué sur la sécrétion d'HCl par les cellules pariétales, entraînant une baisse de l'activité de la pepsine, le pH de l'environnement gastrique n'étant pas optimal. Les auteurs n'observaient pas d'accumulation d'azote dans la lumière intestinale quelle que soit la condition nutritionnelle, celui-ci étant rapidement absorbé. En fait, le tube digestif semblait capable de digérer et d'absorber des quantités très importantes d'azote alimentaire (par unité de temps après le repas) quand le régime contenait 50% de protéines. L'absorption des AA alimentaires ne semblait donc pas être une étape limitante. La conclusion de cette étude était que le passage des nutriments vers leurs voies d'utilisation corporelles était à la fois fonction du type et de la quantité de nourriture ingérée.

Le contrôle de la vidange gastrique est en fait assuré par la teneur du repas en énergie (Hunt & Stubbs, 1975 ; Jian *et al.*, 1986) et la nature des nutriments absorbés, c'est-à-dire lipidique, glucidique ou protéique (Burn-Murdoch *et al.*, 1978). Hara *et al.* (1992) ont aussi démontré un effet de la nature même de la protéine (caséine vs soja). Boirie *et al.* (1997) ont introduit le concept de "protéines lentes" / "protéines rapides" (comme par exemple caséine vs protéines du lactosérum) en montrant que le ralentissement de la vidange gastrique dans les cas des protéines lentes avait des conséquences sur leur utilisation métabolique ultérieure. Des protéines dites "rapides" seront rapidement évacuées dans l'intestin, et absorbées. D'où une hyperaminoacidémie rapide et importante, mais de courte durée entraînant une augmentation de la synthèse protéique et de l'oxydation des AA

alimentaires sans modification de la dégradation. Au contraire des protéines dites "lentes" seront absorbées beaucoup plus lentement, les concentrations plasmatiques en AA s'élèveront plus lentement mais pour une durée plus importante d'où une faible augmentation de la synthèse protéique, une stimulation modérée de l'oxydation et une nette inhibition de la dégradation protéique. Une protéine digérée plus lentement va être mieux utilisée en phase postprandiale et sera considérée comme de meilleure qualité (Dangin *et al.*, 2001). De même, il a été démontré que la vidange gastrique d'une protéine entière était plus lente que celle d'un mélange d'AA de composition équivalente (Daenzer *et al.*, 2001), ceci pouvant très certainement s'expliquer par la précipitation de la protéine entière dans l'estomac.

Shi *et al.* (1997) ont eux travaillé sur les effets d'une adaptation à un certain niveau d'apport sur la vidange gastrique d'un repas test liquide composé de peptones à 40%. Trois niveaux d'apport ont été évalués : hyperprotéique (55,9 g de protéines pour 100 g de nourriture), normoprotéique (17,0 g de protéines pour 100 g de nourriture) et hypoprotéique (9,2 g de protéines pour 100 g de nourriture). Les auteurs ont démontré, contrairement à Peraino *et al.*, qu'une adaptation à un régime hyperprotéique entraînait une accélération de la vidange du repas test, alors qu'une adaptation à un régime hypoprotéique entraînait au contraire un ralentissement de celle-ci. Enfin, il était montré que 2 semaines au moins étaient nécessaires à la mise en place de ces phénomènes (Figures 6 et 7). Ce résultat n'était observé que sur un repas test composé d'un mélange peptidique, et non sur un repas contenant uniquement du glucose ou de la méthylcellulose.

Le transit intestinal est aussi sensible à la composition en protéines du repas absorbé. Hara *et al.* (1992) ont ainsi démontré que le transit intestinal était plus rapide après l'ingestion d'un repas à base de protéines de soja qu'après un repas à base de caséine. La quantité de protéines ingérées est aussi un facteur intervenant dans le contrôle du transit : Zhao *et al.* (1996 & 1997) ont ainsi démontré, chez le chien équipé de fistules duodénale et mid-intestinale, que plus la dose ingérée était importante, plus le transit intestinal était réduit (Figure 8).

Enfin, plusieurs équipes ont démontré qu'un rétrocontrôle du transit intestinal pouvait être induit par des nutriments au niveau de l'iléon, c'est le "frein iléal" proposé par Read *et al.* (1984) qui postule que la présence d'aliments dans la lumière de l'iléon terminal pourrait stimuler l'absorption des nutriments en retardant le passage de la nourriture dans l'intestin grêle et en permettant donc un allongement du temps d'absorption (Siegle *et al.*, 1990 ; Spiller *et al.* 1984).

### **B.1.2 Enzymes impliquées dans la digestion.**

Les enzymes digestives (pepsine, trypsine, chymotrypsine ...) sont elles aussi sensibles aux caractéristiques du repas ingéré et du régime alimentaire habituel. Ainsi, un régime riche en protéines induit une croissance du pancréas et une stimulation de la sécrétion pancréatique de peptidases. Nishi *et al.* (1998) ont par exemple démontré que la fonction sécrétrice exocrine du pancréas était très fortement stimulée par une perfusion duodénale d'un hydrolysate peptidique de caséine chez des rats ayant subi une déviation du canal pancréatique. L'activité des enzymes digestives pancréatiques est stimulée après 3 jours de régime hyperprotéique (Figure 9). Chez le rat, les teneurs pancréatiques en trypsinogène et chymotrypsinogène sont plus élevées lorsque l'animal consomme un régime riche en AA (7,5 g d'azote.kg<sup>-1</sup>) par rapport à un régime normal (2,5 g d'azote.kg<sup>-1</sup>) (Hara *et al.*, 1995). La cholécystokinine (CCK) produite par les cellules intestinales pourrait être impliquée dans la médiation de ces phénomènes (Hara *et al.*, 2000), sa participation dans une boucle de rétrocontrôle initiée par les protéines alimentaires au niveau des cellules épithéliales semblant établie (Brannon, 1990).

La source protéique alimentaire a aussi un rôle sur la stimulation des enzymes de la digestion. Ainsi, Makkink *et al.* (1994) ont démontré, chez le jeune porc, que le rapport entre l'activité de la trypsine et celle de la chymotrypsine dans le chyme jéjunal était plus élevé chez les animaux ingérant des protéines de soja que chez ceux ingérant des protéines de lait. Une diminution de l'activité de la plupart des enzymes digestives lors de l'ingestion d'un régime à base de protéines de soja a aussi été démontrée chez le veau (Montagne *et al.*, 1999). La quantification de l'azote endogène contenu dans les sécrétions intestinales permet aussi d'évaluer l'effet du repas ingéré sur les enzymes digestives. En effet, celles-ci représentent la majeure partie des protéines endogènes présentes dans la lumière intestinale en période postprandiale. Gaudichon *et al.* (1996) ont ainsi démontré la présence d'enzymes rapidement synthétisées (taux de synthèse moyen égal à 25%.h<sup>-1</sup>), d'origine pancréatique. De plus, il a aussi été montré que le flux d'azote endogène était stimulé lors de l'ingestion d'un repas (Gaudichon *et al.*, 1995),

Les enzymes de la bordure en brosse de l'intestin grêle sont, elles aussi, sensibles au niveau d'apport protéique. Jean *et al.* (2001) ont par exemple démontré, chez le rat, qu'une adaptation à un régime riche en protéines (50% MS) entraînait une augmentation significative de l'activité des enzymes de la bordure en brosse tout le long de l'intestin : ainsi, l'activité de l'aminopeptidase neutre était augmentée de 19%, et celle de la  $\gamma$ -glutamyltransférase de 35%. Des résultats similaires ont été obtenus par Saito & Suda

(1975) pour la leucine aminopeptidase dans le cas d'un régime riche en protéines, par Suzuki *et al.* (1993) pour l'ACE (Angiotensin converting enzyme) et la DPP IV (Dipeptidyl peptidase IV) dans le cas d'un régime riche en proline et par McCarthy *et al.* (1980) pour la peptide hydrolase et les phosphatases alcalines, surtout au niveau iléal dans le cas d'un régime riche en protéines chez le rat.

La modulation des cinétiques digestives constitue donc chronologiquement la première étape permettant de répondre à une variation de l'apport protéique alimentaire. La zone splanchnique est ensuite impliquée et joue un rôle majeur, celui de « zone tampon » dans la régulation des effets d'une modification de l'apport protéique alimentaire.

### **B.1.3 Absorption et utilisation des AA par les cellules de l'épithélium intestinal.**

De multiples systèmes de transport épithélial des AA énergie-dépendants ont été découverts. Il existe à la fois des systèmes sodium-dépendants et des systèmes sodium-indépendants. Plusieurs systèmes neutres de transport co-existent au niveau de la bordure en brosse (L, NBB ou B, IMINO,  $\gamma^+$  et PHE).

La majeure partie des AA et des peptides issus de la digestion des protéines alimentaires est absorbée au niveau de l'intestin proximal via les systèmes de transport épithélial. L'absorption des peptides est la forme majeure d'absorption des AA alimentaires et représente 67% de l'absorption totale d'AA. Les systèmes de transport intestinal des AA sont sensibles au niveau d'apport protéique. Ainsi, une variation de l'apport en protéines entraînerait une variation de l'activité des systèmes de transport des AA libres et des petits peptides. Karasov *et al.* (1987) ont par exemple démontré que, chez le rat, les captations de proline et d'aspartate étaient diminuées de 23 et 43%, respectivement, après 14 jours d'un régime à 4% de protéines (par rapport à un régime à 18% de protéines) au niveau de l'intestin médian. Par contre, la captation de leucine était augmentée (+37%). Au niveau de l'intestin proximal, la captation d'histidine était stimulée (+66%). Aucune modification n'était observée en ce qui concerne la lysine, l'alanine ou la méthionine. Le transport des petits peptides est aussi stimulé par un régime hyperprotéique, comme montré pour la carnosine (dipeptide,  $\beta$ -alanine – histidine, issu de la digestion des viandes) au niveau du duodénum et du jéjunum de souris soumises à un régime contenant 72% de protéines (par rapport à un régime apportant 18% de protéines) (Ferraris *et al.*, 1988).

Les mécanismes permettant l'adaptation de l'absorption intestinale aux apports alimentaires restent encore peu connus même s'il a, par exemple, été prouvé chez le rat

qu'une adaptation de 14 jours à un régime hyperprotéique (50% de protéines) se traduisait par une augmentation (de 1,5 à 2 fois) de la quantité d'ARNm codant pour un transporteur d'AA présent dans l'intestin grêle du rat (Erickson *et al.*, 1995). Il semble aussi que les protéines alimentaires entraînent une stimulation de l'activité du transporteur de peptide PepT1 via l'activation de la transcription du gène codant pour cette molécule (Shiraga *et al.*, 1999).

Les cellules épithéliales utilisent une part non négligeable des AA alimentaires absorbés pour leur métabolisme propre. Ainsi, par exemple, depuis les travaux de Windmueller et son équipe (Windmueller & Spaeth, 1975 ; Windmueller & Spaeth, 1976 ; Windmueller, 1982), il a été clairement établi que plus de 95% du glutamate et de la glutamine étaient utilisés par les cellules épithéliales comme principales sources énergétiques (Stoll *et al.*, 1999b ; Reeds *et al.*, 2000). D'autres AA sont aussi utilisés dans les voies cataboliques des cellules épithéliales (Figure 10). L'autre voie d'utilisation des AA alimentaires par les cellules épithéliales est celle des synthèses – de protéines (lipoprotéines, enzymes digestives, hormones) ou d'autres composés azotés tels que le glutathion, des AANI (proline, alanine) ou de l'urée. Les synthèses protéiques utilisent principalement des AA extracellulaires et donc d'origine soit luminale (et donc en partie alimentaire), soit artérielle. Le tableau 7 présente les données de FSR (Fractional Synthesis Rate) obtenues par différentes équipes. La grande variabilité des résultats obtenus montre l'importance du modèle choisi, de l'âge de celui-ci, de la méthode utilisée ou encore du site de prélèvement choisi, en effet il existe un gradient décroissant du FSR le long de l'intestin (Figure 11). L'influence du régime et tout particulièrement de l'apport protéique alimentaire sur les taux de synthèses protéiques de la muqueuse intestinale n'a été que peu étudiée. Toutefois, l'ingestion d'un repas n'a pas d'influence aiguë sur le FSR des protéines de la muqueuse intestinale (Bouteloup-Demange *et al.*, 1998). D'autre part, si 30 jours d'un régime hypoprotéique (8% MS) entraînent une diminution du FSR par rapport à un régime à teneur adéquate en protéines (17% MS), celui-ci passant de 105 à 87%.j<sup>-1</sup>, la consommation d'un régime hyperprotéique (30% MS) n'entraîne pas de modification du taux de synthèse (107%.j<sup>-1</sup> vs 119%.j<sup>-1</sup>, P>0,05) chez le rat Zucker maigre (Masanès *et al.*, 1999).

#### **B.1.4 Métabolisme hépatique.**

Le foie est le site majeur du métabolisme des AA après l'ingestion d'un repas. Cet organe assure le contrôle du passage des AA vers la périphérie en fonction des besoins de l'organisme. Ainsi, par exemple, un apport alimentaire excessif en certains AA entraînera leur

orientation privilégiée vers les voies du catabolisme, avec une adaptation des systèmes de transport et enzymes impliqués. Dans des conditions nutritionnelles et physiologiques normales, 57% des AA qui sont captés par le foie sont catabolisés, 20% sont utilisés dans les synthèses protéiques (14% pour les protéines hépatiques constitutives et 6% pour celles qui passeront dans la circulation sanguine telles l'albumine et le fibrinogène) (Groff *et al.*, 1991). Les 23% restant sont les AA qui passent directement dans la circulation sanguine générale sans être métabolisés au niveau hépatique et sont surtout des AACLR, le foie n'ayant que très peu d'enzymes permettant leur catabolisme.

Il faut souligner la compartimentation fonctionnelle et métabolique du foie. En effet, les hépatocytes qui sont regroupés en acini périverseux ou périportaux ne possèdent pas le même équipement enzymatique en fonction de leur positionnement. Ainsi, la synthèse d'urée, la néoglucogénèse, la synthèse d'albumine et de fibrinogène et la dégradation de la glutamine ont lieu dans les acini périportaux alors que la glycolyse, la synthèse d' $\alpha$  1-antitrypsine et de  $\alpha$ -fétoprotéine ou la synthèse de glutamine ont lieu dans les acini périverseux, la délimitation des zones étant plus ou moins stricte en fonction de la voie métabolique considérée (Tableau 8 ; Jungermann & Kietzmann, 1996). Par exemple, la frontière entre synthèse d'urée et de glutamine est très stricte, une même cellule ne pouvant contenir à la fois la carbamoylphosphatase synthétase (enzyme du cycle de l'urée) et la glutamine synthétase qui assure la synthèse de la glutamine (Haüssinger, 1990). En fait, la glutamine synthétase des acini périverseux pourrait être considérée comme un "éboueur" qui assurerait l'utilisation des molécules d'ammoniac ayant échappé à la synthèse d'urée dans les acini périportaux.

#### *B.1.4.1 Transport & flux hépatiques d'acides aminés.*

Le rôle de l'étape de transport hépatique des AA dans la régulation de leur devenir reste encore peu connu même s'il a été démontré pour deux AA (alanine et glutamine) que leur taux de transport participait à la régulation de leur métabolisme hépatique (Fafournoux *et al.*, 1990). En fait, la régulation de cette étape dépend à la fois du gradient de concentrations de part et d'autre de la membrane et de l'activité des systèmes de transport.

Les systèmes hépatiques de transport des AA sont, pour la plupart, les mêmes que ceux précédemment décrits au niveau intestinal : A, L et ASC sont les principaux ; les systèmes  $X_{A,G-}$ , Gly et  $\gamma^+$  sont aussi présents. Il existe, de plus, d'autres systèmes plus spécifiques tels que les systèmes N (pour la glutamine, l'asparagine et l'histidine) et  $X_C$  (pour les AA anioniques). Les études portant sur les systèmes hépatiques de transport des AA sont généralement réalisées sur des hépatocytes isolés ou sur des vésicules membranaires.



Plusieurs études ont porté sur l'effet du niveau d'apport protéique alimentaire sur l'activité des systèmes de transport hépatique. Il a ainsi été démontré une nette stimulation des systèmes hépatiques de transport des AA chez des animaux adaptés à un régime hyperprotéique (50 à 70% de protéines). Le tableau 9 présente les résultats obtenus par Fafournoux *et al.* (1990). Une nette stimulation des systèmes A, N, Gly, anionique, T et  $\gamma^+$  était observée chez des animaux ayant ingéré un régime à 60% de protéines pendant 21 jours. Des résultats semblables ont été retrouvés par Jean *et al.* (2001) qui démontraient *in vitro*, sur des hépatocytes périportaux prélevés chez des rats adaptés à un régime à 50% de protéines pendant 15 jours, un doublement de la captation de glutamine et une multiplication par 3 de la captation d'alanine. Rémésy *et al.* (1988) ont eux aussi mis en évidence une stimulation du système de transport de la glutamine, chez des rats adaptés à un régime à 70% de protéines, les valeurs obtenues étant de  $2,88 \pm 0,20$  et  $4,48 \pm 0,36$   $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  cellules de foie chez des animaux ingérant un régime à 15 et 70% de protéines, respectivement ( $P < 0,05$ ).

Cette activation des systèmes de transport hépatique entraîne une modification des flux hépatiques d'AA. Ainsi, pour un certain nombre d'entre eux, le foie est un organe producteur pendant la phase post-absorptive, et devient un organe consommateur en phase postprandiale, la quantité captée étant fonction de la teneur en protéines du régime (Figure 12). Chez les animaux ingérant un régime normoprotéique, il est observé une captation non négligeable d'alanine ; celles de proline, glycine, sérine et thréonine étant plus faibles. Simultanément, le foie libère de la glutamine et du glutamate. Chez les animaux adaptés au régime hyperprotéique, tous les AA sont captés, le foie n'en libérant plus ; l'alanine, la proline et la glutamine sont les AA pour lesquels les flux d'entrée sont les plus forts, viennent ensuite les autres AA néoglucogéniques (sérine, glycine, thréonine et asparagine). Seuls les AACLR sont peu captés. Ces flux d'AA vers le foie sont essentiels quant au devenir des AA alimentaires et conditionnent leur utilisation splanchnique et donc finalement leur disponibilité pour les organes périphériques.

#### *B.1.4.2 Transaminations, désaminations et cycle de l'urée*

Le foie est le site majeur du catabolisme de la plupart des AA, seuls les AACLR sont catabolisés principalement au niveau du muscle squelettique.

La première étape de la dégradation des AA consiste généralement en l'enlèvement de leur groupement amine ( $-\text{NH}_3$ ) par transamination ou par désamination. Il a été clairement démontré que les déshydrogénases (nom donné aux "désaminases" car la

désamination entraîne la formation d'une molécule d'eau) et transaminases impliquées dans ces réactions étaient sensibles au niveau d'apport protéique, un niveau d'apport élevé entraînant une augmentation de leur activité (Tableaux 10 et 11, Figure 13) permettant au système hépatique de dégradation des AA de répondre à un apport exogène excédant les besoins corporels. Cette stimulation de l'activité des enzymes de dégradation des AA a été démontrée dès le premier repas hyperprotéique. Ainsi, la glutaminase, qui catalyse l'hydrolyse de la glutamine en glutamate et ammoniac, et le système de clivage de la glycine sont stimulés dès le premier repas riche en protéines (Ewart *et al.*, 1992 ; Ewart & Brosnan, 1993). La glutaminase est très fortement associée au cycle de l'urée, car elle génère de l'ammoniac qui est directement utilisé par la carbamoyl-phosphate synthase 1 (CPS-1).

Le cycle de l'urée met en jeu plusieurs AA tels que l'arginine qui est son précurseur immédiat, l'ornithine et la citrulline et de nombreuses enzymes (Figure 14). Il se déroule de part et d'autre de la membrane mitochondriale. L'urée produite est libérée dans le sang pour rejoindre les reins et être excrétée dans l'urine. Elle diffuse aussi librement dans toute l'eau corporelle et une partie se retrouve dans le lumen du côlon pour y être dégradée par les uréases bactériennes. Les principales enzymes impliquées dans ce cycle sont la Carbamoyl-phosphatase 1 (CPS-1), l'Ornithine Transcarbamoylase (OTC), l'Argininosuccinate synthetase, l'Argininosuccinate lyase et l'Arginase, les deux premières étant des enzymes mitochondriales et les trois dernières des enzymes cytosoliques.

Ces enzymes sont sensibles à l'alimentation, leurs activités étant par exemple clairement stimulées par un apport élevé en protéines (Tableau 11) que ce soit en phase post-absorptive ou postprandiale (CPS-1, Rémésy *et al.*, 1997). Schimke (1962) a par ailleurs démontré que, dans le cas d'un passage d'un régime normoprotéique (15% de protéines) à un régime hyperprotéique (60% de protéines) chez le rat, 4 jours seulement étaient nécessaires pour que l'OTC et la CPS-1 atteignent leurs activités maximales. En ce qui concerne l'Arginase, par contre, 8 jours étaient nécessaires. Une augmentation des concentrations en enzymes dans le tissu hépatique était parallèlement observée.

Cette stimulation des enzymes du catabolisme des AA se traduit logiquement par une augmentation de la quantité d'urée produite, puis excrétée dans les urines, que ce soit chez l'animal (Schimke, 1962) ou chez l'homme (Young *et al.*, 2000). La stimulation de l'oxydation des AA est la première réponse de l'organisme à l'augmentation de la teneur en protéines du régime. Elle intervient en effet très rapidement après le début de l'ingestion du régime hyperprotéique (Garlick *et al.*, 1999). De plus, comme il existe des variations de l'excrétion azotée au cours de la journée, cette stimulation est encore plus prononcée en phase

postprandiale (Tomé & Bos, 2000). Young *et al.* (2000) ont ainsi rapporté l'existence d'une relation linéaire positive ( $r=0,98$  et  $P<0,01$ ) entre le taux de production d'urée et l'apport azoté alimentaire (Figure 15). La quantité d'urée excrétée est, elle aussi, augmentée lorsque l'apport protéique augmente, tout comme la quantité d'urée hydrolysée, même si pour ce paramètre, les variations interindividuelles sont très importantes (Tableau 12). La quantité d'urée hydrolysée est calculée comme la différence entre la quantité d'urée produite et la quantité d'urée excrétée. Cette hydrolyse est réalisée par la microflore intestinale et produit des ions  $\text{NH}_4^+$  qui sont soit perdus dans les fèces sous forme d'azote libre ou d'ammoniac (Moran & Jackson, 1990 ; Wrong *et al.*, 1985), incorporés dans les protéines bactériennes (Metges *et al.*, 1999c), ou encore absorbés au niveau intestinal et incorporés dans le pool d'azote métabolique (Giordano *et al.*, 1968 ; Metges *et al.*, 1996, 1999c ; Niiyama *et al.*, 1979).

Forslund *et al.* (1998) ont démontré, chez l'homme, une multiplication par 2,6 de l'excrétion totale d'azote et par 3 de l'azote excrété sous forme d'urée urinaire lorsque l'apport alimentaire protéique habituel augmentait de 1 à 2,5  $\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Jackson *et al.* (1999) qui démontraient une constance de la production d'urée pour des apports protéiques alimentaires variant entre 0,5 et 2,2  $\text{g de protéines.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . La particularité de ces derniers résultats reste d'ailleurs inexpiquée.

La quantité d'azote ingéré n'est pas le seul facteur alimentaire influençant la production d'urée, la nature de la protéine est aussi impliquée. Ainsi, Deutz *et al.* (1998) ont mis en évidence une production d'urée hépatique accrue ( $+13 \mu\text{mol.kg PC}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) lors d'une perfusion gastrique de protéines de soja par rapport à une perfusion de caséine (Figure 16), phénomène à mettre en relation avec la qualité nutritionnelle moindre des protéines de soja. Ce résultat peut aussi s'expliquer par la différence de composition en AA entre les 2 protéines (la teneur en méthionine du soja est très faible), d'où un déséquilibre des teneurs splanchniques d'AA et une oxydation stimulée dans le cas du soja. Ainsi, l'ingestion d'un régime déficient en un AAI stimule les voies cataboliques splanchniques par rapport à ce qui est observé lors de l'ingestion d'un régime supplémenté (Nimni & Bavetta, 1961). Une autre explication, mise en évidence par Fouillet *et al.* (2002), repose sur le fait que les cinétiques digestives des protéines de lait et de soja sont différentes, les vidanges gastriques sont les mêmes mais le transit intestinal est réduit dans le cas des protéines de lait, d'où une absorption différée. L'arrivée plus rapide, dans le cas des protéines de soja, des AA issus de la digestion dans le système, serait à l'origine de la plus forte désamination observée. Cette différence de cinétiques pourrait être due à la libération, dans le cas du lait, de peptides

opioïdes issus de la caséine qui ralentiraient la motilité gastro-intestinale (Daniel *et al.*, 1990).

#### B.1.4.3 Cétogénèse et néoglucogénèse.

Le squelette carboné (ou  $\alpha$ -cétoacide) peut être utilisé dans 2 voies métaboliques (Figure 17) : (1) le cycle carboxylique de Krebs afin de produire de l'énergie ou, (2) dans des voies de synthèse (glucose principalement, acides gras dans certaines conditions). Ainsi, la néoglucogénèse permet la production de glucose qui pourra être stocké sous forme de glycogène dans le foie ou dans le muscle, et sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Il est en fait possible de partager les AA arrivant au foie en deux groupes selon leur devenir (Eastwood, 1997) : ceux utilisés pour la production d'énergie via le cycle de Krebs sont dits cétogéniques (par exemple, la leucine et la lysine le sont totalement alors que la phénylalanine, la tyrosine, l'isoleucine et le tryptophane le sont partiellement), et ceux utilisés pour la néoglucogénèse sont dits glucogéniques.

Les protéines fournies par le repas auraient un effet stimulateur sur la sécrétion postprandiale d'insuline. Les protéines alimentaires influencent la glycémie d'abord par leur action sur l'insuline et les hormones contre-régulatrices, mais aussi par l'apport de substrat pouvant être potentiellement utilisé par le foie pour la synthèse de glucose. Linn *et al.* (2000) ont ainsi démontré que la fraction de glucose circulant issue de la néoglucogénèse, mesurée après 14 heures de jeûne, était significativement augmentée chez des adultes sains consommant habituellement un régime riche en protéines ( $1,81 \text{ g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) par rapport à des volontaires ayant un apport protéique habituel plus faible ( $0,71 \text{ g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ) (63,1 vs 45,2%, respectivement,  $P < 0,05$ ). Ces auteurs concluaient ainsi à une stimulation du turn-over du glycogène hépatique par un régime riche en protéines. Khan *et al.* (1992) ont calculé, chez l'homme, après l'ingestion d'un repas contenant 50g de protéines, que l'urée produite provenait de l'oxydation de 58,5% des protéines ingérées et que la quantité de glucose apparaissant dans la circulation sanguine et issue du métabolisme hépatiques des AA représentait 43% de la quantité de protéines métabolisées, soit 23% des protéines ingérées. Le devenir des squelettes carbonés des autres AA ayant été métabolisés au niveau hépatique n'était pas précisé. *In vitro*, Lavoine *et al.* (1987) ont mis en évidence un effet direct de la glutamine du milieu de culture des hépatocytes sur la glycogène synthase. Enfin, le rôle prédominant de l'alanine dans la néoglucogénèse à partir des dérivés issus de la dégradation des AA alimentaires a été démontré (Jungermann & Kietzmann, 1996).

#### B.1.4.4 Synthèses protéiques hépatiques.

Deux types de protéines sont synthétisées au niveau hépatique. Les premières sont les protéines constitutives du foie (dont des enzymes hépatiques), les secondes sont des protéines qui sont sécrétées dans la circulation sanguine, la plus abondante étant l'albumine; mais nous pouvons aussi citer la préalbumine, la "retinol-binding protein" et les protéines impliquées dans la coagulation sanguine (fibrinogène) (Tableau 13). La concentration totale en protéines plasmatiques chez l'homme est normalement de 75 g.l<sup>-1</sup> (Groff *et al.*, 1995). Ce sont majoritairement des glycoprotéines, mais certaines sont des protéines simples ou des lipoprotéines. Le tableau 14 présente les taux de synthèse (FSR) des différentes protéines hépatiques, chez l'animal et chez l'homme. Il faut noter que la zone splanchnique (et surtout le foie) représente une part très importante (soit 25 à 27%) de la synthèse protéique corporelle totale (Stoll *et al.*, 1998 ; Tessari *et al.*, 1996a).

L'augmentation de la synthèse protéique au niveau du foie en phase postprandiale a été mise en évidence par la détection d'une augmentation de l'agrégation des polyribosomes observée après un repas (Munro & Crim, 1988). La capacité de synthèse protéique hépatique est significativement augmentée à l'état nourri (Yu *et al.*, 1990). Cette conclusion est toutefois en contradiction avec celle rapportée par Beaufrère (1992) qui propose que la dégradation protéique soit le facteur de régulation majeur au niveau hépatique, la synthèse n'étant que peu sensible aux variations de l'apport. Ce résultat avait d'ailleurs été démontré en 1973 par Garlick *et al.* qui n'observaient pas de variations du FSR des protéines constitutives du foie après un repas ou après 48 heures de jeûne. L'effet d'une variation de l'apport alimentaire sur la synthèse protéique hépatique reste donc à être clairement établi.

En ce qui concerne les protéines sécrétoires et tout particulièrement l'albumine et le fibrinogène, il a été établi par plusieurs équipes que l'ingestion d'un repas provoquait la stimulation de la synthèse d'albumine (de 56 à 89%) mais pas de celle du fibrinogène (De Feo *et al.*, 1992 ; Cayol *et al.*, 1996). Cette augmentation du taux de synthèse de l'albumine n'est pas le résultat de la seule augmentation de la disponibilité en substrats et en nutriments vu que la synthèse d'une autre protéine, le fibrinogène, n'est pas stimulée. La spécificité de cette réponse anabolique implique une régulation hormonale, l'insuline étant très certainement l'hormone impliquée dans cette régulation (De Feo *et al.*, 1992). En effet, (1) le FSR de l'albumine est positivement corrélé à l'augmentation de l'insuline plasmatique, (2) l'injection (chez le rat) ou la perfusion (chez l'homme) d'insuline stimulent la synthèse d'albumine, et (3) l'induction d'une courte déficience en insuline chez l'homme entraîne une diminution de 30% du FSR de l'albumine. Cette stimulation postprandiale de l'incorporation des AA (alimentaires pour la plupart) dans l'albumine pourrait être un moyen de sauvegarder

une partie de l'apport azoté alimentaire en évitant qu'il soit majoritairement utilisé dans les voies cataboliques et de permettre ainsi une temporisation des pertes oxydatives des AA (et des AAI en particulier) lorsqu'ils sont apportés en excès par rapport aux besoins immédiats des synthèses corporelles.

Peu d'études ont porté sur l'influence de la teneur en protéines du régime sur la synthèse hépatique de protéines constitutives. Il semblerait toutefois qu'elle soit stimulée par un apport hyperprotéique et inhibée dans le cas d'un régime hypoprotéique. Ainsi, Eisenstein & Harper (1991) ont estimé le taux de synthèse protéique, *in vitro*, chez le rat en fonction du niveau protéique du régime (Figure 18) et une relation existerait entre le pourcentage de caséine dans le régime et le taux de synthèse, l'inhibition par les régimes hypoprotéiques étant plus marquée que la stimulation par les régimes hyperprotéiques. Hayase *et al.* (1998) retrouvent les mêmes résultats : le FSR des protéines hépatiques est de  $60,2\%.j^{-1}$  chez des rats soumis à un régime sans protéines, il atteint  $77,6\%.j^{-1}$  chez des animaux ingérant un régime à 5% de protéines et  $86,9\%.j^{-1}$  pour un régime à 20% de protéines. Masanès *et al.* (1999) ont mis en évidence une augmentation significative du FSR des protéines hépatiques lorsque le régime augmentait de 17 à 30% de protéines ( $52,1$  et  $65,3\%.j^{-1}$ , respectivement). Par contre, ils ne démontraient pas d'effet significatif d'une diminution de la teneur en protéines du régime de 17 à 8%.

L'origine des AA utilisés dans les synthèses protéiques hépatiques est un autre sujet de recherche important. En effet, le sang qui irrigue le foie arrive soit par la voie portale soit par la voie artérielle et les AA peuvent donc être d'origine alimentaire (veine porte) ou systémique (artère). La protéolyse hépatique fournit, elle aussi, des AA pouvant être ensuite utilisés dans les synthèses. Stoll *et al.* (1999a) ont mis en évidence que la phénylalanine d'origine portale était préférentiellement utilisée dans les synthèses de protéines constitutives, chez le porcelet à l'état nourri. C'est aussi le cas pour les protéines exportées (Bozzetti *et al.*, 1993). De plus, il y aurait une utilisation préférentielle des AA nouvellement apportés par les repas par rapport à une réutilisation des AA issus de la dégradation des protéines hépatiques, ceux-ci étant exportés. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le taux de synthèse soit nettement plus élevé dans les hépatocytes périportaux, et donc l'utilisation préférentielle des AA d'origine portale serait le reflet de la domination de la synthèse protéique hépatique par ces cellules.

Les rôles du tractus digestif et de la zone splanchnique sont donc essentiels dans la gestion des variations de l'apport alimentaire. C'est à leur niveau que se mettent en place différents processus visant à minimiser les répercussions des variations de l'apport

alimentaire sur les zones de l'organisme. Toutefois, il existe tout de même des réponses spécifiques du métabolisme non-splanchnique lorsque l'apport protéique alimentaire est modifié.

## **B.2 ADAPTATION DU METABOLISME INTERMEDIAIRE ET DES ZONES PERIPHERIQUES CORPORELLES A DES VARIATIONS QUALITATIVES & QUANTITATIVES DE L'APPORT PROTEIQUE ALIMENTAIRE.**

### **B.2.1 Acides aminés plasmatiques.**

Le foie contrôle le passage des AA dans la circulation générale et donc leur disponibilité pour les organes périphériques. Ce mécanisme ne permet toutefois pas d'éliminer complètement tous les AA apportés en excès par rapport aux besoins des tissus de la zone périphérique chez les organismes non adaptés. En conséquence, les concentrations plasmatiques d'un certain nombre d'AA augmentent lorsque les quantités apportées par l'alimentation sont supérieures aux besoins (Figure 19). Après une période d'adaptation au cours de laquelle les systèmes de dégradation des AA voient leur activité augmenter, les concentrations de la plupart des AA retournent à des valeurs physiologiques normales (Adibi & Mercer, 1973 ; Anderson *et al.*, 1968). Seuls les AACLR restent à un niveau élevé (Colombo *et al.*, 1992). En effet, ceci est la conséquence de la faible activité de dégradation de ces AA au niveau hépatique, les AACLR alimentaires passant pratiquement intacts dans la circulation sanguine générale pour être utilisés au niveau musculaire principalement. La figure 20 présente des résultats combinant à la fois l'effet du niveau usuel d'apport en protéines (les animaux sont adaptés pendant 12 jours) et ceux de la teneur en protéines du repas (les mesures sont réalisées 1 heure après le début de celui-ci). En ne considérant que les résultats obtenus pour des apports supérieurs aux besoins, les variations les plus sensibles sont observées pour les AAI, et plus particulièrement pour les AACLR. Le comportement de la thréonine est à remarquer, avec une baisse sensible quand le niveau d'apport protéique augmente.

Il est très difficile de corrélérer les variations de concentrations plasmatiques en AA à la composition en AA de la protéine ingérée. En effet, de très nombreux facteurs entrent en jeu : cinétiques gastriques, absorption intestinale, utilisation des AA par les cellules de la muqueuse intestinale à des fins énergétiques et pour la synthèse de composés azotés, utilisation hépatique (désamination et synthèse protéique). Tous ces phénomènes font que les concentrations plasmatiques en AA ne reflètent pas forcément la composition de la protéine alimentaire.

## **B.2.2 Métabolisme des acides aminés dans le muscle squelettique.**

Le muscle squelettique est le principal organe périphérique pour l'utilisation des acides aminés. En effet, il représente à peu près 40% de la masse corporelle totale chez l'homme adulte sain (Tessari *et al.*, 1996b) et 45% chez le rat Wistar (P. C. Even, UPNCA, données personnelles). Longtemps considéré seulement comme un stock de protéines pouvant être mobilisées dans les périodes de jeûne par exemple, il est maintenant clairement établi que son rôle métabolique est beaucoup plus complexe, notamment en ce qui concerne le métabolisme de certains AA tels les AACLR.

### *B.2.2.1 Effet d'un apport exogène d'acides aminés ou de protéines.*

L'effet anabolique d'une ingestion ou d'une perfusion d'AA sur les protéines musculaires a été clairement établi par plusieurs équipes (Bennett *et al.*, 1990 ; Watt *et al.*, 1992 ; Tessari 1996b ; Blomstrand & Saltin, 2001). Cet effet peut être la conséquence (1) d'une stimulation de la synthèse protéique uniquement, (2) d'une inhibition de la dégradation protéique uniquement ou encore (3) d'une combinaison des 2 phénomènes. Il y aurait en fait une nette stimulation de la synthèse accompagnée d'une légère inhibition de la dégradation, mais ces résultats restent discutés et ce d'autant plus que certaines limites méthodologiques se posent, surtout chez l'homme (Wolfe, 2000a).

Le tableau 15 présente les taux de synthèse des protéines musculaires mesurés à jeun. Le tableau 16 et les figures 21 et 22 présentent les résultats obtenus par différentes équipes travaillant chez l'animal ou chez l'homme et évaluant l'effet d'un apport en AA ou en protéines (par perfusion ou ingestion) sur le taux de synthèse (FSR) des protéines de muscle squelettique. La plupart des études ont mis en évidence une élévation significative – de 1,5 à 3 fois – du FSR des protéines musculaires lors du passage d'un état post-absorptif (ou de jeûne) à un état nourri. De même, *in vitro*, l'ajout d'AA, et tout particulièrement de AACLR ou de leucine seule, au milieu d'incubation d'échantillons de muscle squelettique entraîne une augmentation de la synthèse protéique (Dardevet *et al.* 2000). L'apport en nutriments n'a un effet qu'à la condition de contenir des AA (ou des protéines) comme le montrent les expériences de Botbol & Scornik (1997) et de Yoshizawa *et al.* (1998) chez la souris. De plus, il y a une latence dans la réponse à la disponibilité accrue en AA. Bohé *et al.* (2001) ont ainsi montré, chez l'homme, qu'aucune stimulation de la synthèse n'était observable pendant les 30 premières minutes d'une perfusion d'AA. Ces résultats ont été établis aussi bien sur les protéines mixtes musculaires que sur chaque type de protéines individuellement (protéines



myofibrillaires, sarcoplasmiques ou mitochondriales) (Figure 23). Les auteurs expliquaient ce retour du taux de synthèse à un niveau basal, malgré une disponibilité accrue en AA, par un phénomène dit de "protéino-stat" (Millward, 1995) impliquant que, chez l'adulte, une fois que les réserves musculaires sont revenues à leur niveau habituel, la synthèse protéique cesse.

Toutefois, certains travaux n'ont pas mis en évidence de stimulation de la synthèse protéique après un apport d'AA ou de protéines. Ainsi, Nair *et al.* (1992) n'ont pas montré de stimulation de la synthèse protéique musculaire chez l'homme en situation post-absorptive lors d'une perfusion de leucine seule, l'explication proposée était que les autres AA étaient limitants car absents de la perfusion. De même, McNurlan *et al.* (1993) n'ont pas mis en évidence de stimulation de la synthèse protéique musculaire chez l'homme après ingestion d'un repas mixte tout comme Zhang *et al.* (1998) chez le lapin subissant une perfusion d'AA.

Parallèlement, il y aurait une inhibition plus ou moins prononcée de la protéolyse musculaire que ce soit après l'ingestion d'un repas contenant des protéines (Tessari *et al.*, 1996b ; Yoshizawa *et al.*, 1997) ou lors de la perfusion de leucine seule (Nair *et al.*, 1992) ou d'un mélange d'AA (Louard *et al.*, 1990). Selon les études, la protéolyse est réduite de 12 à 30% dans ces conditions. La figure 23 présente les résultats obtenus par Botbol & Scornik (1997) sur des muscles de la paroi abdominale de souris et montre que l'inhibition de la protéosynthèse (- 53%) et la stimulation de la protéolyse (+ 62%) observées chez des animaux à l'état post-absorptif sont totalement supprimées après 3,5 heures de ré-alimentation. Il existe toutefois des données discordantes venant contredire ces résultats : Scornik *et al.* (1997) ont certes montré une diminution de la protéolyse musculaire lors de l'ingestion d'un repas (contenant uniquement de l'amidon : -24%), mais l'ajout de caséine à ce repas n'entraînait pas d'augmentation significative de l'inhibition (-30%,  $P > 0,05$ ). Les auteurs suggéraient que, en fait, l'inhibition de la protéolyse était déjà maximale avec l'apport en amidon d'où une absence d'effet de la charge supplémentaire en AA.

Les mécanismes contrôlant cette réponse du métabolisme musculaire à un apport en AA ou en protéines sont encore peu connus. Les AA et/ou l'insuline pourraient être les principaux acteurs de ce contrôle.

#### *B.2.2.2 Mécanisme de contrôle de la synthèse protéique musculaire.*

Une perfusion d'AA entraîne, au niveau du muscle, une augmentation du transport d'AA vers l'intérieur des cellules (Figure 24) en relation avec une augmentation du flux d'AA (flux sanguin  $\times$  concentration) irriguant le muscle. De plus, il existe une corrélation entre le

taux d'apparition des AAI au niveau intracellulaire et la protéosynthèse musculaire, la disponibilité intracellulaire en AA pouvant donc être impliquée dans le contrôle du métabolisme protéique, avec un rôle prépondérant des AACLR et de la leucine tout particulièrement.

#### B.2.2.2.1 Par les acides aminés à chaîne latérale ramifiée et par la leucine tout particulièrement?

Le rôle particulier des AACLR et surtout de la leucine comme stimulateurs de la protéosynthèse musculaire a été mis en évidence *in vitro* dès les années 70. Ainsi, il a été montré que l'ajout d'un mélange de valine, isoleucine et leucine dans un milieu de culture d'hémi-diaphragmes de rat isolés stimulait l'incorporation de <sup>14</sup>C-lysine dans les protéines. Un ajout de valine seule n'avait pas d'effet, d'isoleucine seule avait un effet inhibiteur et de leucine seule stimulait la protéosynthèse (Buse & Reid, 1975). Depuis, le rôle essentiel de la leucine dans la stimulation de la synthèse protéique musculaire a été clairement établi.

Un certain nombre de données concernant les mécanismes d'action de la leucine au niveau des cellules musculaires sont maintenant disponibles. Le taux de synthèse protéique est déterminé par le nombre de ribosomes présents dans la cellule et par l'efficacité de chaque ribosome. Les modifications aiguës du statut nutritionnel, telles qu'observées en phase postprandiale, n'ont pas d'effet sur la teneur du tissu en ribosomes mais stimulent leur efficacité de traduction. L'initiation de la traduction des ARNm est un processus complexe comprenant de nombreuses étapes et qui nécessite la présence d'une douzaine de facteurs eucaryotes d'initiation (eIF). Le facteur eIF4 est nécessaire à l'étape de reconnaissance et de déroulement de l'ARNm qui permet sa liaison au ribosome 40S. Il a été démontré que l'action stimulatrice de la leucine se situait à ce niveau, l'AA stimulant l'initiation de la traduction par une stimulation de la formation du complexe actif eIF4F, et plus généralement en stimulant à la fois l'activité et la synthèse des protéines impliquées dans la traduction des ARNm (Anthony *et al.*, 2000, 2001). Cette voie de stimulation impliquerait aussi la protéine kinase mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin), (Figure 25).

#### B.2.2.2.2 Par l'insuline?

Les résultats concernant l'implication de l'insuline dans le contrôle du métabolisme protéique musculaire sont très controversés. Si, *in vitro*, l'ensemble des études réalisées semble prouver l'existence d'un effet stimulant de l'insuline sur la synthèse protéique

musculaire, cela n'est pas le cas des études réalisées *in vivo*, qui ont montré aussi bien une stimulation qu'une inhibition du turn-over protéique musculaire voire une absence d'effet. Wolfe (2000b) explique cette incohérence par le fait qu'il est indispensable de prendre en compte la disponibilité concomitante en AA pour interpréter tout résultat concernant l'insuline. De plus, chez l'homme, la technique traditionnellement utilisée pour estimer la protéosynthèse et la protéolyse – différence artérioveineuse de concentration et d'enrichissement d'un AA traceur – est très difficile à mettre en œuvre. Enfin, l'hyperinsulinémie aurait un effet plus important sur les synthèses des organes de la zone splanchnique que sur ceux de la zone périphérique (Fouillet *et al.*, 2001).

*In vitro*, les mécanismes de stimulation de la synthèse protéique ont pu être précisés. Plusieurs étapes de la synthèse protéique seraient sensibles à la présence d'insuline : la transcription des gènes et donc la production d'ARN ainsi que sa stabilité seraient améliorées en présence d'insuline, il y aurait aussi un effet sur la traduction des ARNm ou encore une activation des enzymes préexistantes (O'Brien & Granner, 1997).

*In vivo*, il semble en fait que l'insuline ait une action stimulatrice sur la protéosynthèse à condition que la disponibilité en AA soit satisfaisante (Biolo *et al.*, 1995 ; 1999 ; Balage *et al.*, 2001) (Figures 26 et 27). D'autres études, par contre, ont mis en évidence une inhibition de la dégradation protéique sans effet direct sur la protéosynthèse, mais ces expériences étaient réalisées sans apport d'AA (Gelfand & Barrett, 1987 ; Meek *et al.*, 1998). En fait, pour que l'effet stimulant aigu de l'insuline puisse se traduire par une augmentation de la synthèse protéique, il faut qu'en même temps la disponibilité en AA augmente soit par un apport exogène et/ou un transport transmembranaire accru, soit par une plus forte réutilisation des AA issus de la dégradation protéique (Wolfe, 2000b). Le mécanisme d'action de l'hormone, s'il existe, reste par contre inconnu.

### B.2.2.3 Y-a-t-il un effet du niveau d'apport protéique alimentaire sur la synthèse protéique musculaire?

Lorsque l'apport en protéines alimentaires est inférieur au niveau minimal nécessaire, la synthèse protéique musculaire est ralentie. Par contre, lorsque la disponibilité en AA augmente et dépasse les besoins minimaux, il n'y a pas de stimulation de la synthèse, une inhibition pouvant même être observée (Tableau 17).

Plusieurs explications à ce phénomène ont été proposées. Abumrad *et al.* (1989) ont observé que lorsque le muscle squelettique est exposé à des niveaux inadéquats d'AA, la plupart des AA captés par le muscle ne sont pas incorporés dans les synthèses protéiques mais plutôt conservés dans un pool d'AA libres pour être utilisés facilement plus tard.

Parallèlement, la disponibilité en certains AA serait paradoxalement réduite en périphérie (thréonine, sérine et glycine principalement), ceci étant dû à une très forte activation des systèmes de dégradation des AA au niveau splanchnique (Moundras *et al.*, 1993). Taillandier *et al.* (1996) ont démontré que cette diminution de la synthèse protéique était associée à une réduction de l'efficacité de la traduction des ARNm. Une réduction de la disponibilité en certains autres AA pourrait en fait avoir des conséquences sur les processus d'initiation.

#### B.2.2.4 Autres utilisations métaboliques des acides aminés au niveau musculaire.

Le tableau 18 et la figure 28 présentent le devenir des AA au niveau du muscle squelettique. Le muscle, au contraire du foie, et comme le cœur ou les reins, possède les transférases qui sont efficaces sur les AACLR. Elles se trouvent à la fois dans le cytosol et les mitochondries et fonctionnent pour les 3 AACLR (valine, isoleucine et leucine). Les  $\alpha$ -cétoacides formés par transamination sont décarboxylés par un complexe enzymatique qui est régulé de façon très stricte et nécessite, pour son fonctionnement, de la thiamine sous sa forme coenzyme TDP/TPP, de la niacine sous la forme NADH, du magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et du Coenzyme A. La transamination des AACLR se déroule principalement avec l' $\alpha$ -cétoglutarate pour former du glutamate avec transfert du groupement amine sur le pyruvate pour former de l'alanine. Le glutamate peut aussi incorporer une molécule d'ammoniac pour former de la glutamine. Les quantités relatives de glutamine et d'alanine formées dépendent de la teneur musculaire en ammoniac (Goldberg & Chang, 1978). Les  $\alpha$ -cétoacides issus de la transamination des AACLR peuvent aussi être transportés dans le sang, liés à l'albumine vers d'autres tissus pour y être dégradés ou y subir une ré-amination. La leucine est en fait le seul AA qui puisse être totalement oxydé au niveau musculaire à des fins énergétiques. Pendant le jeûne, les teneurs en leucine augmentent très significativement dans le sang et le muscle même si la capacité du muscle à dégrader la leucine augmente parallèlement.

L'alanine est synthétisée au niveau musculaire et est libérée en quantités importantes à l'état basal ou lors d'un jeûne (Goldberg & Chang, 1978). Alanine et glutamine sont libérées par le muscle dans la circulation sanguine vers d'autres organes (foie, reins, intestins) où leur groupement amine peut être détaché pour être excrété. Au niveau hépatique, l'alanine peut être utilisée pour la production de glucose qui peut ensuite être libéré dans le sang pour être réutilisé au niveau musculaire : c'est le cycle alanine-glucose qui permet d'évacuer de l'azote vers le foie pour qu'il soit excrété. D'autres AA sont libérés par le muscle à l'état post-absorptif (phénylalanine, méthionine, lysine, arginine, histidine,

tyrosine, proline, tryptophane, thréonine et glycine) (Abumrad *et al.*, 1982 ; Wahren *et al.*, 1976).

### **B.2.3 Métabolisme des acides aminés dans le rein.**

La figure 28 représente le métabolisme rénal des AA. Les principales réactions concernent la synthèse de sérine à partir de la glycine, le catabolisme de la glycine, la synthèse d'histidine à partir de la dégradation de la carnosine, la synthèse d'arginine à partir de l'aspartate et de la citrulline libérés par l'intestin et la formation de guanidoacétate à partir de l'arginine et de la glycine pour la production de créatine. Le rein est le site majeur de production d'arginine, histidine et sérine.

De plus, le rein est, avec le foie, le seul organe à posséder les enzymes nécessaires à la néoglucogénèse. Les  $\alpha$ -cétoacides issus de la désamination ou de la transamination des AA qui arrivent au niveau du rein peuvent être utilisés pour la néoglucogénèse ou à des fins énergétiques. Le métabolisme rénal des AA devient particulièrement significatif pendant le jeûne. La néoglucogénèse fournit du glucose qui pourra être utilisé par l'organisme pour satisfaire ses besoins énergétiques.

#### *B.2.3.1 Synthèse et dégradation protéiques rénales.*

Le turn-over des protéines rénales est élevé (FSR de 76% chez des rats soumis à un régime normoprotéique, Masanès *et al.* (1999)), et par conséquent, malgré la petite taille de cet organe, il joue un rôle très important dans l'homéostasie protéique corporelle. Ainsi, à l'état post-absorptif, chez l'homme, le rein représente une fraction non négligeable de la dégradation protéique (11%) et de la synthèse protéique (10%) corporelles totales (Tessari *et al.*, 1996a).

Le taux de synthèse des protéines rénales est sensible au niveau d'apport en protéines alimentaires, passant de 57,2 à 83,6%.j<sup>-1</sup> lorsque le niveau habituel d'apport en protéines passe de 8 à 17%. Il n'est par contre pas augmenté lorsque l'apport en protéines devient supérieur aux besoins (76,1%.j<sup>-1</sup> pour un niveau d'apport de 30%) (Masanès *et al.*, 1999).

#### *B.2.3.2 Fonction majeure du rein : l'excrétion des déchets du métabolisme azoté.*

Le rôle majeur du rein dans le métabolisme azoté reste sa fonction excrétrice : c'est lui qui permet l'évacuation de tous les déchets azotés qui s'accumulent dans le sang. De

plus, de nombreuses enzymes impliquées dans la dégradation des produits azotés sont localisées dans le rein : amino-transférases, glutamate déshydrogénases et glutaminases qui toutes catalysent la désamination de la glutamine et du glutamate. Les glomérules rénaux jouent le rôle de filtres pour le plasma, tous les constituants du plasma passant dans le filtrat. Les nutriments essentiels (glucose, sodium et AA) sont réabsorbés le long des tubulures.

Un apport alimentaire élevé en protéines entraînant une stimulation des voies de désamination et de dégradation des AA, l'activité d'excrétion est donc accrue au niveau rénal. Ce phénomène a été corrélé dans plusieurs études avec une masse rénale plus importante chez des animaux soumis pendant plusieurs semaines à un régime hyperprotéique. Dunger *et al.* (1997) ont par exemple mis en évidence que les reins d'animaux soumis à un régime à 32% de protéines pendant 80 semaines étaient 50% plus lourds que ceux de rats ingérant un régime à 8% de protéines pendant la même durée. De même, Masanès *et al.* (1999) ont montré une augmentation de 18% de la masse du rein chez des animaux soumis pendant 2 semaines à un régime à 30% de caséine par rapport à des animaux témoins consommant un régime à 17% de protéines. La clairance rénale était aussi sensible au niveau protéique d'apport alimentaire. Ainsi, chez l'homme sain, même si le taux de filtration glomérulaire (mesuré approximativement par la clairance de la créatinine) n'était pas affecté par le niveau d'apport en protéines, le taux de clairance était nettement plus élevé pour l'alanine, le glutamate, l'asparagine, l'aspartate, la lysine, la phénylalanine et la thréonine lors d'un régime à 2,5g de protéines.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> que lors d'un régime à 1g de protéines.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> (Forslund *et al.*, 2000). La clairance de l'urée était par contre diminuée de moitié.

## **B.2.4 Autres organes périphériques.**

### *B.2.4.1 Peau.*

La peau représente aussi, par sa taille, un organe important de la zone périphérique. En phase post-absorptive, le taux de synthèse, chez l'homme, a été évalué à 0,54%.h<sup>-1</sup> soit à peu près 13%.j<sup>-1</sup> (Biolo *et al.*, 1994). Chez le lapin, le FSR a été estimé à 0,34%.h<sup>-1</sup> soit à peu près 8%.j<sup>-1</sup> (Zhang *et al.*, 1996). De même, le taux de dégradation protéique a pu être mesuré, il est de 0,50%.h<sup>-1</sup> (soit 12%.j<sup>-1</sup>) chez l'homme en phase post-absorptive (Biolo *et al.*, 1994). Il est donc clair, que, en phase post-absorptive, le bilan azoté est nul au niveau de la peau (synthèse = dégradation) (Figure 29). En fait, le bilan azoté au niveau de la peau est maintenu de façon très stricte lorsque les facteurs hormonaux et/ou nutritionnels de

l'organisme sont modifiés. Par exemple, lors d'une perfusion d'AA, chez le lapin, synthèse et dégradation protéique sont augmentées simultanément d'à peu près 60% (Zhang *et al.*, 1996). En fait, la peau maintient sa masse protéique constante par une réutilisation efficace des AA issus de la protéolyse.

La peau représente 10 à 15% du métabolisme total au niveau de la jambe chez l'homme à l'état post-absorptif (Biolo *et al.*, 1994). Lors d'un jeûne court ou prolongé, le métabolisme cutané occupe une place plus importante dans le métabolisme protéique corporel total. Ainsi, la contribution de la peau à la protéosynthèse corporelle totale est accrue de 39% après un jour de jeûne (Cherel *et al.*, 1991b), sans toutefois que le bilan azoté cutané n'en soit modifié. Ces conclusions soulignent l'importance qu'il y a à prendre en compte le métabolisme cutané lors de l'étude du métabolisme protéique au niveau d'un membre entier ou du corps entier en vue d'évaluer le métabolisme musculaire.

#### *B.2.4.2 Cerveau.*

En plus de son rôle essentiel dans le contrôle de la plupart des fonctions de l'organisme, le cerveau est aussi un organe au niveau duquel se déroulent protéolyse et protéosynthèse qui peuvent être influencées par différents facteurs corporels. Par exemple, un jeûne de 24 heures induit une diminution de 20% des taux fractionnel et absolu de synthèse protéique au niveau cérébral, due à une diminution de l'efficacité de la synthèse ( $\mu\text{g}$  de protéine synthétisé par jour par  $\mu\text{g}$  d'ARN) plus qu'à une diminution de la capacité même de synthèse ( $\mu\text{g}$  d'ARN par mg de protéine) (Cherel *et al.*, 1991a). Un prolongement de la durée de jeûne n'induit pas de modification plus significative du taux de synthèse. La contribution relative du cerveau à la synthèse protéique corporelle totale est accrue pendant le jeûne. En fait, les protéines cérébrales sont apparemment économisées en réponse à un jeûne plus ou moins long. Le taux de synthèse des protéines dans le cerveau a été évalué à  $0,63\% \cdot \text{h}^{-1}$  (soit  $\approx 15\% \cdot \text{j}^{-1}$ ) chez les rats âgés de 1 à 4 jours et à moins de  $0,3\% \cdot \text{h}^{-1}$  (soit moins de  $7\% \cdot \text{j}^{-1}$ ) chez le rat adulte (Lajtha *et al.*, 1979). Il est sensible au niveau d'apport protéique alimentaire et diminue lorsque celui-ci passe de 20% à 0% (Hayase *et al.*, 1998). Il n'y a pas de données disponibles concernant l'effet d'un apport supérieur aux besoins.

#### *B.2.4.3 Poumons.*

Peu de données sont disponibles quant au métabolisme protéique pulmonaire. Dans le cadre d'une étude sur la cancer, Melville *et al.* (1990) ont étudié l'effet du passage à l'état nourri sur le métabolisme protéique pulmonaire chez le volontaire sain grâce à une perfusion

continue en [<sup>13</sup>C]-leucine. Les résultats les plus flagrants concernent une nette diminution de la dégradation protéique résultant en une balance en leucine positive (alors qu'elle était négative à l'état post-absorptif) (Figure 30). Les autres données disponibles concernent l'effet d'une période de jeûne qui entraîne une diminution de la protéosynthèse accompagnée d'une stimulation de la protéolyse (Thet *et al.*, 1977).

L'ensemble des paragraphes précédents permet une description des flux inter-organes d'AA et d'autres molécules issus de leur métabolisme. Un schéma global de l'influence des apports alimentaires en protéines sur la synthèse et la dégradation protéiques corporelles peut aussi être réalisé.

### **B.2.5 Flux inter-organes d'acides aminés. Synthèse & dégradation protéique au niveau du corps entier.**

L'étude individuelle des organes corporels permet de définir les besoins propres de chacun d'entre eux ainsi que l'utilisation qu'ils font des AA fournis par l'alimentation. Il est ensuite nécessaire de combiner l'ensemble des données obtenues afin d'obtenir une vue globale du devenir des protéines alimentaires au niveau du corps entier. La figure 31 résume et quantifie le devenir des protéines ingérées chaque jour (soit 100g), pour un homme adulte de 70 kg.

#### *B.2.5.1 Résumé des flux inter-organes importants d'acides aminés.*

Les flux inter-organes d'AA, illustrés sur la figure 32, sont très largement coordonnés par le foie. Ces différentes voies sont plus ou moins actives en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme.

A l'état nourri, les AA absorbés arrivent au foie, où leur devenir est déterminé par les besoins de l'organisme ; c'est ainsi que les quantités apportées en excès sont majoritairement dégradées. Seuls les AACLR échappent à ce contrôle et passent dans la circulation périphérique pour être métabolisés par le muscle, majoritairement.

Le foie est le site de synthèse de l'urée, premier mécanisme d'élimination de l'excès d'azote fourni par l'utilisation des AA pour la néoglucogénèse ou la production d'énergie. Pendant le jeûne, la néoglucogénèse devient une voie métabolique essentielle de régulation du glucose plasmatique. La néoglucogénèse hépatique est complétée par celle se déroulant au niveau rénal lorsque le jeûne se prolonge. La néoglucogénèse rénale s'accompagne de la formation et de l'excrétion d'ammoniac.



Il existe entre le foie et le muscle un cycle alanine-glucose essentiel. L'alanine formée par le muscle par transamination du glutamate avec le pyruvate – issu de la glycolyse musculaire ou recyclé par le foie – est libérée dans la circulation. L'alanine retourne au foie où elle est transaminée avec l' $\alpha$ -cétoglutarate, reformant ainsi du pyruvate. L'azote transaminé entre dans le cycle de l'urée alors que le pyruvate est transformé en glucose par néoglucogénèse. Ce glucose peut alors retourner au muscle, complétant ainsi le cycle. L'alanine peut aussi être produite par les cellules intestinales par transamination du pyruvate, servant ainsi de transporteur d'azote entre l'intestin et le foie.

La glutamine joue aussi un rôle essentiel dans le transport et l'excrétion de l'azote issu des AA. De nombreux tissus synthétisent de la glutamine par combinaison d'une molécule d'ammoniac et de glutamate. Cette réaction est catalysée par la glutamine synthase. L'ammoniac peut ainsi être transportée sous forme de glutamine vers le foie ou les reins.

#### B.2.5.2 Effet d'un apport protéique alimentaire sur la synthèse et la dégradation des protéines corporelles.

La conservation de la masse protéique corporelle passe par le contrôle de la synthèse et de la dégradation protéiques, ainsi que par le contrôle du niveau d'oxydation des AA lors de l'alternance quotidienne des périodes de jeûne et d'apport alimentaire, surtout chez l'homme pour lequel l'apport alimentaire se fait normalement en 3 ou 4 repas.

Si l'ensemble des publications démontre une stimulation de la désamination des AA par un apport alimentaire, il n'y a, par contre, pas vraiment de consensus concernant l'effet d'un repas sur la protéosynthèse et la protéolyse corporelles (McNurlan & Garlick, 1989). Les premières études avaient semblé démontrer une stimulation de la protéosynthèse corporelle et une inhibition de la protéolyse corporelle en phase postprandiale. Depuis, les résultats obtenus vont plutôt dans le sens d'une absence d'effet sur la synthèse avec, par contre, une réponse sensible de la dégradation (Tableau 19). Toutefois, il est encore difficile d'établir des conclusions fermes et définitives concernant les conséquences d'un apport protéique alimentaire sur le turn-over protéique corporel chez l'homme adulte, et ce principalement pour des raisons méthodologiques (manque de sensibilité des techniques isotopiques, recyclage du marqueur, choix du précurseur utilisé dans les calculs...).

Une élévation de la teneur en protéines du régime entraînerait une plus forte inhibition de la dégradation protéique postprandiale, l'effet sur la synthèse protéique postprandiale étant moins marqué (Motil *et al.*, 1981b). En fait, à l'échelle de la journée, un apport accru en protéines va entraîner une augmentation de l'amplitude du cycle quotidien

gain postprandial / perte post-absorptive, surtout par une modification de la protéolyse qui diminue en phase postprandiale et augmente en phase post-absorptive, sans que toutefois le turn-over total ne soit modifié, assurant ainsi la continuité de l'homéostasie protéique corporelle (Millward, 1999). Finalement, chez l'homme adulte sain ayant un poids stable, il existe une relative insensibilité métabolique aux variations de l'apport protéique, si ce n'est la mise en place des réponses adaptatives nécessaires à l'évacuation rapide d'un surplus d'AA alimentaires. Pacy *et al.* (1994) ont ainsi démontré que le turn-over protéique corporel était très peu sensible aux changements du niveau d'apport en protéines (de 0,36 à 2,07 g de protéines.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> dans cette étude).

L'origine de la source protéique (i. e. animale ou végétale) a apparemment aussi très peu d'effets sur la synthèse protéique corporelle. Il y a par contre un effet de la qualité de la protéine alimentaire sur la dégradation protéique postprandiale. Pannemans *et al.* (1998) ont ainsi montré, dans le cas d'un régime riche en protéines, que l'inhibition de la dégradation habituellement observée après un repas était moins prononcée lorsque l'apport protéique était majoritairement d'origine végétale par rapport aux résultats obtenus pour une quantité équivalente de protéines d'origine animale. Deutz *et al.* (1998) ont eux mis en évidence qu'une perfusion entérale de protéines de soja provoquait une réduction des turn-overs protéiques intestinal et hépatique. Il semble, de plus, que la dégradation des protéines hépatiques endogènes soit stimulée.

### **B.3 CONTROLE DE L'INGESTION PROTEIQUE .**

Les mécanismes de contrôle de la prise alimentaire à court terme mettent en jeu l'intégration d'effets stimulant la prise alimentaire et sa durée dans le temps (vue de l'aliment, son goût et sa palatabilité) mais aussi des signaux issus de l'apprentissage (« je sais quel effet cet aliment a sur moi ») ainsi que des signaux digestifs et métaboliques. La régulation à court terme résulte donc d'une interaction entre des motivations stimulatrices (hédoniques) et inhibitrices (satiation) de l'ingestion d'aliments. La satiété représente la suppression de l'envie de manger qui suit la fin du repas. Il faut souligner chez l'homme l'importance des informations cognitives associées à l'aliment ingéré, ainsi que l'environnement sociologique, économique et psychologique de sa consommation.

Du fait du délai existant entre le moment où l'aliment est avalé et celui où il est digéré, le mécanisme de satiété implique forcément des signaux à plus court terme, tels que la satiété sensorielle spécifique (c'est-à-dire le fait que la consommation répétée d'aliments ayant une même caractéristique sensorielle entraîne une diminution de l'appétit pour cette

caractéristique), l'odeur et le goût, et des facteurs mécaniques liés à la déglutition ou à la distension gastrique. Ensuite, d'autres systèmes de signalisation sont activés : chimioréception des nutriments au niveau intestinal, production de peptides au niveau viscéral (foie inclus) et finalement intervention du Système Nerveux Central (SNC) (Plata-Salaman, 1991).

L'impact des différents composants de l'apport alimentaire sur la régulation du comportement alimentaire n'a pas été beaucoup étudié chez l'homme. Cependant, les différents nutriments ont des effets variés sur les facteurs du contrôle du comportement alimentaire (French, 1999). Les protéines sont généralement présentées comme étant les macronutriments au plus fort pouvoir satiétogène (Booth *et al.*, 1970 ; Hill & Blundell, 1986 ; Rolls *et al.*, 1988). Toutefois, il est très difficile de manipuler le contenu en protéines des aliments sans induire une modification des aspects cognitifs et oro-sensoriels associés à leur consommation.

### **B.3.1 Système central impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire.**

Les expériences de stimulation électrique et de lésions conduites dans les années 50 ont mis en évidence le rôle majeur de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Les centres de la "faim" et de la "satiété" ont été localisés au niveau de l'hypothalamus latéral (LH) et du noyau hypothalamique ventromédian (VMN). Depuis, cette localisation grossière a cédé la place à une description beaucoup plus détaillée des populations de neurones impliquées ainsi que des systèmes de régulation et d'intégration impliqués (Mercer & Speakman, 2001) (Figure 33).

#### *B.3.1.1 Zones cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire.*

L'hypothalamus représente le point de convergence de nombreux signaux périphériques et de voies nerveuses de contrôle de l'homéostasie énergétique corporelle et de la prise alimentaire. Plusieurs zones ont été particulièrement étudiées. Ainsi, Rowland *et al.* (1997) ont montré une augmentation de l'immunoréactivité *c-fos* like au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus lors d'une administration périphérique de peptides anorexigènes d'où l'hypothèse de l'implication de cette zone dans les circuits de la satiété. De plus, le neuropeptide Y, stimulateur de la prise alimentaire, est produit au niveau du noyau caudé (ARC) qui projette vers différents noyaux participant au contrôle de l'appétit, comme le PVN par exemple (Williams *et al.*, 2000).

L'aire hypothalamique latérale (LHA) est connue comme participant au contrôle de l'alimentation, et tout particulièrement son système dopaminergique qui d'après Yang *et al.* (1997) régulerait la prise alimentaire par le contrôle de la taille des repas. Ainsi, ils ont démontré qu'une perfusion de dopamine (DA) au niveau du LHA entraînait une réduction de la prise alimentaire uniquement due à une très nette diminution de la taille des repas.

L'hypothalamus ventromédian (VMH) est relié au système sympathique. Sa lésion entraîne une hyperphagie, avec prise de poids. Les animaux deviennent obèses. (Tokunaga *et al.*, 1989 ; Weingarten *et al.*, 1985). Le système sérotoninergique du VMH serait influencé par la nature des nutriments ingérés. Ainsi, le turn-over de la sérotonine est significativement stimulé dans le VMH d'animaux ingérant un régime à 8% de protéines par rapport à des animaux ingérant un régime à 21% de protéines. La libération de sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) au niveau ventromédian stimule le système sympathique ce qui pourrait signaler une stimulation de l'appétit protéique (Specter *et al.*, 1996).

Le déterminant majeur de la taille du repas est la satiété, état biologique induit par des stimuli neuro-hormonaux générés par la consommation du repas. Les informations concernant la satiété qui sont générées par le repas sont en grande partie dirigées vers le cerveau postérieur par les fibres afférentes du nerf vague (estomac, foie, intestin) et d'autres fibres afférentes issues du haut du tractus digestif. Cette information converge vers le noyau du tractus solitaire, une zone caudale du cervelet qui intègre les informations sensorielles issues du tube digestif et des viscères intestinales, tout comme celles issues de la cavité buccale (goût). Le NTS intègre aussi les informations concernant le niveau d'oxydation des acides gras, phénomène participant aussi à la régulation de la prise alimentaire (Scharrer, 1999). Ces signaux sont initiés par des stimulations mécaniques ou chimiques de l'estomac et de l'intestin grêle au moment de l'ingestion des aliments, par des signaux hépatiques en relation avec le contrôle du métabolisme énergétique et enfin par des signaux humoraux, tels que la CCK, qui sont libérés par les cellules endocrines lors d'une stimulation par les aliments ingérés. La "terminaison" du repas peut être induite par ces signaux même lorsque toutes les connexions neuronales entre le cerveau antérieur et le cerveau postérieur sont supprimées. Ce phénomène de base amenant l'animal à cesser de manger implique donc des zones qui peuvent fonctionner hors de toute influence de l'hypothalamus (Schwartz *et al.*, 2000). Les neurones du NTS réalisent l'intégration des informations afférentes relatives à la satiété "en prenant en compte" les données issues du cerveau antérieur et relatives à l'homéostasie énergétique. Cette hypothèse est supportée par un certain nombre de faits : (1) les neurones du NTS possèdent des interconnexions

avec des zones du cerveau antérieur tel que le PVN, l'intégration des données concernant l'homéostasie énergétique et la satiété met donc en jeu plusieurs zones cérébrales, et (2) les récepteurs impliqués dans la réponse aux neuropeptides effecteurs du SNC ou aux hormones telles que l'insuline et la leptine sont exprimés dans le NTS tout comme dans l'hypothalamus.

C'est ainsi que Zittel *et al.* (1999) ont mis en évidence une élévation de l'expression du *c-fos* dans le NTS lors d'une prise alimentaire, ce qui dénote d'une activité neuronale de cette zone au moment de l'ingestion d'un aliment. L'activité maximale était mesurée 90 minutes après le début de l'ingestion de nourriture. Les auteurs ont aussi pu mettre en évidence une corrélation positive entre l'expression mesurée et la quantité ingérée.

L'area postrema (APo), région voisine du NTS est souvent citée comme aire cérébrale participant au contrôle de la prise alimentaire. Ainsi, par exemple, dans une expérience utilisant la technique du *c-fos* chez des rats subissant une injection d'inhibiteurs métaboliques (méthyl palmoxirate et/ou 2,5-anhydro-D-mannitol) et par conséquent augmentant leur prise alimentaire, Horn *et al.* (1999) ont montré une stimulation concomitante du NTS et de l'APo. Cette région possède la particularité anatomique d'être dépourvue de barrière hémato-méningée, d'où un passage plus aisé des substrats présents dans la circulation sanguine vers le liquide céphalo-rachidien et les zones cérébrales voisines. Sa lésion provoque une modification comportementale chez des rats nourris avec des quantités disproportionnées d'AA (Leung *et al.*, 1986).

Enfin, le noyau parabrachial latéral (LPB) situé au niveau du pont dans le cerveau postérieur est le principal relais de l'APo et joue un rôle dans le traitement des informations d'origine viscérale (Cubero *et al.*, 2001). Cette zone est activée par une injection d'anorexigènes ce qui suggère sa participation au sein du circuit menant à la satiété (Rowland *et al.*, 1997).

### B.3.1.2 Monoamines cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire.

La norépinéphrine (NE) est une monoamine synthétisée dans certaines zones du cervelet (complexe vagal dorsal, locus ceruleus). Ces zones projettent vers l'hypothalamus, le thalamus et le cortex. Dans certains neurones, la norépinéphrine est synthétisée avec le neuropeptide Y (NPY), neuropeptide oréxigène effecteur d'une des voies d'action centrale de la leptine. Comme pour le NPY, une injection de NE dans l'hypothalamus stimule la prise alimentaire (Brunetti *et al.*, 1999).

La dopamine, dont les voies de synthèse et de dégradation sont présentées sur la figure 34, participe activement au contrôle de la prise alimentaire. La DA ne franchit pas la barrière hémato-méningée. Ses précurseurs (phénylalanine et tyrosine), en revanche la traversent. L'essentiel de sa synthèse est réalisée au niveau des terminaisons neuronales.

L'absence de production de DA, comme par exemple chez des souris knock-out pour le gène de la tyrosine hydroxylase, entraîne une incapacité à manger. La restauration de cette capacité peut être obtenue par thérapie génique dans le striatum (Szczyпка *et al.*, 1999a). Le rôle de la DA dans le contrôle de la prise alimentaire dépendrait en fait de la zone cérébrale considérée. Ainsi, dans le système mésolimbique, elle aurait plutôt un rôle stimulateur en liaison avec l'aspect "récompense" de l'ingestion d'un aliment hautement palatable (Martel & Fantino, 1996). Dans l'hypothalamus, la libération de DA est associée à la longueur du repas et doit être présente pour permettre l'initiation du repas. Dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus précisément, l'ingestion d'aliments s'accompagne d'une libération de DA (Meguid *et al.*, 2000).

La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane (Figure 35). L'accumulation de cet AA dans les neurones sérotoninergiques fait intervenir un transporteur membranaire qu'utilisent également d'autres AA neutres pour gagner le milieu intracellulaire, de telle sorte qu'une compétition peut intervenir à ce niveau entre ces AA et le tryptophane. D'ailleurs, il est possible de diminuer la teneur du cerveau en tryptophane par l'administration d'un excès de certains AA (valine, leucine, isoleucine, phénylalanine...). Ce phénomène est à l'origine d'une des premières hypothèses concernant le contrôle sérotoninergique de la prise alimentaire reposant sur la mesure du rapport [tryptophane] / [AALN] au niveau plasmatique (Anderson, 1979), hypothèse très largement remise en cause depuis (Peters & Harper, 1987 ; Fernström *et al.*, 1985 par exemple).

La sérotonine a un effet anoréxigène au niveau central. Les souris ne possédant pas de récepteurs sérotoninergiques ont un comportement anormal (Nonogaki *et al.*, 1998). La libération de 5-HT dans l'hypothalamus est stimulée par l'ingestion d'un repas (Schwartz *et al.*, 1989), semble être impliquée dans le phénomène de satiété et refléter le niveau d'ingestion de glucides (Hoebel *et al.*, 1989).

### B.3.1.3 Autres neurotransmetteurs centraux : neuropeptides impliqués dans la transmission cérébrale des signaux périphériques (leptine et insuline).

Il existe de nombreux autres neuropeptides actifs au niveau central, et tout particulièrement dans l'hypothalamus. Les plus nombreux sont ceux participant à la

transmission des signaux périphériques que sont la leptine et l'insuline et qui participent au contrôle de l'homéostasie énergétique corporelle. Le plus connu d'entre eux est le NPY qui stimule la prise alimentaire lors d'une injection intraventriculaire (Stanley *et al.*, 1986), en réduisant la dépense énergétique de façon concomitante (Billington *et al.*, 1991). Les mélanocortines –  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone), TRH (thyrotropin-releasing hormone), CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), interleukine-1 $\beta$  – sont des molécules ayant l'effet inverse, c'est-à-dire qu'elles sont anorexigènes et que leur administration entraîne la mise en place d'une balance énergétique négative. La traduction du signal hormonal périphérique en signal nerveux se fait majoritairement au niveau du noyau arqué. Les zones cérébrales recevant des projections issues du noyau arqué pourraient contenir des neurones "de 2<sup>nd</sup> ordre" impliqués dans la suite de la transmission du signal (Schwartz *et al.*, 2000).

Le système central de contrôle de la prise énergétique alimentaire est de mieux en mieux connu, même si de nombreuses zones d'ombre restent encore à être explorées. Se pose alors la question de savoir si le niveau d'ingestion de tel ou tel nutriment est régulé de façon spécifique ou si seul son contenu énergétique importe. De plus, si une régulation spécifique existe, emprunte-t-elle les mêmes systèmes de régulation ou existe-t-il des systèmes particuliers, spécifiques à chaque macronutriment ?

La première ingestion d'un repas à teneur élevée en protéines entraîne une réponse comportementale très caractéristique chez l'animal. De très nombreuses hypothèses visant à l'expliquer ont été proposées, mais les mécanismes précis mis en jeu ne sont pas encore clairement établis.

### **B.3.2 Réduction de la prise alimentaire observée lors de la première ingestion d'un régime hyperprotéique.**

Les régimes riches en protéines entraînent une anorexie passagère transitoire qui se met en place dès les 20 premières minutes qui suivent le début de l'ingestion de la nourriture (Peters & Harper, 1987) et dure plusieurs jours. Ce phénomène a été décrit pour des teneurs en protéines supérieures ou égales à 35% (par rapport à la matière sèche). Anderson *et al.* (1968) ont pu observer une diminution très sensible de la consommation des animaux, ce phénomène étant d'autant plus prononcé que la teneur en protéines du régime était élevée (Figure 36). La consommation augmentait ensuite jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour dans tous les groupes. Cette augmentation se poursuivait au delà du 6<sup>ème</sup> jour pour les animaux des groupes ayant

un régime à 50 ou 75% de protéines. Cette baisse transitoire de l'ingéré quotidien s'accompagnait logiquement d'une moindre prise de poids, voire d'une perte de poids (Tableau 20). Des résultats similaires sont retrouvés par Peters & Harper (1985) (Tableau 21), et de plus ces auteurs ont observé un phénomène très semblable pour les régimes pauvres en protéines.

Chez l'homme, il existe quelques données montrant aussi une diminution de la consommation alimentaire lorsque le niveau d'apport protéique est élevé. Ainsi, Booth *et al.* (1970) ont observé que des sujets ingérant un repas hyperprotéique mangeaient 30% moins au repas suivant (proposé 4 heures plus tard) que des sujets ayant ingéré un repas à teneur protéique faible. Cet effet de la teneur en protéines d'un repas se prolonge plus loin que le repas suivant. En effet, des adolescentes consommant un petit-déjeuner apportant 24 g de protéines (au lieu de 9 g dans le groupe contrôle), ingéraient 10 à 15% moins de calories sur la journée (Ohlson & Hart, 1965). Une autre étude (Barkeling *et al.*, 1990) a montré, chez l'homme, que des sujets ingérant un déjeuner contenant 43% de protéines (en énergie) mangeaient 12% moins au dîner ( $P < 0,05$ ) par rapport à des sujets ayant eu un déjeuner hyperglucidique (69% de glucides, en énergie). De plus, si avant le déjeuner la "liste des aliments préférés" des sujets comprenait un nombre important d'aliments protéiques, cela n'était plus le cas ensuite, et cette "aversion" était encore plus prononcée après le déjeuner hyperprotéique.

La prise protéique alimentaire est donc être régulée, non seulement d'un jour à l'autre (Musten *et al.*, 1974) mais aussi à l'échelle de la journée (Johnson *et al.*, 1979) et même d'un repas (Li & Anderson, 1982).

### **B.3.3 Hypothèses avancées pour expliquer le contrôle de l'ingestion protéique.**

#### *B.3.3.1 Phénomènes pré-absorptifs (digestifs).*

Un certain nombre de stimuli mécaniques ou chimiques appliqués au niveau des cellules de la muqueuse intestinale provoquent une diminution des sécrétions et contractions musculaires du tractus digestif. Le but de ce rétrocontrôle est (1) que l'entrée de nutriments en provenance de l'estomac corresponde aux capacités de digestion et d'absorption de l'intestin et (2) d'entraîner une modification de la prise alimentaire (Raybould, 1998). Les mécanismes de transduction de l'information (mécanique ou chimique) au niveau intestinal restent encore peu connus. Une hypothèse de fonctionnement du système de mécano-réception est présenté sur la figure 37 (B).



Il est clairement établi que le nerf vague joue un rôle important dans la régulation du comportement alimentaire en transmettant au SNC des informations sensorielles de nature chimique ou mécanique issues de la zone viscérale (Figure 37 (A et C), Jeanningros, 1982, Li & Anderson, 1984). La première zone d'intégration des données au niveau central est le NTS, qui possède des projections dans l'hypothalamus. Schwartz *et al.* (1993) ont démontré qu'une vagotomie de la branche gastrique bloquait complètement l'effet des nutriments ingérés (lipides, glucides ou protéines) sur la vitesse de la vidange gastrique. Ces phénomènes pourraient être liés au fonctionnement de mécano- (sensibles à la distension et à la pression) et de chimio-récepteurs situés au niveau de la paroi stomacale. De plus, une vagotomie provoque une inhibition de la vidange gastrique à la fois des solides et des liquides, alors qu'une antrectomie ou une pyloroplastie n'ont que peu d'effet sur ces paramètres (Yamagishi & Dabas, 1978).

La présence de nutriments dans le duodénum génère un signal nerveux afférent participant au rétrocontrôle de l'ingestion d'aliments et de la fonction digestive. La composante sensorielle du nerf vague est un lien neuroanatomique majeur entre les nutriments ingérés et les sites cérébraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et de la fonction digestive. Une lésion ou une destruction des fibres vagues sensorielles atténue, voire supprime, ce rétrocontrôle (Schwartz & Moran, 1998). Ainsi, il existe une possibilité de rétrocontrôle, transmise au moins en partie par le nerf vague, par les nutriments arrivant dans l'intestin sur le tonus gastrique et donc sur le passage ultérieur d'autres nutriments dans l'intestin (Azpiroz, 1994). Le degré d'inhibition de la vidange gastrique est fonction de la concentration des nutriments dans le duodénum et le jéjunum et de la longueur d'intestin exposée aux nutriments (Lin *et al.*, 1989 ; Lin *et al.*, 1990 ; Miller *et al.*, 1981), le "but" étant d'adapter la vitesse de vidange gastrique aux capacités d'absorption de l'intestin. Les voies de production de ces signaux nerveux à partir des nutriments présents dans le duodénum restent encore très peu connues. Différentes études ont démontré une sensibilité des fibres innervant la partie antérieure du tractus digestif à un certain nombre de paramètres physico-chimiques associés aux nutriments ingérés, tels que pH, osmolarité, composition en nutriments et distension locale du tractus produite par la nourriture ingérée (Davidson & Clarke, 1988 ; Mei, 1992).

La libération de plusieurs hormones peptidiques – cholécystokinine, sécrétine, peptide YY – est stimulée par la présence de nutriments dans la lumière intestinale. Quand ils sont administrés par voie externe, ces peptides intestinaux ont un effet sur la prise alimentaire, le problème étant ensuite de savoir si les peptides endogènes entraînent le même type de

réponse dans des conditions physiologiques. La cholécystokinine est un des peptides les plus étudiés. Les résultats concernant cette molécule restent encore très controversés. Plusieurs études ont ainsi démontré une réduction de la prise alimentaire (chez l'animal) ou une sensation de satiété (chez l'homme) après une injection périphérique de CCK (Gibbs & Smith, 1988 ; Boosalis *et al.*, 1992). Le mécanisme d'action de ce peptide impliquerait la participation des fibres nerveuses vagues afférentes qui transmettraient les informations concernant, par exemple, les phénomènes de distension gastrique au cerveau. Les informations transmises par le nerf vague sont, en effet, reçues au niveau du NTS avant d'être renvoyées vers d'autres zones (effectives) du cerveau. D'autres zones répondent aussi à une administration (intrapéritonéale ou intraveineuse) de CCK : noyau latéral parabrachial, noyau central de l'amygdale, comme démontré grâce à la méthode du *c-Fos* par Hamamura *et al.* en 1991. Bray & York (1979) ont aussi démontré qu'une vagotomie bloquait la réduction de la prise alimentaire induite par une injection périphérique de CCK, suggérant que les messages afférents générés par le circuit hépato-gastrique transitent via le nerf vague jusqu'au cerveau. Les autres peptides intestinaux pour lesquels une action sur le contrôle de la prise alimentaire a pu être mise en évidence sont la bombésine, la gastrine, la sécrétine, l'insuline, le glucagon, la somatostatine, la neurotensine, la substance P et le polypeptide pancréatique (Smith & Gibbs, 1981).

### *B.3.3.2 Phénomènes post-absorptifs.*

Une des toutes premières hypothèses avancées pour expliquer la réponse comportementale associée à la première consommation d'un régime très riche en protéines est celle de Mellinkoff *et al.* (1956) qui avaient observé, chez l'homme, que la teneur sérique en AA était inversement corrélée à l'appétit. C'est l'hypothèse aminostatique du contrôle de la prise alimentaire qui statue que les concentrations cérébrales en AA libres – indispensables principalement – sont contrôlées, des modifications du comportement alimentaire de l'animal permettant leur maintien dans un intervalle strict de valeurs (Peters & Harper, 1987). Cette hypothèse est basée sur plusieurs études associant diminution de la prise alimentaire et élévation des teneurs plasmatiques et cérébrales en AA chez des rats ingérant un régime à teneur protéique donnée en repas unique (Glaeser *et al.*, 1983; Peters & Harper, 1987; Semon *et al.*, 1988) ou pendant plusieurs jours (Glanville & Anderson, 1984; Semon *et al.*, 1988). De plus, il a été montré qu'un régime hyperprotéique entraîne non seulement une élévation des teneurs plasmatiques en AA, mais que, de plus, le retour à la normale de la consommation alimentaire passe par une normalisation des concentrations plasmatiques en AA impliquant l'activation des systèmes du catabolisme des AA (Harper *et al.*, 1970). Chez

les animaux soumis à un régime hyperprotéique, les concentrations plasmatiques des AACLR sont particulièrement sensibles et pourraient donc intervenir dans le contrôle de l'appétit, soit directement via l'élévation des concentrations cérébrales soit indirectement en bloquant la captation des autres AALN comme le tryptophane et l'histidine, par exemple (Li & Anderson, 1983). Une perfusion périphérique d'AA entraîne une baisse de la prise alimentaire, mesurée sur la journée, supérieure à celle observée lors d'une perfusion d'une quantité équivalente (d'un point de vue calorique) de lipides ou de glucides (Walls & Koopmans, 1992).

Peu de données, par contre, concernent les mécanismes se mettant en place à très court terme (avant le repas suivant ou dans l'heure qui suit l'ingestion des protéines). Selon l'hypothèse aminostatique, des modifications rapides des concentrations plasmatiques et cérébrales en AA devraient être observées dès l'ingestion du repas afin d'entraîner une réponse comportementale au repas suivant. Peters & Harper (1987) ont pu mettre en évidence un tel phénomène, avec l'observation d'une augmentation des concentrations plasmatiques des AAI et de quelques AANI dès 20 minutes après le repas. Dans cette étude, les concentrations plasmatiques des AAI, mesurées 1 heure après le début de l'ingestion du régime, étaient augmentées proportionnellement au contenu protéique du régime (10 à 55% de protéines). Au niveau cérébral, les modifications observées n'étaient pas toujours similaires à celles mesurées au niveau plasmatique, aussi bien qualitativement que quantitativement, et ce tout particulièrement pour les AANI. Toutefois, les teneurs cérébrales en certains AAI étaient sensibles au contenu protéique du régime et la concentration totale en AAI variait en directe proportion avec la teneur en protéines du régime. Les auteurs de cette étude concluaient à l'existence d'une relation entre les variations des teneurs cérébrales en AA et la prise alimentaire réduite, ainsi qu'à une corrélation entre la quantité de protéines ingérées et la concentration cérébrale totale en AAI. Semon *et al.* (1988) ont aussi démontré une augmentation de la concentration de certains AA au niveau cérébral, 4 heures après la présentation d'un régime à 44% de caséine chez des animaux en force-feeding (1 seul repas de 3 heures chaque jour). Des résultats tout à fait comparables ont été retrouvés par la même équipe avec 2 autres régimes - 75% de caséine et 28% de blanc d'œuf - (Semon *et al.* 1989). D'autres équipes ont montré une augmentation des concentrations cérébrales des AACLR, de la tyrosine et de l'histidine avec en parallèle, une diminution de la phénylalanine et du tryptophane après ingestion de repas protéiques (Glaeser *et al.*, 1983 ; Fernström & Faller, 1978). Cette diminution est expliquée par la compétition entre les AA pour un même transporteur au niveau de la barrière hémato-méningée, les concentrations plasmatiques en AACLR augmentant beaucoup plus que celles

de la phénylalanine et du tryptophane après le repas, ceci étant principalement une conséquence du métabolisme hépatique des AA alimentaires.

Anderson *et al.* (1994), par contre, n'ont pas pu établir de lien clair entre la réduction de la prise alimentaire observée à court terme après un gavage de protéines (ou d'AA en solution) et les variations concomitantes des concentrations plasmatiques et cérébrales en AA. Dans cette étude, les auteurs ont comparé le comportement des animaux auxquels était présenté soit un régime hyperprotéique (33,5% d'amidon de maïs, 50% de caséine) soit un régime hyperglucidique (83,5% d'amidon de maïs, pas de protéines) après gavage (albumine ou mélange d'AA). Les auteurs ont pu observer l'effet déjà décrit de l'ingestion du repas protéique sur la prise alimentaire ultérieure des animaux, mais n'ont pu corrélérer ce phénomène aux variations de concentrations plasmatiques et cérébrales d'AA observées en parallèle. Ils ont alors proposé plusieurs explications à ces résultats contradictoires en soulignant qu'un manque de corrélation entre la réponse comportementale des animaux et les concentrations plasmatiques et cérébrales en AA ne prouve pas que des changements dans les pools d'AA libres n'aient aucune influence sur le contrôle de l'appétit.

Tout d'abord, il se peut que des régions spécifiques du cerveau soient sensibles à des variations infimes, voire indécélables par analyse. Par exemple, Wayner *et al.* (1975) ont montré que des microinjections d'AA au niveau de la zona incerta et de l'hypothalamus latéral provoquaient une augmentation de la fréquence de décharge de certains neurones mettant ainsi en évidence le fait que l'activité neuronale peut être affectée par des fluctuations des concentrations cérébrales en AA. Dans une autre étude (Panksepp *et al.*, 1971), une diminution de la prise alimentaire a été provoquée dans l'heure qui a suivi l'injection d'un mélange équilibré d'AA au niveau de l'aire dorsolatérale périfornicale. De plus, l'area postrema jouerait un rôle dans l'adaptation aux régimes hyperprotéiques car sa lésion entraîne une modification de la réponse comportementale chez l'animal (Leung *et al.*, 1986). Cette région, dépourvue de barrière hémato-méningée, pourrait peut-être servir de détecteur pour les variations très faibles des concentrations d'AA ou d'autres molécules issues de leur métabolisme.

La deuxième hypothèse de Anderson *et al.* est que les variations de disponibilité en AA pourraient affecter la synthèse de peptides ou de protéines dans les régions du cerveau participant au contrôle de la prise alimentaire. Ce phénomène a d'ailleurs pu être démontré dans le cas d'un régime dépourvu en thréonine, pour lequel l'inhibition de la synthèse protéique dans les neurones bloquait l'augmentation de la prise alimentaire observée lors de l'injection de l'AA limitant à des rats soumis à ce régime (Beverly *et al.*, 1990). Attention

toutefois, les variations de concentrations cérébrales en AA sont beaucoup plus sensibles dans le cas d'un régime dépourvu en un AAI que dans le cas d'un régime hyperprotéique.

La troisième hypothèse proposée repose sur l'influence des AA du cerveau sur le métabolisme des neurotransmetteurs impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire.

Les relations entre la sérotonine et son précurseur, le tryptophane ont été très étudiées car l'implication de ce neuromédiateur dans le contrôle de la prise alimentaire est connue depuis longtemps. Toutefois, dans le cas d'une charge en protéines ou en AA, une implication de la sérotonine dans la diminution de la prise alimentaire associée serait plus discutable. En effet, les agonistes de la sérotonine entraînent une anorexie (Luo & Li, 1990) et ses antagonistes une augmentation de la prise alimentaire (Luo *et al.*, 1990). Or dans le cas d'un gavage protéique, une diminution de la teneur cérébrale en sérotonine est observée (2 heures plus tard), probablement suite à une diminution de la disponibilité en tryptophane dans le cerveau (Teff & Young, 1988). De plus, il n'existe pas de données prouvant que des modifications du métabolisme cérébral de la sérotonine interviennent dès 30 à 90 minutes après l'ingestion alors que des modifications de la prise alimentaire sont déjà observables. Par contre, les modifications du métabolisme de la sérotonine induites par une ingestion de protéines pourraient avoir une influence sur la composition de la prise alimentaire suivante (expérimentations sur des animaux en choix). Cette hypothèse est très discutée. Peters *et al.* (1984a) ont montré, par exemple, que le niveau de sérotonine pré-prandial n'est pas corrélé avec l'ingéré protéique au repas suivant. De plus, ces mêmes auteurs (Peters & Harper, 1984b) ne montrent pas de variations des concentrations cérébrales en sérotonine ou en 5-HIAA (acide 5-hydroxyindole acétique, produit de dégradation de la sérotonine) en fonction de la teneur en protéines du régime (0, 15 ou 55%), que les animaux soient à jeun ou nourris. Par contre, la concentration en 5-HIAA est significativement plus élevée chez les rats à jeun que chez les rats nourris, et ce quel que soit le niveau d'ingéré protéique.

En ce qui concerne les cathécolamines, les résultats ne sont pas clairs. Ainsi, l'effet de la dopamine sur le contrôle de la prise alimentaire varie en fonction de la zone cérébrale considérée (Schwartz *et al.*, 2000). Toutefois, des souris génétiquement modifiées et incapables de synthétiser de la dopamine (souris DA -/-) deviennent rapidement hypophages (dès 3 semaines) et sont aussi hypoactives (Szczycka *et al.*, 1999b). D'autres auteurs (Ahn & Phillips, 1999) ont mis en évidence des corrélations entre le fonctionnement du système dopaminergique et le phénomène de satiété sensorielle spécifique. Ce phénomène est critique dans une optique de consommation d'un régime varié. En effet, il a été montré que lorsque des animaux qui ont faim consomment un aliment palatable jusqu'à satiété, cet état persiste lors d'une nouvelle présentation du même aliment. Par contre, si on leur propose un

nouvel aliment (c'est-à-dire possédant des caractéristiques sensorielles différentes), ils feront à nouveau un repas. Des variations significatives des teneurs en dopamine de certaines zones cérébrales (noyau accumbens ou cortex préfrontal médian) ont été montrées dans ces conditions. De plus, l'ingestion d'aliments à teneur élevée en protéines entraîne une satiété sensorielle spécifique plus importante que celle d'aliments à faible teneur protéique, et ce pour un apport calorique identique (Rolls *et al.*, 1988 ; Vandewater & Vickers, 1996). Si, à court terme, l'ingestion d'un repas hyperprotéique entraîne une augmentation de la tyrosine et du turn-over de la norépinephrine au niveau du cerveau, une consommation chronique d'un régime hyperprotéique provoque une diminution de la teneur cérébrale en tyrosine (Li & Anderson, 1983). Weiner (1970) proposa une régulation de la synthèse des catécholamines par les produits finaux du métabolisme protéique. Finalement, la prise alimentaire serait contrôlée via un équilibre entre les différents systèmes neurochimiques du cerveau, incluant la participation d'autres molécules telles que le  $\gamma$ -amino-butyrac-acid (GABA) et d'autres peptides ou AA.

Pour conclure, plusieurs paramètres caractéristiques d'une prise alimentaire donnée peuvent donc participer à son contrôle :

- le goût et la texture en bouche de l'aliment,
- la présence de digesta dans l'estomac et les intestins ; les caractéristiques physico-chimiques de celui-ci qui peuvent être détectées par les récepteurs neuronaux et les cellules endocrines/paracrines,
- les quantités de substance absorbées depuis le tube digestif et qui atteignent le foie,
- la concentration des substances absorbées et des hormones dans la circulation générale,
- l'accumulation ou la mobilisation des réserves corporelles, lipides et/ou protéines, conséquence du niveau auquel l'apport alimentaire permet la satisfaction des besoins de l'individu,
- la stimulation ou l'inhibition des circuits neuronaux du CNS par l'ensemble de ces paramètres. (Forbes, 2001).

## **C TRAVAUX PERSONNELS**

Les travaux présentés dans cette thèse visaient à mettre en évidence comment l'organisme réagit à des variations de l'apport protéique, et quels phénomènes métaboliques sont mis en œuvre de façon à s'adapter à ces variations.

La principale question étudiée ici concernait la réponse métabolique à une augmentation aiguë ou chronique de l'apport protéique, chez le rat et chez l'homme (ETUDES 2 & 3), de façon à déterminer les étapes critiques de l'adaptation à un régime hyperprotéique, qui nous l'avons vu caractérise de plus en plus l'alimentation dans les pays occidentaux. Nous nous sommes pour cela intéressés au devenir postprandial de l'azote alimentaire, dans différentes conditions nutritionnelles, la phase intervenant juste après le repas étant essentielle dans la gestion de ces variations de l'apport protéique. A cet effet, nous avons utilisé des protéines intrinsèquement marquées à l'azote 15, un isotope stable, et nous avons ainsi pu évaluer la répartition de l'azote exogène dans les différents pools azotés de l'organisme tout au long de la période postprandiale. Une partie de ce travail visait aussi à essayer de mettre en évidence un effet de cette augmentation aiguë ou chronique de l'apport protéique alimentaire sur différents paramètres mesurés dans des zones cérébrales connues pour être impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, en relation avec des modifications du comportement alimentaire observées chez l'animal.

Parallèlement, nous avons travaillé sur les effets d'une variation qualitative de l'apport protéique alimentaire. Ainsi, nous avons évalué les digestibilités totales des protéines de lait et de soja, ainsi que les digestibilités individuelles de chaque acide aminé constituant la protéine de lait ou de soja, chez le rat et chez l'homme (ETUDE 1). Nous avons aussi, chez l'homme, étudié le devenir postprandial de ces 2 protéines chez des individus adaptés à un régime normo- ou hyperprotéique et ingérant l'une ou l'autre des protéines lors du repas test (ETUDE 3). Ceci visait à mettre en évidence de possibles interactions entre quantité et qualité de l'apport protéique alimentaire par rapport à la valorisation métabolique de la protéine ingérée.

## **D MATERIELS & METHODES**

### **D.1 PRINCIPE DES EXPERIMENTATIONS.**

#### **D.1.1 Principes de l'utilisation des isotopes stables.**

Les isotopes stables ont une faible abondance naturelle (0,37% pour l'azote  $^{15}\text{N}$  par exemple), ce qui permet leur utilisation comme traceurs lorsqu'ils sont incorporés au sein de molécules. Leur avantage majeur réside dans leur stabilité isotopique, c'est-à-dire qu'ils n'émettent pas de rayons ionisants qui pourraient être nocifs au matériel biologique. Cette propriété permet leur utilisation chez l'homme, avec des répétitions possibles chez le même sujet. Le choix du traceur implique que celui-ci réponde à plusieurs critères :

- sa destinée métabolique doit être identique à celle du composé tracé,
- le traceur doit être représentatif du composé tracé,
- le traceur ne doit pas entraîner de perturbations métaboliques,
- le traceur doit se diluer de façon homogène dans le pool métabolique.

L'utilisation de l'azote  $^{15}\text{N}$  permet en particulier l'étude du métabolisme protéino-azoté *in vivo*, et tout particulièrement les aspects dynamiques de celui-ci (Figure 38).

Dans nos études, nous suivons spécifiquement le devenir et les dynamiques de transfert de l'azote alimentaire dans les compartiments corporels. Le sujet, animal ou humain, ingère une quantité connue d'isotope au cours d'un repas, et la mesure de la répartition de celui-ci dans les échantillons prélevés ensuite permet d'évaluer le fonctionnement du métabolisme protéique postprandial, et ce dans différentes conditions nutritionnelles.

Chez l'animal, et chez le rat tout particulièrement, de nombreux fluides corporels et tissus peuvent être prélevés, ce qui permet l'établissement d'une image assez fine des phénomènes métaboliques observés. Chez l'homme, par contre, peu d'échantillons sont aisément collectables – sang et urines principalement.

#### **D.1.2 Marquage de l'azote exogène.**

Le lait marqué à l'azote  $^{15}\text{N}$  a été produit à la Ferme de l'Institut National Agronomique, à Grignon avec l'aide du Dr. Schmidely (Département des Sciences Animales, INA-PG, Grignon). Une vache en lactation reçoit, dans son eau de boisson, 50 g de  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (enrichi à 10 AT%, Euriso-Top, Saint-Aubin, France) chaque jour pendant 11 jours. Les bactéries du rumen utilisent cette source d'azote dans leurs synthèses protéiques. Le ruminant assimile ensuite les acides aminés marqués à l'azote  $^{15}\text{N}$  et ceux-ci sont



incorporés dans les synthèses protéiques de la glande mammaire. Les protéines sécrétées dans le lait sont alors uniformément marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$ . Le lait collecté est dégraissé. Les protéines sont concentrées par diafiltration (UFP 1,1 m<sup>2</sup> IRIS 3065 Rhône Poulenc, membranes de 40 kDa). Le concentré est ensuite lyophilisé. L'enrichissement global de la protéine était compris entre 0.4535 AT% et de 0.6050 AT%.

Le soja, de la variété CHANDOR, a été marqué à l'INRA par pulvérisation foliaire de  $\text{K}[^{15}\text{N}]\text{O}_3$  à la levée, à la floraison et au stade R5 (remplissage des gousses). Le semis a eu lieu en avril 1994 à une densité de 441 860 graines par hectare sur 10 m<sup>2</sup>. Les plantes marquées ont été récoltées au sévateur sur 6 m<sup>2</sup> au mois d'octobre. A partir de ces graines ainsi enrichies en  $^{15}\text{N}$ , un isolat de protéines de soja a été préparé par le Centre de Recherche Nestlé de Lausanne. Les graines ont été broyées (Alpine type 100AFG) puis délipidées en présence d'hexane. A partir de la farine obtenue, les protéines ont été extraites: la farine est solubilisée en milieu aqueux refroidi pendant 2 heures puis centrifugée 30 minutes. Une seconde extraction est réalisée sur le culot. Les surnageants sont recueillis et immédiatement acidifiés (HCl 5N) afin de prévenir toute contamination bactérienne puis centrifugés. Le précipité est resuspendu en milieu aqueux, neutralisé (NaOH 5N), congelé, lyophilisé puis stérilisé. Les protéines de soja ainsi concentrées et lyophilisées sont conditionnées par 30 g dans des sacs plastiques hermétiquement fermés.

Nous avons pu vérifier l'homogénéité du marquage des acides aminés individuels au sein de la protéine grâce au couplage Chromatographie en phase Gazeuse – Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique (avec une interface de combustion) qui permet une mesure de l'enrichissement propre de chacun des acides aminés d'un mélange. Le tableau 22 donne les résultats de cette analyse pour les protéines de lait et de soja utilisées dans les différents protocoles.

## **D.2 PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.**

### **D.2.1 ETUDE 1 : Effet de la source protéique alimentaire (Lait ou Soja) sur le métabolisme digestif de l'azote et des acides aminés alimentaires.**

Cette étude a été réalisée afin de déterminer les digestibilités caéciales de l'azote et des acides aminés des protéines de lait et de soja chez le rat, et de comparer les résultats obtenus avec les valeurs de digestibilités iléales mesurées chez l'homme.

*D.2.1.1 Mesure de la digestibilité caecale des protéines de lait et de soja chez le rat.*

Seize rats Wistar mâles (Harlan, France) étaient placés dans des cages individuelles grillagées. Ils étaient soumis à un rythme circadien inversé (12:12, jour de 20h30 à 8h30) dans une pièce thermostatée (23°C en moyenne). Ils ingéraient 3 repas par jour d'un mélange AIN-93M / eau (14 g de protéines de lait totales pour 100 g de régime). Le jour de l'expérience, les rats ont été répartis entre 2 groupes expérimentaux (n=8 rats par groupe). Les animaux pesaient  $302,3 \pm 14,6$  g et  $297,7 \pm 30,4$  g dans les groupes lait et soja, respectivement. Un repas expérimental unique composé de 6 g de protéines marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$  a été donné aux animaux à 9 heures du matin. Les enrichissements isotopiques des protéines totales étaient de 0,6048 et 0,4750 AT% pour le lait et le soja, respectivement et les enrichissements individuels des acides aminés étaient compris entre 0,6215 (Glx) et 0,5054 AT%(His) pour la protéine de lait et entre 0,4818 (Asx) et 0,4505 AT%(Pro) pour la protéine de soja. Les rats étaient anesthésiés par injection de pentobarbital de sodium (13,6 mg.100 g PC<sup>-1</sup>, Sanofi, France) 6 heures après le repas. L'abdomen était ensuite ouvert et l'animal était saigné par rupture de l'aorte et de la veine cave, ceci afin d'éviter toute contamination des digesta par le sang. L'estomac, l'intestin grêle et le caecum étaient prélevés, rincés avec du sérum physiologique froid et les digesta récupérés étaient rapidement congelés.

*D.2.1.2 Mesure de la digestibilité iléale des acides aminés des protéines de lait et de soja chez l'homme.*

Treize volontaires ( $28 \pm 2$  ans, IMC  $23,7 \pm 0,7$  kg.m<sup>-2</sup>) ont participé à cette étude. Ils étaient répartis au hasard entre les 2 repas test, et ingéraient 30 g de protéines de lait (n=7) ou de soja (n=6) marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$ . Les volontaires arrivaient à l'hôpital la veille de l'expérience. Ils étaient alors équipés d'une sonde intestinale. Vingt quatre heures plus tard, le point de recueil de la sonde intestinale se retrouvait dans l'iléon terminal. Après une nuit de jeûne et vérification de la position de la sonde par radiographie, les volontaires recevaient une perfusion intestinale d'une solution isotonique de rouge de phénol (400 mg.l<sup>-1</sup>) servant de marqueur des débits liquidiens à un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup>. Après 30 minutes de perfusion intestinale, ils ingéraient au temps  $t_0$  un des 2 repas test. Les effluents intestinaux étaient collectés par aspiration continue et collectés toutes les 30 minutes pendant les 8 heures suivant l'ingestion du repas. Les échantillons étaient immédiatement traités avec un

inhibiteur de protéases, le diisopropylfluorophosphate ( $1 \text{ mg.l}^{-1}$ , Sigma, St Quentin Fallavier, France), congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  et lyophilisés.

## **D.2.2      ETUDE 2 : Effets d'une variation aiguë de ou chronique du niveau d'apport protéique alimentaire sur le métabolisme protéique postprandial chez le rat.**

### *D.2.2.1    Suivi postprandial de l'azote exogène après un repas hyperprotéique chez le rat adapté ou non à un niveau d'apport élevé en protéines.*

Le but de cette expérimentation était d'étudier le devenir de l'azote et des acides aminés alimentaires (ou exogènes) chez des rats consommant un repas riche en protéines soit pour la première fois soit après une adaptation préalable à ce niveau d'apport. Ceci nous a permis de mettre en évidence comment l'organisme réagit à une augmentation aiguë du niveau d'apport protéique pour ensuite s'adapter métaboliquement à un niveau d'apport supérieur à ses besoins.

#### D.2.2.1.1      Conditionnement des animaux.

Des rats Wistar mâles ( $n=112$ ) (Harlan, France), pesant initialement  $196 \pm 1 \text{ g}$  étaient placés dans des cages individuelles grillagées et soumis à un rythme circadien inversé (12:12, jour de 20h30 à 8h30) dans une pièce thermostatée ( $23^{\circ}\text{C}$  en moyenne). Les animaux étaient répartis en 3 groupes : 2 groupes de rats ( $n=76$ ) étaient nourris pendant 2 semaines avec un régime contrôle normoprotéique (groupe **AP**, **14** g de protéines de lait totales pour 100 g de matière sèche, 14,7% de l'énergie métabolisable), alors que les rats du 3<sup>ème</sup> groupe étaient nourris avec un régime hyperprotéique (groupe **HP**, **50** g de protéines de lait totales pour 100 g de matière sèche, 52,6% de l'énergie métabolisable). Les recommandations d'apport protéique établies pour le rat par le NRC (National Research Council, 1995) sont de 13 à 20 g de protéines pour 100 g d'aliment. Nous avons choisi de travailler avec un régime à 14% de protéines pour les animaux des groupes contrôle. La composition des régimes est donnée dans le tableau 23. Les animaux étaient soumis à 3 repas par jour, sous forme semi-liquide (eau:poudre = 1:1 pour le régime AP, 2 :1 pour le régime HP), ceci afin de les habituer à une consommation rapide de leur régime, tout en permettant un niveau adéquat de prise alimentaire :

8h30 – 8h45 : 3 g (MS) de nourriture

13h30 – 14h30 : *ad libitum*

18h30 – 19h30 : *ad libitum*.

L'eau était fournie à volonté. Les animaux étaient pesés tous les jours à midi. Leur consommation était notée pour chaque repas.

#### D.2.2.1.2 Protocole expérimental.

Le matin de l'expérience (J 16), après une nuit de jeûne, les rats consommaient un repas expérimental de 3 g (MS) contenant des protéines de lait totales marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$ . Trente-six rats du groupe AP recevaient un repas à 14% de protéines  $^{15}\text{N}$  (soit 0,42g de protéines). Ce groupe était le groupe contrôle (**AP-14**). Les 40 autres rats adaptés au régime AP recevaient un repas contenant 50% de protéines  $^{15}\text{N}$  (soit 1,50 g de protéines). C'était le groupe **AP-50** dont les animaux subissaient une augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire. Enfin, les 36 rats du groupe HP ingéraient un repas expérimental contenant 50% de protéines  $^{15}\text{N}$ , soit 1,50 g de protéines. C'est le groupe **HP-50**, dont les animaux étaient préalablement adaptés à un apport élevé en protéines alimentaires. Les compositions des repas sont décrites dans le tableau 23. La figure 39 résume le protocole. Un papier absorbant était placé sous la cage pour permettre la collecte des urines.

Les rats étaient sacrifiés avant le repas ou 1, 2, 3, 4 ou 5 heures après celui-ci, avec un nombre moyen de 6 rats par point. Ils étaient anesthésiés avec du pentobarbital de sodium (13,6 mg.100 g  $\text{PC}^{-1}$ , Sanofi, France). Ils recevaient parallèlement une injection d'héparine (5000 UI, Laboratoires Léo, France). Après ouverture de la cavité péritonéale, ils étaient saignés par rupture de l'aorte et de la veine cave. Le sang était conservé dans de la glace avant d'être centrifugé (15 minutes, 3000g, 4°C) et le plasma était congelé à  $-80^\circ\text{C}$  pour une analyse ultérieure. La vessie était prélevée et l'urine qu'elle contenait poolée avec celle récupérée par rinçage du papier absorbant à l'eau distillée. L'ensemble était congelé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'à analyse. Le tractus digestif était prélevé, les contenus de l'estomac, de l'intestin et du caecum étaient récupérés par rinçage à l'eau distillée, puis congelés. Les muqueuses de l'intestin grêle (divisé en 3 parties : proximal, médian, distal) et du côlon étaient collectées par grattage avec une lame de verre, pesées et congelées. Le foie, un rein, un muscle gastrocnémien étaient prélevés, pesés et congelés.

#### *D.2.2.2 Effet d'une augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire sur la thermogénèse postprandiale.*

##### D.2.2.2.1 Conditionnement des animaux.

Des rats Wistar mâles (n=26) étaient placés dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites au paragraphe D.2.2.1.1 et consommaient pendant 14

jours le régime contrôle normoprotéique à 14% de protéines totales de lait. Après adaptation à ces conditions expérimentales, les échanges respiratoires et la production corporelle d'urée ont été mesurés après l'ingestion d'un repas test de 3 g contenant soit 14% (groupe **AP-14 calo**) soit 50% (groupe **AP-50 calo**) de protéines totales de lait. Pour chaque repas test, nous avons utilisé 7 rats pour déterminer les variations d'urée corporelle sur la période postprandiale grâce à l'implantation préalable de cathéters jugulaires permettant un prélèvement chronique de sang, et 6 rats pour mesurer les échanges gazeux et la production d'urée urinaire.

#### D.2.2.2.2 Implantation d'un cathéter jugulaire pour le prélèvement chronique de sang.

Avant le début de la période d'adaptation au régime, un cathéter jugulaire a été implanté chez les animaux afin de permettre soit le prélèvement de sang, soit la perfusion de sérum physiologique. Les animaux étaient anesthésiés au pentobarbital de sodium (4,2 mg.kg<sup>-1</sup>, Sanofi Santé, France) et un cathéter long de 70 mm (602-135 Silastic Brand, Dow Corning Corporation, Medical Products, Midland, MI, USA) était inséré dans la veine jugulaire externe, selon la méthode décrite par Nicolaïdis *et al.* (1974) et descendu dans la veine cave comme expliqué par Burvin *et al.* (1998). Le cathéter était rempli de sérum physiologique et doucement poussé d'avant en arrière jusqu'à ce qu'il passe dans la veine cave. Le cathéter était ensuite attaché à la veine jugulaire, passé en sous-cutané le long de l'épaule et du cou jusqu'à atteindre le crâne où il était fixé grâce à des vis et du ciment dentaire (Dentalon Plus, Heraeus, Kuzler, Dormagen, Allemagne). Le cathéter était ensuite rempli d'une solution visqueuse de polyvinylpyrrolidone à 10% (Prolabo, France) afin d'éviter l'occlusion du tube (Steffens, 1969).

Le jour de l'expérience, le sang (100 µl/prélèvement) était collecté pendant 6 heures via le cathéter jugulaire, juste avant le repas et toutes les 30 minutes ensuite. Après chaque prise de sang, 100 µl d'une solution NaCl 9% - Citrate 6% étaient ré-injectés à l'animal. Les échantillons sanguins étaient immédiatement mélangés avec une solution EDTA-Trasyol à 25% (Bayer AG, Leverkusen, Allemagne), centrifugés (3000g, 4°C, 15 min) et le surnageant était congelé jusqu'à analyse.

#### D.2.2.2.3 Calorimétrie.

La veille de l'expérience, les animaux étaient placés dans une cage à calorimétrie (Figure 40) après le repas du soir (i.e. 19h30) avec de l'eau à volonté. Un tube en

polyéthylène porté par un bras articulé était relié à la sortie du cathéter afin de permettre la perfusion d'une solution saline hypotonique (NaCl 0,45%, 6 ml.h<sup>-1</sup>). Le but de cette perfusion était d'assurer un flux régulier d'urine. Celle-ci était collectée grâce à une pompe péristaltique connectée au fond de la cage métabolique, et distribuée dans des tubes de 10 ml préalablement enduits d'une solution HCl à 18%. Un collecteur de fraction permettait de changer de tube toutes les 30 minutes. L'enregistrement des échanges gazeux et de l'activité locomotrice spontanée était réalisé à intervalles réguliers (10 s) et les données obtenues étaient poolées sur des intervalles de 15 minutes. L'acquisition de données pendant toute la nuit permettait l'obtention d'une ligne de base. Le lendemain matin, le repas test était rapidement introduit dans la cage et les rats restaient dans la cage à calorimétrie jusqu'à 16h (retour à la ligne de base).

*D.2.2.3 Variations des concentrations en neurotransmetteurs dans 3 zones cérébrales en relation avec les modifications de la prise alimentaire induites par un régime hyperprotéique chez le rat.*

Le but de ce protocole était d'étudier les variations en acides aminés et neurotransmetteurs (sérotonine, dopamine et leurs dérivés principalement) associés à l'ingestion d'un régime hyperprotéique pour la première fois ou après adaptation chez le rat, et ce au niveau de 3 zones cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, l'area postrema (APo), le noyau du tractus solitaire (NTS) et l'hypothalamus latéral (LH) (Figure 41). Ce travail a été réalisé dans le Food Intake Laboratory et dans le Department of Anatomy, Physiology & Cell Biology de l'Ecole Vétérinaire de l'Université de Californie à Davis (USA) sous la direction du Pr. D. W. Gietzen.

D.2.2.3.1 Conditionnement des animaux.

Des rats Sprague-Dawley mâles (n=112), (Bantam and Kingman, USA), pesant initialement 223 ± 1 g ont été adaptés pendant 2 semaines à un régime contenant 14% ou 50% de caséine (Tableau 24) dans des conditions de vie similaires à celles précédemment décrites, si ce n'est que la nourriture était donnée aux animaux sans être mouillée.

D.2.2.3.2 Protocole expérimental.

Le matin de l'expérience, les rats consommaient un repas test de 3g contenant 14% ou 50% de caséine. Trois groupes étaient réalisés de façon similaire :

	<b>Adaptation</b>	<b>Repas test</b>
<b>cAP-14</b>	14% caséine	14% caséine
<b>cAP-50</b>	14% caséine	50% caséine
<b>cHP-50</b>	50% caséine	50% caséine

Les animaux étaient sacrifiés par décapitation avant ou 3, 4 ou 5 heures après le repas. Le sang était récupéré, conservé dans la glace puis centrifugé (15 minutes, 3000g, 4°C). Le plasma était récupéré et congelé à -80°C. Le cerveau était rapidement prélevé (en moins de 3 minutes), congelé par contact avec de la carboglace pillée et conservé à -80°C jusqu'à la dissection des 3 zones étudiées, APo, NTS et LH. Pour ce faire, le cerveau était découpé en sections transversales de 1 mm d'épaisseur. Ces sections étaient placées sur des lames de microscope posées sur de la carboglace et les zones étudiées étaient prélevées soit au scalpel (APo et NTS) soit à l'aide d'un micropunch (LH). La très faible taille des échantillons APo nous obligea à les regrouper 2 par 2 dans la suite de l'expérience.

### **D.2.3 ETUDE 3 : Influence d'une adaptation à un régime hyperprotéique sur l'utilisation postprandiale des protéines alimentaires chez l'homme. Effet de la source protéique (lait ou soja).**

Le but de ce protocole était de mettre en évidence l'effet du niveau d'apport protéique habituel (normo- ou hyperprotéique) sur l'utilisation postprandiale de l'azote et des acides aminés alimentaires après un repas mixte standard.

La partie clinique de ce protocole a été réalisée en collaboration avec le Dr. Benamouzig, dans le Service d'Hépatogastro-Entérologie de l'Hôpital AVICENNE de Bobigny après obtention de l'avis favorable du Comité Consultatif pour la Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) de Saint-Germain en Laye (78).

#### *D.2.3.1 Volontaires.*

Les critères d'exclusion retenus étaient : (1) participation à une étude clinique au cours des 6 mois précédents, (2) sérologie positive HIV ou HgHbs, (3) grossesse ou risque de grossesse, (4) IMC inférieur à 18 ou supérieur à 25 et (5) hémoglobine < 12 g.l<sup>-1</sup>. Les volontaires ont reçu une information détaillée du déroulement du protocole et signé un consentement éclairé.

Un groupe d'adultes (n=28, 14 hommes et 14 femmes) en bonne santé comme démontré par un historique médical complet, un examen physique et des tests biochimiques de routine, a participé à l'étude. Les sujets étaient âgés de  $29 \pm 1$  ans, et leur IMC moyen était de  $21,7 \pm 0,5$  kg.m<sup>-2</sup>. La composition corporelle des volontaires a été déterminée par Impédance Bio-électrique (Analcor 5w, Spengler, Cachan, France). Le tableau 25 présente une description détaillée de ces sujets.

Pendant 2 périodes consécutives de 7 jours, chaque volontaire devait se soumettre à un régime particulier de niveau protéique normal (Régime **NP**, **1** g.kg.j<sup>-1</sup>) ou élevé (Régime **HP**, **2** g.kg.j<sup>-1</sup>). A la fin de chaque période d'adaptation, les volontaires venaient à jeun à l'hôpital pour une prise de sang et une collecte d'urine (i.e. collecte de données chez des sujets à l'état post-absorptif). Un sous-groupe de 20 sujets a été soumis à une exploration fonctionnelle du métabolisme protéique postprandial.

#### *D.2.3.2 Régimes d'adaptation.*

Les régimes NP et HP étaient isoénergétiques (33 kcal.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) et apportaient la même quantité de glucides (4,5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>), l'échange isoénergétique se faisant entre les protéines (NP : 1 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> – HP : 2 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) et les lipides (NP : 1,2 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> – HP : 0,8 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>). Une augmentation de la consommation de poisson, viande blanche, lait, produits laitiers et légumineuses permettait d'atteindre un niveau protéique élevé dans la ration, l'apport énergétique restant le même grâce à une réduction des graisses alimentaires (choix d'aliments maigres, peu de corps gras). En conséquence, la répartition protéines animales/végétales était différente entre les 2 régimes: 59/41% pour le régime NP contre 73/27% pour le régime HP.

Les volontaires, qui préparaient eux-mêmes leurs repas chez eux, avaient à leur disposition un carnet alimentaire décrivant, pour chaque jour de la période d'adaptation, les aliments à ingérer et en quelles quantités. Une balance de cuisine leur était fournie. Ils avaient pour consigne de respecter 3 repas principaux par jour avec un minimum de prises alimentaires hors-repas. Ils devaient reporter précisément les quantités ingérées sur leur carnet.

#### *D.2.3.3 Repas expérimentaux.*

Le repas expérimental utilisé pour l'étude du métabolisme postprandial, se composait d'un mélange semi-synthétique liquide apportant 11 kcal.kg<sup>-1</sup>, soit 1/3 de la ration des jours d'adaptation précédents. La composition de ce repas standard était la suivante :



protéines de lait ou de soja marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$   
glucides (1/4 sous forme de saccharose et  $3/4$  sous forme de maltodextrines)  
lipides (huile de tournesol),

avec une proportion protéines/glucides/lipides de 15, 55 et 30%, respectivement. Ce repas apportait en moyenne  $306 \pm 14$  mmol d'azote et  $698 \pm 32$  kcal. Les volontaires ingéraient le même repas test à la fin des 2 périodes d'adaptation (Figure 42). L'enrichissement isotopique des protéines de lait était de 0,605 AT% et celui des protéines de soja de 0,644 AT%.

#### *D.2.3.4 Protocole expérimental.*

Aux matins des jours 7 et 15, c'est-à-dire au terme de chaque période d'adaptation, tous les volontaires étaient admis à l'hôpital après une nuit de jeûne. Une prise de sang et un prélèvement d'urines étaient réalisés pour tous les sujets. Un cathéter était inséré dans une veine superficielle de l'avant-bras pour permettre les prélèvements sanguins chez les 20 volontaires participant à l'exploration fonctionnelle du métabolisme postprandial. Ensuite, ces volontaires ingéraient le repas expérimental à 9h00. Des échantillons de sang étaient prélevés toutes les 30 minutes pendant 3 heures puis toutes les heures pendant 5 heures. Le plasma et le sérum étaient immédiatement séparés par centrifugation (20 minutes, 2400g, 4°C) et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les sujets devaient uriner toutes les 2 heures pendant 8 heures et l'urine totale était collectée. Le volume était mesuré. Du cristal de thymol et de la paraffine étaient ajoutés pour la conservation, et le tout était stocké à 4°C. A la fin de la journée d'exploration fonctionnelle, un repas était donné aux volontaires avant qu'ils ne rentrent chez eux. Ils devaient revenir le lendemain matin pour un dernier prélèvement sanguin et pour rapporter les urines de la nuit.

### **D.3 TECHNIQUES ANALYTIQUES.**

#### **D.3.1 Enzymatiques (Urée, ammoniac, créatinine, glucose).**

La concentration de l'urée dans l'urine et le plasma a été déterminée par un dosage enzymatique (Uréase / Glutamate Déshydrogénase) sur un automate Mascott Plus (Hycel, Le Rheu, France) pour les échantillons animaux et sur un automate Dimension (Dupont de Nemours, Les Ulis, France) pour les échantillons humains. L'ammoniac dans l'urine a été dosé, chez l'homme uniquement, sur un automate (Koné, Evry, France) par une méthode

enzymatique utilisant aussi la Glutamate Déshydrogénase. Le dosage de la créatinine dans l'urine a été réalisée, chez l'homme, par une méthode colorimétrique adaptée sur un automate Dimension (Dimension (Dupont de Nemours, Les Ulis, France). En présence de soude, le picrate réagit avec la créatinine pour former du chromophore rouge ; l'absorbance à 510 nm est directement proportionnelle à la concentration de la créatinine dans l'échantillon et est mesurée en utilisant une technique cinétique bichromatique à 510 et 600 nm. Pour prévenir l'interférence de la bilirubine, celle-ci est oxydée par du ferricyanure de potassium. La glycémie était obtenue sur les plasmas humains par une méthode enzymatique utilisant la Glucose Oxydase (kit Glucose GOD-DP, Koné, Evry, France). Tous les dosages concernant les échantillons prélevés sur l'homme ont été réalisés au Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Avicenne de Bobigny (Dr. F. Ferrière).

### **D.3.2 Dosages hormonaux (Insuline, glucagon, Insulin-like growth factor (IGF-1), cortisol, growth hormone (GH) & leptine).**

Ces dosages ont été réalisés au Laboratoire de Biologie Hormonale de l'Hôpital St Vincent de Paul (Dr N. Lahlou) par RIA (Radio Immuno Assay) pour l'IGF-I (DSI, Webster, Texas, USA), l'insuline (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), le glucagon (HI-81K-250, Nichols, Paris, France), le cortisol (kit Diasorin, Anthony, France) et la leptine (Linco, St-Charles, Missouri, USA) ou par FIA (Fluoro Immuno Assay) pour la GH (HGH Delfia, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

### **D.3.3 Analyse des acides aminés dans le plasma & dans les contenus intestinaux.**

#### *D.3.3.1 Préparation des échantillons.*

Sur les échantillons plasmatiques, les protéines étaient précipitées par ajout d'acide 5-sulfosalicylique (50 mg.ml<sup>-1</sup> de plasma). Le mélange était laissé une heure à 4°C puis centrifugé (15 minutes, 3000 g, 4°C). Le culot était conservé et lyophilisé pour l'analyse des protéines. Le surnageant était récupéré et séché au speed-vac. L'échantillon sec était repris dans du Tampon lithium citrate (pH=2.2) et filtré (0.22 µm) avant d'être injecté sur l'analyseur d'acides aminés. Le standard interne utilisé était le GABA (Acide α-amino butyrique) à 10 µmol.ml<sup>-1</sup>.

Les échantillons gastro-intestinaux (prélevés chez les rats ou chez l'homme) étaient hydrolysés pendant 24h à 110°C dans de l'HCl 6N sous flux constant de N<sub>2</sub>. Après séchage

de l'hydrolysate, les échantillons étaient repris dans le même tampon et traités de la même façon.

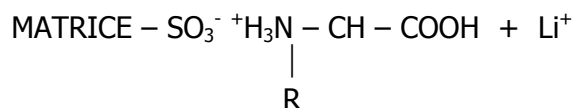
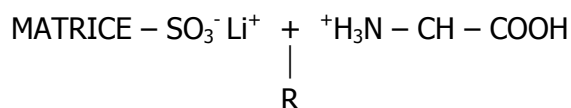
L'analyse des acides aminés a été réalisée par HPLC suivie d'une dérivation post-colonne à la ninhydrine et détection par absorptiométrie à 570 nm, 440 nm pour la proline (Biotek Instruments, St Quentin en Yvelines, France).

#### *D.3.3.2 Principe du dosage.*

L'échantillon est chargé sur une colonne de résine échangeuse de cations. Des tampons de pH et de force ionique croissants sont ensuite pompés sur la colonne pour séparer les différents acides aminés. La température de la colonne est strictement contrôlée. L'éluat de la colonne est mélangé au réactif ninhydrine, ce mélange passe ensuite dans une bobine de réaction à haute température où la ninhydrine réagit avec les acides aminés pour donner des composés colorés. La quantité de composés colorés produite est directement proportionnelle à la quantité d'acides aminés présents dans l'éluat. La quantité de chaque composé coloré est déterminée par mesure de l'absorbance au niveau de l'unité photométrique, et ce, à 2 longueurs d'ondes, 570 et 440 nm car les iminoacides (Proline et Hydroxyproline) produisent un composé coloré qui absorbe à 440 nm alors que les autres acides aminés absorbent à 570 nm. Le signal est alors envoyé à un ordinateur où un logiciel représente les concentrations sous la forme de pics. Le temps de rétention des pics permet d'identifier les acides aminés, l'aire sous le pic indiquant la quantité d'acides aminés présents. Une analyse de calibration doit être réalisée afin d'obtenir un tracé standard.

#### *D.3.3.3 Analyseur Bio-Tek (St Quentin-en-Yvelines).*

Le système d'analyse est constitué de 2 pompes isochratiques – l'une pour la ninhydrine, l'autre pour les solvants, d'un injecteur automatique, d'un four de colonne Peltier, d'une barrette de diode avec lampe deutérium et d'un sélecteur de solvants. Les solvants sont pompés à travers une colonne désammoniacante (300×4.6 mm, CIL Cluzeau, France) puis à travers une colonne analytique chargée de lithium (300×3.2 mm, CIL Cluzeau, France). La résine présente dans la colonne analytique est constituée de billes en polystyrène réticulé par l'incorporation de groupes divinylbenzène sulfonates couplés à des ions Li<sup>+</sup>.



Les acides aminés sont injectés à un pH acide et sont par conséquent chargés positivement. Ils vont se fixer sur les sites  $\text{SO}_3^-$  à la place des ions  $\text{Li}^+$ . L'élution s'effectue par une augmentation du pH, de la force ionique des tampons d'élution et de la température de la colonne analytique. Les acides aminés se détachent de la résine lorsque leur pH isoélectrique est atteint. Les acides aminés résiduels sont élués avec une solution d'hydroxyde de lithium de pH basique. En sortie de colonne, les acides aminés sont dérivés par de la ninhydrine à  $120^\circ\text{C}$  dans un four de réaction.

### D.3.4 Analyses élémentaires et isotopiques.

#### D.3.4.1 Préparation des échantillons.

##### D.3.4.1.1 Séparation des fractions protéique et non protéique des tissus.

Les échantillons de tissu prélevés étaient broyés dans 4 fois leur poids de sérum physiologique (NaCl 0,9%). La précipitation des protéines était obtenue par addition d'acide trichloroacétique (TCA, concentration finale 10%). Après 15 minutes à température ambiante, une centrifugation (15 minutes, 3000g,  $4^\circ\text{C}$ ) permettait de séparer le culot protéique du surnageant qui contient les peptides et les acides aminés libres de l'échantillon. Le culot était rincé dans du sérum physiologique avant d'être congelé pour être ensuite lyophilisé afin d'être analysé en Analyse Élémentaire et Spectrométrie de Masse à Ratio Isotopique (EA-IRMS). Le surnageant était congelé puis séché au speed-vac avant d'être remis en suspension dans 500  $\mu\text{l}$  d'eau milliQ pour l'analyse en EA-IRMS.

##### D.3.4.1.2 Extraction de l'urée et de l'ammoniac urinaires & de l'urée plasmatique.

Ces trois fractions azotées étaient isolées afin de déterminer leur enrichissement isotopique en azote  $^{15}\text{N}$ . Cette extraction a été effectuée selon la méthode décrite par Read *et al.* (1982) et adaptée par Preston & McMillan (1988).

#### D.3.4.1.3 Urines.

Dans un premier tube, 5 ml d'urine étaient ajoutés à 2 ml de résine échangeuse de cations conditionnée sous forme  $\text{Na}^+$  (Dowex AG50X8, Biorad, Ivry sur Seine, France). Le tube était agité à température ambiante pendant 15 minutes afin de fixer les ions  $\text{NH}_4^+$  sur la résine (R1). Le surnageant était prélevé. Cette étape n'était réalisée que dans l'ETUDE 3. Dans un deuxième tube, cinq ml d'urine (ETUDE 2) ou cinq ml du surnageant issu de la première étape (ETUDE 3) étaient mis en présence de 2 ml de résine avec 8  $\mu\text{l}$  d'uréase par millilitre de résine (R2). L'uréase permet la libération d'ammoniac sous forme d'ions  $\text{NH}_4^+$  qui se fixent sur la résine. L'ensemble était placé au bain-marie à 30°C pendant 2 heures avec agitation au vortex toutes les 10 minutes. Le surnageant de R2 était éliminé et les résines R1 et R2 étaient rincées 5 fois à l'eau distillée, puis conservées à 4°C dans 2 ml d'eau distillée.

#### D.3.4.1.4 Plasma.

Les protéines plasmatiques étaient partiellement précipitées avec 1 ml de HCl 1M par ml de plasma. Après centrifugation pendant 5 minutes à 3000g et à 4°C, le surnageant était récupéré et son pH ramené à 7 par addition de soude puis d'un tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  à 0,1 M. Cette étape permet d'éviter que les acides aminés plasmatiques ionisés ne se fixent sur la résine. Comme le plasma contient des quantités négligeables d'ions  $\text{NH}_4^+$  par rapport à la quantité d'urée, il est possible de procéder directement à l'hydrolyse de l'urée en ammoniac. Le surnageant neutralisé était placé sur résine et l'urée était extraite selon le même protocole que précédemment.

Au moment de l'analyse, les surnageants des résines (R1 et/ou R2) étaient jetés. On ajoutait alors 500  $\mu\text{l}$  ou 250  $\mu\text{l}$  (échantillons urinaires ou plasmatiques, respectivement) de solution de  $\text{KHSO}_4$  à 2,5 M ce qui permet l'éluion des ions  $\text{NH}_4^+$ . Après agitation au vortex, une fraction du surnageant était prélevée pour analyse en spectrométrie de masse à ratio isotopique.

#### *D.3.4.2 Préparation des esters N-Pivaloyl-2-Propyl d'acides aminés (NPP-AA).*

##### D.3.4.2.1 Extraction des acides aminés.

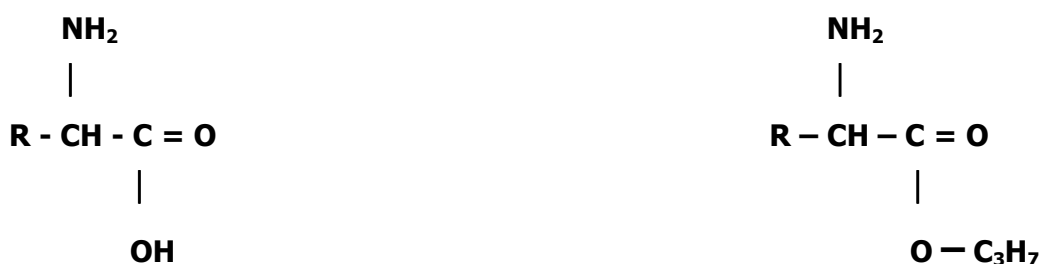
Un volume de plasma (0,7 ml) était homogénéisé 30 secondes au vortex puis centrifugé 1 minute à 3000 g. Les échantillons étaient ensuite acidifiés avec 1,4 ml d'acide chlorhydrique 1 M. Le standard interne (200 nmol d'acide amino-adipique) était ajouté.

Les acides aminés (plasmatiques ou des hydrolysats iléaux) étaient extraits sur une colonne contenant 2 ml de résine sous forme H<sup>+</sup> (Dowex AG50X8, mesh 100-200, Biorad, Ivry sur Seine, France). Un rinçage de la résine (8 ml d'eau distillée) était tout d'abord effectué. Les acides aminés étaient ensuite élués avec 3 ml de NH<sub>4</sub>OH 4M et 1 ml d'eau distillée. L'éluat, qui permettait le dosage de l'enrichissement en <sup>15</sup>N de chaque acide aminé individuellement, était séché au speed-vac.

#### D.3.4.2.2 Préparation des NPP-AA.

La première étape était la dérivation des acides aminés plasmatiques entraînant la formation des NPP-AA, composés volatils pouvant être analysés en chromatographie en phase gazeuse. La méthode utilisée était dérivée de celle décrite par Aichholz et Fischer (1989).

Les acides aminés étaient traités avec 1 ml d'une solution d'acétylchlorure 99% dans du 2-isopropanol (1,25 ml dans 5 ml, respectivement). Le mélange était incubé pendant une heure à 100°C. La réaction qui se développait était la suivante :



Les échantillons étaient ensuite séchés dans un courant d'azote à 60°C et repris dans 100 µl de pyridine.

Après ajout de 100 µl triméthylacetyl chloride 99%, et agitation sur vortex pendant 1 minute, les échantillons étaient incubés 30 minutes à 60°C. Ce produit doit être versé très lentement, sous peine d'une évaporation quasi-instantanée dans le cas contraire. S'est alors produit la réaction suivante :



Après refroidissement du mélange, 2 ml de dichlorométhane étaient ajoutés. L'échantillon était déposé sur une colonne de gel de silice afin d'y retenir toutes les impuretés. L'éluat était séché dans un courant d'azote de faible intensité et repris dans 50 µl d'éthylacétate pour l'injection. Le standard interne utilisé était l'acide amino-adipique initialement ajouté au plasma (2 nmol par microlitre de solution). Ces échantillons étaient ensuite analysés par spectrométrie de masse à ratio isotopique couplée à un chromatographe en phase gazeuse par une interface de combustion (GC – C – IRMS).

*D.3.4.3 Mesures de l'azote totale et de l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des échantillons par couplage Analyseur Élémentaire / Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique.*

L'analyseur élémentaire (NA 1500 série II, Fisons Instruments, Manchester) permet la mesure du pourcentage d'azote de l'échantillon. Le spectromètre de masse à ratio isotopique (Optima, Fisons Instruments, Manchester) détermine lui l'enrichissement isotopique en  $^{15}\text{N}$  (Figure 43).

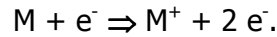
D.3.4.3.1 L'analyseur élémentaire.

L'échantillon, solide ou liquide, est placé dans une capsule d'étain soigneusement fermée et pesée. Introduite dans l'appareil, la capsule subit une combustion flash à 1020°C, en présence d'oxygène. Cette combustion aboutit à la formation de CO, NO, N, et H<sub>2</sub>O. Les composés halogénés et soufrés restent fixés dans le bas du tube de combustion. Les gaz produits sont dirigés vers un tube de réduction contenant du cuivre à 650°C et sont réduits en CO<sub>2</sub> et en N<sub>2</sub>. L'eau est piégée par du perchlorate de magnésium et le CO<sub>2</sub> par de l'ascarite. Le N<sub>2</sub> restant est concentré par chromatographie sur colonne Porapak QS à 60°C. Le N<sub>2</sub> est acheminé vers un détecteur à conductibilité thermique (TCD) qui permet de déterminer le pourcentage d'azote présent dans l'échantillon. Le standard élémentaire utilisé est l'atropine (teneur en azote : 4,81 ou 4,84%). A la sortie du détecteur, les gaz sont transportés par un gaz vecteur (l'hélium) jusqu'au spectromètre de masse où le rapport  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  pourra être déterminé.

L'azote total est ainsi mesuré dans les fractions protéiques et non protéiques des échantillons de tissus prélevés.

#### D.3.4.3.2 Le Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique.

Cet appareil se compose tout d'abord d'une chambre d'ionisation parcourue par un faisceau électronique et à travers laquelle les molécules de gaz diffusent. Le bombardement des molécules gazeuses par les électrons entraîne la formation d'ions positifs du même poids moléculaire que le gaz :



Les ions positifs sont extraits de la chambre d'ionisation par un « repousseur » (repeller) puis sont accélérés en direction du tube par une forte différence de potentiel. Le faisceau accéléré d'ions positifs entre dans l'analyseur qui comprend un tube de vol placé dans un champ électromagnétique assurant la déviation du faisceau. Le rayon de courbure de la trajectoire des ions est fonction de leur masse et de leur charge :

$$R = [(2Vm) / (ZB^2)]^{1/2}$$

où V est la différence de potentiel, m la masse de l'ion, Z sa charge et B la force du champ magnétique. La plupart du temps, la valeur de Z est 1 (c'est-à-dire que le bombardement électronique de la chambre d'ionisation ne provoque le départ que d'un seul électron) et les valeurs de V et B sont imposées ; le rayon de courbure n'est donc fonction que de la masse de l'ion. Le faisceau ionique est ainsi séparé en trois parties correspondant aux trois combinaisons isotopiques possibles liées à l'azote :  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ , de masse 30,  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$  de masse 29 et  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}$  de masse 28.

Les ions arrivent enfin sur un collecteur en métal auquel ils communiquent leur charge. Ce courant de décharge est ensuite amplifié et mesuré par un électromètre et dépend, en directe proportion, du nombre d'ions venant frapper le collecteur. Cette relation permet le calcul de l'enrichissement isotopique de l'échantillon qui s'exprime en Atom Pourcent (AT%) et qui représente le nombre d'atomes  $^{15}\text{N}$  par rapport au nombre total d'atomes  $^{15}\text{N}$  et  $^{14}\text{N}$  :

$$\text{Enrichissement en } ^{15}\text{N} = \frac{\text{nombre d'atomes } ^{15}\text{N}}{(\text{nombre d'atomes } ^{15}\text{N} + \text{nombre d'atomes } ^{14}\text{N})} \quad (\text{AT}\%)$$

L'enrichissement global en  $^{15}\text{N}$  est mesuré dans les fractions protéique et non protéique des échantillons de tissu prélevés ainsi que dans les protéines, les acides aminés et l'urée plasmatique et enfin dans l'urée et l'ammoniac urinaires.



#### D.3.4.4 Couplage GC-C-IRMS pour la mesure de l'enrichissement isotopique de chaque acide aminé.

Ces dosages ont été réalisés dans un laboratoire de l'Institut Allemand de Nutrition Humaine (Dife) à Bergholz-Rebrücke, en Allemagne, sous la direction du Dr. C. C. Metges.

Les échantillons sont passés sur un Spectromètre de Masse à Ratio Isotopique Finnigan Delta S (Finnigan MAT, Bremen, Allemagne) couplé à un Chromatographe en Phase Gazeuse (GC, HP 5890, Hewlett Packard, Waldbronn, Allemagne). Une interface de combustion permet la production et la purification de N<sub>2</sub> à partir des composés séparés par la chromatographie en phase gazeuse.

Une colonne capillaire Ultra 2 (50m, Hewlett Packard, Waldbronn, Allemagne) est utilisée pour la séparation des acides aminés. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium. Un automate (CTC A200S, CTC Analytics, Zwingen, Suisse) réalise l'injection de 0,5 µl d'échantillon en mode splitless. La température de l'injecteur est de 270°C. La programmation de température du four est : Température initiale : 40°C, puis chauffage de 40°C à 130°C à 25°C.min<sup>-1</sup>, puis de 130°C à 200°C à 3°C.min<sup>-1</sup>, et enfin de 200°C à 280°C à 20°C.min<sup>-1</sup>.

La température du détecteur est de 300°C. L'introduction d'un gaz N<sub>2</sub> standard (de composition isotopique connue) permet la calibration de l'appareil. Les données obtenues sont traitées de façon à avoir, pour chaque échantillon, l'enrichissement en <sup>15</sup>N de chaque acide aminé plasmatique ou iléal, individuellement.

### **D.3.5 Dosage des neuromédiateurs par HPLC (High Performance Liquid Chromatography).**

#### D.3.5.1 Préparation des échantillons.

Les échantillons de tissu prélevés, placés dans de la glace, étaient soniqués pendant 10 secondes (Systems sonifier, Plainview, NY, USA) dans un milieu d'extraction (100µl.mg<sup>-1</sup>) dont la composition est donnée dans le tableau 26. Ils étaient ensuite centrifugés dans une microcentrifuge à Eppendorfs (15 minutes, 15000 g, 4°C). Le surnageant était récupéré, filtré (0,22µm, Fischer, Santa Clara, CA, USA) et aliquoté pour l'analyse des neuromédiateurs et celle des acides aminés.

### D.3.5.2 Dosage des neuromédiateurs par HPLC.

L'analyse des neuromédiateurs a été réalisée par HPLC avec détection électrochimique (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA). Cinq  $\mu\text{l}$  d'échantillon étaient injectés sur une colonne Microbore (C18,  $150 \times 1\text{mm}$ , Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA). La phase mobile contenait  $37,5 \text{ mmol.l}^{-1}$  d'hydroxyde de sodium ;  $1,04 \text{ mmol.l}^{-1}$  d'EDTA ;  $110 \text{ mmol.l}^{-1}$  d'acide citrique et  $1,71 \text{ mmol.l}^{-1}$  d'acide 1-octanesulfonique à pH 3,15. La vitesse du flux de la phase mobile était  $50 \mu\text{l.min}^{-1}$ .

Le standard externe était composé d'une solution de neurotransmetteurs dans de l'acide perchlorique (NE, DOPAC, DA, 5-HIAA, HVA et 5-HT, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) à une concentration de  $5 \text{ pg.}\mu\text{l}^{-1}$ . Il était injecté avant chaque série d'analyses et permet l'identification des pics du chromatogramme en fonction du temps d'élution, ainsi que la quantification par évaluation de l'aire des pics.

## **D.4 CALCULS & STATISTIQUES.**

### **D.4.1 Mesures de digestibilité.**

#### D.4.1.1 Flux d'azote dans l'intestin.

Le flux d'azote total,  $F_{N_{\text{tot}}}$  ( $\text{mmol.30min}^{-1}$ ), au temps  $i$ , est égal à :

$$F_{N_{\text{tot}}} = N_i \times MS_i \times D_i / 14 / 10 \quad [1]$$

avec

$N_i$  : teneur en azote dans l'échantillon lyophilisé ( $\text{g.100 g}^{-1}$ ),

$MS_i$  : matière sèche de l'échantillon recueilli ( $\text{g.100 ml}^{-1}$ ),

$D_i$  : débit liquidien au temps  $i$  ( $\text{ml.30 min}^{-1}$ ).

Le flux d'azote exogène,  $F_{N_{\text{exo}}}$  ( $\text{mmol.30min}^{-1}$ ), au temps  $i$ , est égal à :

$$F_{N_{\text{exo}}} = F_{N_{\text{tot}}} \times (AP_i - AP_0) / (AP_r - AP_0) \quad [2]$$

avec

$AP_i$  : enrichissement de l'échantillon en azote  $^{15}\text{N}$ ,

$AP_0$  : enrichissement basal de l'échantillon,

$AP_r$  : enrichissement du repas en azote  $^{15}\text{N}$ .

#### D.4.1.2 Azote exogène et endogène dans le tube digestif.

La quantité d'azote exogène présent dans l'échantillon,  $N_{\text{exo}}$  (mmol) est évaluée par le calcul suivant [1] :

$$N_{exo} = N_{tot} \times (AP_i - AP_0 / AP_r - AP_0) \quad [3]$$

avec

- $N_{tot}$  : azote total dans l'échantillon (mmol),
- $AP_r$  : enrichissement du repas en azote  $^{15}\text{N}$ ,
- $AP_i$  : enrichissement de l'échantillon en azote  $^{15}\text{N}$ ,
- $AP_0$  : enrichissement basal de l'échantillon.

La quantité d'azote endogène est ensuite calculée par différence entre la quantité totale d'azote et la quantité d'azote exogène.

#### D.4.1.3 Acides aminés exogènes.

La quantité d'acides aminés alimentaires retrouvés dans les échantillons intestinaux a été calculé, pour chaque acide aminé selon la formule :

$$AA_{exo} = AA_{tot} \times [(AP_{AA} - AP_0) / (AP_{repas} - AP_0)] \quad [4]$$

avec

$AA_{tot}$  : quantité totale de l'acide aminé considéré dans l'échantillon (AA libre + AA lié aux peptides et aux protéines)

- $AP_{AA}$  : enrichissement individuel en azote  $^{15}\text{N}$  de l'acide aminé
- $AP_{repas}$  : enrichissement en azote  $^{15}\text{N}$  du repas
- $AP_0$  : enrichissement basal individuel en azote  $^{15}\text{N}$  de l'acide aminé

La quantité d'AA endogènes est ensuite calculée par différence entre la quantité totale d'AA et la quantité d'AA exogènes.

#### D.4.1.4 Digestibilités.

##### D.4.1.4.1 Chez le rat : digestibilité cœcale.

La digestibilité de l'azote et des acides aminés a été calculée selon la formule suivante :

$$DIG = (Q_{ingérée} - Q_{retrouvée\ dans\ le\ caecum}) \times 100 / Q_{ingérée} \quad [5]$$

avec

- $Q_{ingérée}$  : quantité d'azote ou d'acides aminés ingérés (mmol)
- $Q_{retrouvée\ dans\ le\ caecum}$  : quantité d'azote ou d'acides aminés retrouvés dans le caecum 6 heures après le repas (mmol).

#### D.4.1.4.2 Chez l'homme : digestibilité iléale.

Les digestibilités iléales de l'azote et des acides aminés alimentaires ont été calculées ainsi:

$$DIG = (Q_{ingérée} - Q_{retrouvée\ dans\ l'iléon}) \times 100 / Q_{ingérée} \quad [6]$$

avec

$Q_{ingérée}$  : quantité d'azote ou d'acides aminés ingérés (mmol)

$Q_{retrouvée\ dans\ l'iléon}$  : quantité cumulée d'azote ou d'acides aminés retrouvés dans l'iléon terminal 8 heures après le repas (mmol).

### D.4.2 Mesure de la distribution postprandiale de l'azote alimentaire.

#### D.4.2.1 Dans les effluents intestinaux.

Le flux intestinal d'absorption de l'azote exogène a été calculé d'après les quantités d'azote exogène qui disparaissent de l'estomac et de la lumière intestinale en 1 heure :

$$Q_A (\% \text{ de l'azote ingéré} \cdot h^{-1}) = \quad [7]$$

$$((N_{exo}E_t - N_{exo}E_{t+1} + N_{exo}I_t) - (N_{exo}C_{t+1} - N_{exo}C_t - N_{exo}I_{t+1})) * 100 / N_{ingéré}$$

avec

$N_{exo}E_t$  : quantité d'azote exogène retrouvé dans l'estomac au temps t

$N_{exo}I_t$  : quantité d'azote exogène retrouvé dans l'intestin au temps t

$N_{exo}C_t$  : quantité d'azote exogène retrouvé dans le caecum au temps t

$N_{ingéré}$  : quantité d'azote ingéré.

#### D.4.2.2 Dans les tissus.

La quantité d'azote exogène présent dans l'échantillon de tissu,  $N_{exo}$  (mmol) est évaluée par la formule [1].

Dans l'étude portant sur l'animal, les résultats concernant les muscles ont été exprimés pour la totalité de la masse musculaire (MMT, g) qui a alors été évaluée en utilisant la formule suivante :

$$MMT = 0,45 \times PC \quad [8]$$

où 45% représente le pourcentage moyen de muscle chez le rat Wistar (Even P. C., INRA UPNCA, données personnelles).

Le pourcentage d'azote alimentaire ingéré ( $P_N, \%$ ) retrouvé dans les différents tissus a été évalué selon la formule suivante :

$$P_N = N_{exo\ tot} / N_r \quad [9]$$

avec

$N_{exo\ tot}$  : quantité totale d'azote exogène retrouvé dans le tissu (mmol)

$N_r$  : quantité totale d'azote exogène ingéré pendant le repas (mmol).

Le taux de synthèse protéique dans les muqueuses intestinales ( $FSR, \% \cdot j^{-1}$ ) a été calculé en considérant que les acides aminés issus de la lumière intestinale étaient les précurseurs de la synthèse protéique au niveau des cellules de la muqueuse intestinale (Stoll *et al.* 1999a):

$$FSR = (AP_{muqueuse} - AP_0) / (AP_{repas} - AP_0) \times (24 / t) \times 100 \quad [10]$$

avec

$AP_{muqueuse}$  : enrichissement en azote  $^{15}N$  des protéines de la muqueuse

$AP_{repas}$  : enrichissement en azote  $^{15}N$  du repas

$AP_0$  : enrichissement basal en azote  $^{15}N$  des protéines de la muqueuse

$t$  : temps d'incorporation exprimé en heures.

#### D.4.2.3 Dans les produits d'oxydation.

Chez le rat, l'azote exogène incorporé dans le pool d'urée corporel ( $N_{exo-urée}$ , mmol) est calculé comme suit:

$$N_{exo\ urée} = C_{urée} \times 0.67 / 0.92 \times PC \times (AP_{urée} - AP_0 / AP_r - AP_0) \quad [11]$$

avec

$PC$  : poids corporel (g),

$C_{urée}$  : concentration d'urée dans le plasma ( $mmol \cdot l^{-1}$ ),

$AP_{urée}$  : enrichissement de l'urée plasmatique en azote  $^{15}N$ ,

$AP_r$  : enrichissement du repas en azote  $^{15}N$ .

Soixante sept% et 92% sont les pourcentages d'eau corporelle et le pourcentage moyen d'eau dans le plasma, respectivement (Sharp & La Regina, 1998).

Chez l'homme, nous avons utilisé les mesures de l'eau corporelle totale (ECT) que nous avons obtenues par impédance bio-électrique :

$$C_{urée} \times ECT \times 0,92 \quad [12]$$

avec

$C_{urée}$  : urémie plasmatique ( $mmol \cdot l^{-1}$ ),

ECT : eau corporelle totale (l) mesurée par Impédance Bio-électrique

0,92 : facteur de correction pour tenir compte de la teneur en eau du plasma.

La désamination totale (Désam, mmol), qui représente la quantité totale d'azote exogène désaminé au temps t, est calculée comme la somme de l'azote exogène excrété dans l'urée urinaire et l'azote exogène présent dans le pool d'urée corporelle. En effet, l'azote exogène excrété dans les urines provient majoritairement de l'azote exogène présent dans le pool de l'urée corporelle dont le renouvellement est lent.

$$Désam = N_{exo\ urée} + \Sigma U_{exo} \quad [13]$$

avec

$N_{exo\ urée}$  : azote exogène dans le pool d'urée corporelle (mmol),

$\Sigma U_{exo}$  : azote exogène total excrété dans l'urine (mmol).

#### D.4.2.4 Calcul de l'Utilisation Postprandiale Protéique Nette (UPPN).

L'Utilisation Postprandiale Nette (UPPN,%) des protéines alimentaires étudiées correspond à l'azote alimentaire réellement retenu par l'organisme. Le calcul suivant est utilisé:

$$(N_{exo\ absorbé} - Désam) / N_{exo\ ingéré} \quad [14]$$

soit :

$$[N_{exo\ ingéré} - (N_{exo\ iléal} + N_{exo\ dans\ le\ pool\ d'urée\ corporelle} + N_{exo\ excrété\ dans\ l'urine})] / N_{exo\ ingéré} \quad [15]$$

#### D.4.2.5 Dans les acides aminés plasmatiques.

Les quantités cumulées d'acides aminés porteurs d'un  $^{15}\text{N}$  qui traversent le pool plasmatique pendant les 5 heures de l'expérience sont calculées comme suit:

$$\text{Aire sous la courbe } \int (\text{concentration en acides aminés} \times (AP_{AA} - AP_0 / AP_r - AP_0)) \text{ vs } \text{temps} \quad [16]$$

avec

$AP_{AA}$  : enrichissement en azote  $^{15}\text{N}$  des acides aminés,

$AP_r$  : enrichissement en azote  $^{15}\text{N}$  du repas,

$AP_0$  : enrichissement basal en azote  $^{15}\text{N}$  des acides aminés.

L'aire sous la courbe est calculée selon la méthode trapézoïdale.

### **D.4.3 Calorimétrie : calcul des oxydations glucidique, lipidique et protéique postprandiales.**

#### *D.4.3.1 Oxydation protéique (Pox).*

Pox est calculée à partir des données de production totale d'urée [N] selon la formule standard :

$$Pox = [N] \times 6,25 \quad [17]$$

La production totale d'urée a été évaluée à partir des quantités d'urée excrétée dans les urines (collectées pendant l'expérience de calorimétrie) et à partir des variations de la taille du pool d'urée corporelle mesurées grâce aux prélèvements sanguins réalisés via le cathéter jugulaire. Les données collectées permettaient une mesure de Pox toutes les 30 minutes, les valeurs données toutes les 15 minutes étant obtenues par extrapolation linéaire. Pox est exprimée en Watts, sachant que l'oxydation d'un gramme de protéine produit 18,21 kJ (soit 4,35 kcal).

#### *D.4.3.2 Oxydations glucidique et lipidique (Gox et Lox).*

Gox et Lox sont évaluées à partir des données de  $VO_2$  et  $VCO_2$  obtenues par mesure des échanges gazeux en utilisant les formules stoéchiométriques habituelles, et après correction de  $VO_2$  et  $VCO_2$  du fait de l'oxydation protéique et de l'activité de animaux. Les données obtenues sont exprimées en Watts, sachant que l'oxydation d'un gramme de glucose produit 15,70 kJ (3,75 kcal) et celle d'un gramme de lipide 37,64 kJ (9 kcal).

### **D.4.4 Expression des résultats hormonaux.**

Les aires sous les courbes Glucose, Insuline et Glucagon sont calculées par la méthode trapézoïdale sur les 8 heures après le repas et en ne considérant que les aires positives.

### **D.4.5 Expression des résultats concernant les neuromédiateurs.**

L'activité du système dopaminergique est évaluée par le calcul des ratios :

$$R_{dopac} = [DOPAC] / [DA] \quad [18]$$

et

$$R_{hva} = [HVA] / [DA] \quad [19]$$

avec

DOPAC : concentration en acide 3, 4 dihydroxyphénylacétique dans l'aire cérébrale considérée ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

HVA: concentration en acide homovanillique dans l'aire cérébrale considérée ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

DA : concentration en dopamine dans l'aire cérébrale considérée ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

#### **D.4.6 Statistiques.**

Les résultats sont exprimés sous la forme Moyenne  $\pm$  SEM. Dans les protocoles "Rat" où, à chaque heure, les sujets sont différents, les différences entre les groupes ainsi que celles avec le groupe n'ayant pas ingéré de repas (i.e. les valeurs basales), le cas échéant, ont été testées par une ANOVA à 1 facteur (Proc GLM, SAS/STAT, 6.11, SAS Institute, Cary, NC, USA).  $P < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

Dans les protocoles "Homme", où l'on retrouve les mêmes sujets sur toute la durée de l'étude, l'effet "Adaptation", étudié heure par heure, a été testé par une ANOVA à 1 facteur (Proc GLM, SAS/STAT, 6.11, SAS Institute, Cary, NC, USA). Une ANOVA à 2 facteurs a été effectuée pour tester l'effet global du régime, du temps et de leur interaction (régime x temps) sur certains paramètres calculés sur la totalité de la période d'étude (Proc GLM, SAS/STAT, 6.11, SAS Institute, Cary, NC, USA).  $P < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.

Les comparaisons entre les protéines de lait et de soja ont été réalisées par ANOVA à 1 facteur ou à 1 facteur avec mesures répétées (Proc GLM, SAS/STAT, 6.03, SAS Institute, Cary, NC, USA).  $P < 0,05$  a été considéré comme statistiquement significatif.



## **E RESULTATS**

### **E.1 METABOLISME INTESTINAL ET DIGESTIBILITE DE L'AZOTE ET DES ACIDES AMINES ALIMENTAIRES ET ENDOGENES.**

#### **E.1.1 Evaluation de la digestibilité de l'azote et des acides aminés alimentaires chez le rat.**

Nous avons évalué, chez le rat, la digestibilité de 2 protéines (lait et soja, protéine animale vs protéine végétale). La technique de la GC-C-IRMS a permis l'évaluation de la digestibilité individuelle de chaque AA.

##### *E.1.1.1 Quantités d'azote et d'acides aminés individuels retrouvés dans le tractus digestif.*

Les quantités d'azote et d'AA alimentaires retrouvés dans les différents segments du tube digestif sont présentées sur la figure 44. Une faible quantité d'azote alimentaire était encore présente dans l'estomac 6 heures après le repas quelque soit le groupe (lait ou soja). Dans l'intestin grêle et dans le caecum, les quantités d'azote et d'AA alimentaires retrouvés étaient légèrement supérieures chez les rats ayant ingéré les protéines de lait, mais ces différences n'étaient pas significatives. Dans le caecum, 32 et 41% de l'azote alimentaire n'était pas issu des AA alimentaires dans les groupes Lait et Soja, respectivement. Le pourcentage d'azote alimentaire encore présent dans l'ensemble du tube digestif 6 heures après le repas était de  $2,94 \pm 0,57\%$  dans le groupe Lait et  $2,66 \pm 0,69\%$  dans le groupe Soja, ces valeurs n'étant pas statistiquement différentes.

Le tableau 27 présente les quantités de chaque AA présent dans l'intestin grêle et le caecum 6 heures après le repas. Les données obtenues montrent que c'est dans le caecum que sont retrouvés le plus d'AA alimentaires, ce phénomène étant d'ailleurs plus prononcé dans le cas des protéines de lait. La quantité de Glx alimentaire retrouvé dans le caecum était 2 fois plus importante après le repas à base de protéines de lait qu'après celui contenant des protéines de soja ( $P < 0,05$ ). Par contre plus de Tyr alimentaire était retrouvée dans le caecum des rats du groupe Soja que dans celui des rats du groupe Lait ( $P < 0,05$ ).

##### *E.1.1.2 Digestibilités des acides aminés alimentaires individuels et de l'azote alimentaire.*

La digestibilité individuelle des AA était comprise entre 96,7% (Ile) et 99,6% (Tyr) pour la protéine de lait et entre 96,3% (Asx) et 99,4% (His) pour la protéine de soja

(Tableau 28). Les digestibilités individuelles de Asx, Pro, Thr, Leu et Phe étaient significativement plus élevées dans le groupe Lait, par contre, celles de Glx, Gly, Tyr et Ile étaient significativement plus faibles. Les calculs de digestibilité des deux protéines totales à partir des données concernant les AA individuels ou à partir des données concernant l'azote alimentaire donnaient des résultats très proches (97,9 et 97,8% respectivement pour le lait et 98,2 et 97,9% respectivement pour le soja).

### **E.1.2 Flux et digestibilité iléale de l'azote et des acides aminés alimentaires et endogène chez l'homme.**

L'effet de la nature de la protéine (animale ou végétale) sur la digestibilité des acides aminés au niveau iléal a été évalué chez le volontaire sain après ingestion d'un repas à base de protéines de lait ou de soja marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$ . La GC-C-IRMS a permis l'évaluation des digestibilités individuelles des AA alimentaires.

#### *E.1.2.1 Azote endogène et alimentaire dans les échantillons iléaux.*

Les figures 45 et 46 présentent le flux d'azote endogène et l'apparition d'azote alimentaire (en valeurs cumulées) dans les digesta iléaux après le repas contenant des protéines de lait ou de soja. Le flux d'azote endogène était stimulé pendant les 2-3 premières heures après le repas, avec un maximum 1 heure après le repas dans le groupe lait et 2 heures après le repas dans le groupe Soja. Les pertes endogènes d'azote en conditions post-absorptives – calculées entre 5 et 8 heures après le repas – étaient de  $2,4 \pm 1,6 \text{ mmol.h}^{-1}$  dans le groupe Lait et  $3,5 \pm 1,7 \text{ mmol.h}^{-1}$  dans le groupe Soja. Les pertes d'azote exogène cumulées étaient significativement ( $P < 0,05$ ) plus importantes entre la 3<sup>ème</sup> et la 8<sup>ème</sup> heure après l'ingestion de protéines de soja par rapport aux valeurs obtenues après l'ingestion des protéines de lait et atteignaient  $26,2 \pm 5,5 \text{ mmol}$  et  $13,7 \pm 3,5 \text{ mmol}$  dans les groupes Soja et Lait, respectivement, 8 heures après le repas ( $P < 0,05$ ).

#### *E.1.2.2 Composition des pertes azotées d'origine endogène.*

Les résultats concernant la contribution respective des AA et des autres composés azotés (non-AA) au flux d'azote endogène dans l'iléon sont présentés dans le tableau 29. Les pertes d'AA endogènes calculées sur les 8 heures de la période postprandiale étaient significativement plus importantes après le repas soja qu'après le repas lait ( $P < 0,05$ ). En moyenne, l'azote provenant des AA représentait 31% et 46% de l'azote endogène dans les groupes Lait et Soja, respectivement, sur l'ensemble de la période expérimentale.

La figure 47 donne la composition du flux d'acides aminés endogènes dans l'iléon. La contribution des AA au flux d'azote endogène était maximale 2 heures après le repas. De plus, il apparaît que la Gly endogène représente, dans les 2 groupes, une part très importante du flux d'AA endogènes. Les concentrations iléales en Pro, Asx (dans le groupe Soja surtout), Thr, Ser et Ala étaient parmi les plus fortes de l'ensemble des mesures réalisées. Les flux de His, Phe, Lys, Tyr et Ile étaient de beaucoup moindre importance. Les pertes plus élevées d'AA endogènes du groupe Soja étaient principalement dues aux pertes en Val, Leu, Lys, Ala et Asx (Anova sur mesures répétées,  $P < 0,05$ ).

#### *E.1.2.3 Composition des pertes azotées d'origine alimentaire.*

La contribution relative des AA et des autres composés azotés aux quantités cumulées d'azote alimentaire retrouvé dans l'iléon est présentée dans le tableau 30. La majeure partie de l'azote alimentaire non absorbé provenait des AA, surtout pour les sujets Lait, chez lesquels seulement 18% de l'azote alimentaire n'était pas issu des AA. Cette valeur atteignait 31% dans le groupe Soja. Les pertes d'azote provenant des AA alimentaires n'étaient pas différentes entre les groupes contrairement aux pertes d'azote issu des autres composés azotés (peptides et protéines) ( $P < 0,05$ ). L'apparition cumulée des AA individuels d'origine exogène dans l'iléon est représentée sur la figure 48. Parmi les AA indispensables, la Leu (dans le groupe Soja,  $P < 0,05$  Soja vs Lait) et la Thr (dans le groupe Lait) sont ceux pour lesquels les valeurs atteintes sont les plus importantes. En ce qui concerne les AA non indispensables, des quantités plus élevées de Ala, Gly et Asx ont été retrouvées dans l'iléon après le repas Soja qu'après le repas Lait.

#### *E.1.2.4 Digestibilités des AA individuels et de l'azote.*

Dans le groupe Soja, la digestibilité la plus faible a été observée pour la Thr (89,0%) et la plus forte pour la Tyr (96,8%) ; dans le groupe Lait, la digestibilité la plus faible a été mesurée pour la Gly (91,6%) et la plus forte pour la Tyr (99,3%) (Tableau 31). Les digestibilités de la Val, la Thr, l'His, la Tyr, l'Ala et de la Pro étaient significativement plus faibles après l'ingestion des protéines de soja qu'après l'ingestion des protéines de lait ( $P < 0,05$ ). Dans le groupe Soja, la digestibilité de l'azote (DigN = 95,3%) était significativement inférieure à celle calculée dans le groupe Lait (DigN = 91,7%). Par contre, quand cette digestibilité était calculée à partir des digestibilités individuelles des AA (DigNAA), cette différence n'était plus significative (95,3% et 93,8%, dans les groupes Lait et Soja, respectivement).

### **E.1.3 Contribution des pertes iléales journalières aux besoins en AA.**

Ces données expérimentales ont permis l'estimation des pertes journalières en azote dans l'intestin grêle. Plusieurs hypothèses ont été nécessaires à ce calcul : (1) les quantités d'azote retrouvé dans l'iléon terminal ont été considérées comme irrémédiablement perdues pour l'organisme, et (2) le repas expérimental représentait un tiers de l'apport protéique journalier. En multipliant par 3 les quantités cumulées d'AA (d'origine endogène ou alimentaire) retrouvés dans l'intestin, nous avons pu calculer les pertes quotidiennes totales en AA ( $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ), en pondérant par le poids des sujets. Les pertes totales les plus importantes ont été observées pour l'Asp (8 à 13  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ), la Pro (6 à 6,8  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) et la Thr (5 à 7  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ). En ce qui concerne les pertes en AA alimentaires, les valeurs maximales étaient obtenues pour l'Asp et la Glx (5 à 9  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ). Le tableau 32 présente l'ensemble des résultats obtenus et une comparaison avec les estimations des besoins (FAO, 1985 et M. I. T., 1989). Les pertes en Lys et Thr représentaient 17% et 63% des valeurs généralement acceptées d'apports recommandés (FAO/OMS/UNU, 1985) dans le groupe Lait. Après l'ingestion de protéines de soja, la plus faible valeur était obtenue pour l'His (21%) et la plus forte pour la Thr (75%). Les pertes alimentaires de Thr atteignaient 40% et 52% des apports recommandés après les repas Lait et Soja, respectivement et correspondaient aux plus fortes valeurs atteintes.

## **E.2 EFFETS D'UNE VARIATION AIGUË OU CHRONIQUE DU NIVEAU D'APPORT PROTÉIQUE SUR LE MÉTABOLISME PROTÉIQUE POSTPRANDIAL CHEZ LE RAT.**

Le métabolisme protéique postprandial a été étudié chez le rat après adaptation à un niveau usuel d'apport protéique (14% MS) ou après adaptation à un apport protéique élevé (50% MS) afin d'évaluer les conséquences du niveau habituel d'apport en protéines sur le devenir de l'azote et des acides aminés alimentaires après un repas. Nous avons comparé ces résultats à ceux obtenus après le premier repas hyperprotéique ingéré par des animaux adaptés à un apport normoprotéique, c'est-à-dire chez des animaux soumis à une variation aiguë de l'apport protéique.

## **E.2.1 Prise alimentaire, croissance, caractéristiques biochimiques et neurochimiques des animaux**

### *E.2.1.1 Prise alimentaire et croissance au cours de l'adaptation.*

La prise alimentaire et la croissance des animaux ont été enregistrées quotidiennement pendant les 15 jours d'adaptation aux régimes (Figures 49 et 50, respectivement).

La prise alimentaire des animaux a été, dans les 2 groupes, réduite durant les 2 premiers jours de régime. Durant cette première phase, la consommation des animaux du groupe HP était très inférieure à celle des animaux AP ( $P < 0,0001$ ). A partir du troisième jour, la prise alimentaire des rats des 2 groupes a atteint un niveau satisfaisant ( $20,8 \pm 0,1$  g MS.j<sup>-1</sup> – soit  $309,8 \pm 1,8$  kJ.j<sup>-1</sup> – dans le groupe AP et  $19,3 \pm 0,1$  g MS.j<sup>-1</sup> – soit  $302,9 \pm 2,0$  kJ.j<sup>-1</sup> – dans le groupe HP) c'est-à-dire permettant une prise de poids journalière conforme à la normale. Des variations de l'ingéré journalier ont été observées d'un jour à l'autre dans les 2 groupes mais globalement la consommation restait stable, les animaux du groupe HP ayant un ingéré énergétique légèrement inférieur à celui des animaux du groupe AP.

Les animaux se sont bien adaptés au pattern proposé (3 repas par jour). En 2 ou 3 jours, ils consommaient la totalité des 3 g du petit-déjeuner. La répartition de la prise alimentaire entre les 2 autres repas variait d'un jour à l'autre et d'un animal à l'autre.

Durant les 2 premiers jours de la période d'adaptation, les animaux du groupe HP perdaient du poids ( $-6,9 \pm 0,6$  g par jour). Ensuite leur gain de poids journalier était de  $5,2 \pm 0,1$  g et de  $5,5 \pm 0,2$  g pour les animaux du groupe AP (différence non significative). La prise de poids cumulée sur 15 jours était de  $54,9 \pm 6,2$  g chez les rats ayant consommé le régime à 50% de protéines, contre  $67,6 \pm 2,2$  g chez les rats ayant consommé le régime à 14% de protéines ( $P < 0,001$  AP vs HP). Cette différence s'explique principalement par la nette sous-consommation du régime par les animaux HP pendant les 2 premiers jours de régime: ils perdent du poids et n'arrivent jamais à combler ce déficit pendant la suite de l'adaptation. Le ratio d'efficacité du régime a pu être calculé sur les 15 jours d'adaptation (Prise de poids cumulée / Prise alimentaire cumulée). Il est significativement plus élevé chez les animaux du groupe AP que chez ceux du groupe HP ( $0,020 \pm 0,004$  g.kJ<sup>-1</sup> et  $0,017 \pm 0,001$  g.kJ<sup>-1</sup>, respectivement,  $P < 0,0001$ ).

*E.2.1.2 Caractéristiques biochimiques et composition corporelle des animaux à la fin de la période d'adaptation.*

Les poids, teneurs en azote protéique et non protéique des organes prélevés (Tableau 33) ainsi que les teneurs plasmatiques en acides aminés, urée et protéines (Tableau 34) ont été mesurés chez les rats à jeun après les 15 jours d'adaptation aux régimes AP ou HP.

Les poids des foie, muqueuses de l'intestin proximal, médian et du côlon, ainsi que du rein étaient significativement plus élevés chez les rats du groupe HP ( $P < 0,05$ ), et ce que les résultats soient exprimés par rapport au poids total de l'animal ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ) ou non.

Le niveau d'apport protéique pendant la période d'adaptation a aussi eu un effet sur les teneurs en azote protéique ou non protéique des organes. Ainsi, il y avait significativement plus d'azote protéique dans les muqueuses de l'intestin proximal et médian (+ 90 et +14  $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ , respectivement) et moins d'azote protéique dans la muqueuse colique (- 50  $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ) chez les animaux du groupe HP par rapport à ceux du groupe AP. Des différences significatives étaient observées au niveau de tous les organes en ce qui concerne l'azote non protéique, mais les résultats les plus frappants concernaient le foie (+ 93  $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ) et le muscle où la teneur en azote non protéique était pratiquement doublée par l'adaptation au régime HP ( $9346 \pm 210$  vs  $4380 \pm 125 \mu\text{mol} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ,  $P < 0,05$ , HP vs AP, respectivement). Les différences observées étaient similaires que les teneurs en azote total soient ou non rapportées au poids corporel de l'animal.

Un effet du niveau d'apport protéique pendant la période d'adaptation a aussi été noté sur certains paramètres biochimiques plasmatiques. Ainsi l'urémie plasmatique mesurée à jeun était très nettement supérieure chez les animaux HP par rapport aux animaux AP ( $12,4 \pm 1,2$  et  $5,4 \pm 0,4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ , respectivement,  $P < 0,05$ , HP vs AP). Par contre, les teneurs plasmatiques en protéines n'ont pas été affectées par le niveau d'apport protéique de la période d'adaptation. Certaines concentrations basales en acides aminés plasmatiques étaient différentes entre les 2 groupes. Ainsi, une élévation significative ( $P < 0,05$ ) était observée pour les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (Leu, Ile et Val): +80%, +96% et +63%, respectivement. Une diminution significative ( $P < 0,05$ ) était par contre observée pour His (-29%), Met (-89%), Thr (-34%), Gly (-58%), Ser (-34%), Asp (-63%), Gln (-24%) soit une diminution de 27% pour les acides aminés indispensables à chaîne latérale non ramifiée totaux et de 20% pour l'ensemble des acides aminés non indispensables.

*E.2.1.3 Variations des concentrations en neurotransmetteurs dans 3 zones cérébrales en relation avec les modifications de la prise alimentaire induites par un régime hyperprotéique chez le rat.*

Les neuromédiateurs ont été dosés au niveau de 3 zones cérébrales, le noyau du tractus solitaire (NTS), l'area postrema (APo) et l'hypothalamus latéral (LH).

Sept molécules neuromédiatrices ont été étudiées : noradrénaline (NA), 3-HK, 5-HT (sérotonine) et l'un de ses dérivés (5-HIAA), ainsi que dopamine (DA) et ses dérivés (DOPAC et HVA) (Figures 51, 52 et 53).

C'est au niveau du NTS que les variations les plus sensibles des concentrations en neuromédiateurs ont été observées, et tout particulièrement en ce qui concerne le système dopaminergique. Ainsi, 3 heures après l'ingestion du repas la teneur en DA était significativement plus faible dans le groupe cAP-14 que dans le groupe cHP-50. C'est pour le DOPAC que les résultats les plus sensibles étaient observés. Ainsi, dans le groupe cHP-50, la teneur en DOPAC ne dépassait jamais  $0,06 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  de tissu, et cette valeur était significativement inférieure à celle du groupe cAP-14, quel que soit le temps considéré. Chez les animaux du groupe cAP-50, pour lesquels la concentration basale en DOPAC était assez élevée, une chute très sensible du taux de DOPAC était observée jusqu'à des valeurs proches de celles des animaux du groupe cHP-50 (à 5 heures par exemple :  $0,002 \pm 0,001 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  de tissu chez les rats du groupe cAP-50 et  $0,004 \pm 0,003 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$  de tissu chez les rats du groupe cHP-50,  $P > 0,05$ ). La concentration mesurée 5 heures après l'ingestion du repas était, dans le groupe cAP-50, 30 fois inférieure à la valeur basale. En ce qui concerne le système sérotoninergique (5-HT et 5-HIAA), les concentrations observées étaient très stables, que ce soit d'un groupe à l'autre ou dans le temps. Seule était notée une différence significative pour le 5-HIAA entre les animaux du groupe cAP-14 et ceux du groupe cHP-50, 5 heures après le repas. Les tableaux 35 et 36 présentent les résultats concernant l'activité dopaminergique, exprimée par les ratios DOPAC/DA et HVA/DA. Une baisse très sensible de cette activité était notée dans le groupe cAP-50, où le ration DOPAC/DA passait de  $0,30 \pm 0,09$  en basal à  $0,03 \pm 0,02$  5 heures après le repas, même si cette baisse n'était pas statistiquement significative. Dans le groupe cAP-14, le ratio DOPAC/DA était assez élevé tout au long de l'expérience et ne variait pas au cours du temps (moyenne calculée sur la totalité de l'expérience :  $0,50 \pm 0,14$ ). Dans le groupe cHP-50, cette activité était extrêmement basse (moyenne calculée sur la totalité de l'expérience :  $0,05 \pm 0,02$ ). Aucune tendance significative n'était observée pour le ration HVA/DA, si ce n'est des valeurs légèrement plus faibles dans le NTS des animaux du groupe cAP-50.

Au niveau de l'area postrema, les seules différences significatives observées l'étaient pour le 5-HT cinq heures après le repas où la teneur en sérotonine de l'APo des rats du groupe cAP-50 était significativement plus élevée que celle des animaux du groupe cAP-14 et pour la NA 3 heures après le repas où les valeurs obtenues dans le groupe cAP-14 étaient significativement plus élevées que celles obtenues dans le groupe cHP-50. Aucune variation notable de l'activité dopaminergique n'était à noter dans cette zone. Par contre les valeurs obtenues étaient très nettement supérieures dans cette zone que dans les autres zones étudiées, que ce soit pour le ratio DOPAC/DA ou pour le ratio HVA/DA.

Enfin, dans le LH, seules 2 différences significatives étaient observées : à 5 heures en ce qui concerne le 3-HK (cAP-14 vs. cHP-50,  $P < 0,05$ ) et à 3 heures en ce qui concerne la DA (cAP-14 vs cHP-50,  $P < 0,05$ ). L'activité dopaminergique mesurée par le ratio DOPAC/DA au niveau du LH ne montrait pas de variations d'un groupe à l'autre ou dans le temps, et était assez peu élevée. Les résultats concernant le ratio HVA/DA ne sont pas présentés.

## **E.2.2 Cinétiques d'absorption de l'azote alimentaire et évolution postprandiale des acides aminés plasmatiques chez des rats ingérant un régime hyperprotéique pour la première fois ou après adaptation.**

### *E.2.2.1 Cinétiques lumineales.*

Le niveau d'apport protéique pendant la période d'adaptation (AP ou HP) ainsi que la teneur en protéines du repas test (14% ou 50%) ont eu peu d'influence sur la vidange gastrique des protéines (Figure 54). Pendant les 2 premières heures du repas, le taux de vidange était un peu plus faible dans le groupe AP-14 que dans les groupes AP-50 et HP-50, cette tendance s'inversant après 2-3 heures. Et finalement, 5 heures après le repas, il restait significativement ( $P < 0,05$ ) beaucoup plus d'azote alimentaire dans l'estomac des rats du groupe AP-50 ( $0,824 \pm 0,238$  mmol) que dans celui des rats du groupe AP-14 ( $0,015 \pm 0,031$  mmol), le groupe HP-50 se situant entre les deux (Figure 55). En ce qui concerne l'intestin grêle (Figure 56), les cinétiques de transit de l'azote alimentaire étaient légèrement différentes d'un groupe à l'autre avec un pic à 2 heures dans les groupes AP-14 et AP-50 et à 3 heures dans le groupe HP-50. Et 5 heures après le repas, il restait significativement ( $P < 0,05$ ) plus d'azote alimentaire dans la lumière intestinale des rats du groupe AP-50 ( $0,185 \pm 0,023$  mmol) que dans celui des rats AP-14 ( $0,625 \pm 0,071$  mmol), les résultats des rats du groupe HP-50 étant intermédiaires (Figure 57). Dans le caecum, les quantités d'azote alimentaire retrouvé 5 heures après le repas s'élevaient à  $2,7 \pm 0,2\%$  de l'azote ingéré dans le groupe AP-14,  $2,3 \pm 0,1\%$  de l'azote ingéré dans le groupe AP-50 ( $P < 0,05$  vs AP-14) et



enfin  $2,7 \pm 0,5\%$  de l'azote ingéré dans le groupe HP-50. Au total, 5 heures après le repas expérimental, il restait encore 3,6% ; 9,4% et 4,3% de l'azote ingéré dans l'ensemble du tractus digestif chez les rats des groupes AP-14, AP-50 et HP-50, respectivement.

Le contenu protéique du repas a eu une influence sur le flux horaire d'absorption de l'azote exogène au niveau intestinal (Figure 57). Dans le groupe contrôle (AP-14), le maximum était retardé par rapport à ce qui était observé dans les deux autres groupes (2 heures au lieu de 1 heure). De plus, le niveau d'apport protéique pendant la période d'adaptation a, lui, un effet sur la valeur maximale atteinte par le flux intestinal d'absorption, qui diminue de 52% dans le groupe AP-50 à 42% dans le groupe HP-50.

#### E.2.2.2 Evolution postprandiale des concentrations plasmatiques en acides aminés.

Les variations postprandiales des concentrations plasmatiques d'acides aminés sont présentées sur la figure 58. Très peu de variations étaient observées dans le groupe AP-14, les concentrations plasmatiques d'acides aminés restant très stables sur l'ensemble des 5 heures de l'étude. C'était aussi le cas dans le groupe HP-50, exception faite d'une diminution sensible de la concentration de certains acides aminés à la fin de la période postprandiale (Arg, Pro et Val,  $P < 0,05$ , t vs  $t_0$ ). Dans le groupe AP-50, par contre, les concentrations plasmatiques de certains acides aminés étaient sensiblement affectées par l'ingestion du repas. C'était le cas des acides aminés à chaîne latérale ramifiée dont les teneurs plasmatiques augmentaient jusqu'à un pic à 3-4 heures (Val:  $322,3 \pm 46,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $P < 0,05$  t vs  $t_0$  ; Leu:  $202,9 \pm 34,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $P < 0,05$  t vs  $t_0$ ; Ile:  $109,8 \pm 20,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $P < 0,05$ , t vs  $t_0$ , Val+Leu+Ile:  $618,4 \pm 100,3 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $P < 0,05$ , t vs  $t_0$ ). Ces valeurs étaient aussi significativement supérieures à celles observées dans le groupe AP-14. Parmi les autres acides aminés indispensables, seules la Met et la Thr voyaient leur concentration significativement affectée par le repas, avec un pic vers 2-3 heures après le repas (Met, 2 heures:  $66,6 \pm 8,4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $P < 0,05$ , t vs  $t_0$  et Thr, 2 heures:  $406,6 \pm 34,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ,  $P < 0,05$ , t vs  $t_0$ ). Parmi les acides aminés non indispensables, seule la concentration plasmatique de la Pro variait significativement par rapport à la valeur basale pendant la période postprandiale (pic à 3 heures,  $392,8 \pm 24,0$ ,  $P < 0,05$ , t vs  $t_0$ ).

### E.2.2.3 Enrichissement individuel en $^{15}\text{N}$ des pools plasmatiques d'acides aminés.

La mesure de l'enrichissement individuel en  $^{15}\text{N}$  de chaque acide aminé nous a permis d'évaluer à chaque heure le pourcentage d'acides aminés porteurs d'un azote exogène dans chaque pool plasmatique d'acides aminés (Figures 59, 60 et 61). Quelque soit l'acide aminé considéré et à toute heure de la période postprandiale, le pourcentage d'acides aminés portant un  $^{15}\text{N}$  était statistiquement plus élevé dans le groupe AP-50 que dans le groupe AP-14. Si l'on compare les groupes AP-50 et HP-50, les valeurs obtenues étaient plus rarement statistiquement différentes : Ala à 4 et 5 heures, Gly à 3, 4 et 5 heures, Val à 4 et 5 heures, Leu à 5 heures, Pro à 5 heures, Thr à 5 heures, Ser à 3, 4 et 5 heures, Met à 4 heures, Glx à 4 et 5 heures, Orn à 1, 2, 3 et 4 heures, Lys à 4 et 5 heures, His à 5 heures et enfin Tyr à 4 et 5 heures. Dans tous ces cas, la valeur obtenue dans le groupe AP-50 était supérieure à celle obtenue dans le groupe HP-50. Les pourcentages d'enrichissement du pool plasmatique de l'acide aminé en  $^{15}\text{N}$  étaient généralement plus importants dans le groupe HP-50 que dans le groupe AP-14 sauf à 5 heures pour tous les acides aminés étudiés, à 1 et 3 heures pour Met, à 1, 2, 3, 4 heures pour Orn et enfin à 3 heures pour His.

Le pourcentage maximal d'enrichissement du pool plasmatique de l'acide aminé en  $^{15}\text{N}$  était toujours statistiquement inférieur dans le groupe AP-14 par rapport aux 2 autres groupes. Par contre, si l'on compare les groupes AP-50 et HP-50, les valeurs maximales n'étaient différentes ( $P < 0,05$ ) que pour Ala, Gly, Ile, Asx, Ser, Met et His. Ce pourcentage maximal variait de  $11,9 \pm 4,1$  (Phe) à  $34,3 \pm 1,9$  (Pro) dans le groupe AP-14, de  $27,7 \pm 1,7$  (Gly) à  $56,5 \pm 2,4$  (Pro) dans le groupe AP-50 et de  $19,5 \pm 1,4$  (Gly) à  $58,3 \pm 2,9$  (Pro) dans le groupe HP-50. Les cinétiques d'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des pools plasmatiques d'acides aminés différaient sensiblement d'un groupe à l'autre. En effet, si le pic d'enrichissement était très rapidement atteint dans le groupe HP-50 (à 2 heures, sauf pour Orn (4 heures)), il était beaucoup plus tardivement atteint dans le groupe AP-50 (4 heures). Les résultats du groupe AP-14 étaient intermédiaires (3 heures sauf pour Phe (1 heure)).

Le tableau 37 présente les quantités cumulées d'acides aminés marqués au  $^{15}\text{N}$  ayant traversé le pool plasmatique pendant les 5 heures de l'expérience. Ces quantités variaient de 22,5 à 590,5  $\mu\text{mol.l}^{-1} \times 5\text{h}$  dans le groupe AP-14, de 70,2 à 1055,1  $\mu\text{mol.l}^{-1} \times 5\text{h}$  dans le groupe AP-50 et de 11,5 à 678,4  $\mu\text{mol.l}^{-1} \times 5\text{h}$  dans le groupe HP-50. Pour tous les acides aminés, les données obtenues étaient inférieures dans le groupe AP-14 par rapport aux 2 autres groupes (de 2 (Gly) à 6,2 (Val) fois par rapport aux valeurs du groupe AP-50 et de 0,4 (Met) à 4,9 (Val) fois par rapport aux valeurs du groupe HP-50). Les valeurs obtenues dans

le groupe HP-50 étaient de 1,1 (Leu et Ile) à 8,1 (Met) fois inférieures à celles obtenues dans le groupe AP-50 sauf pour Asx ( $\times 4,1$ ).

### **E.2.3 Oxydations protéique, glucidique et lipidique et thermogénèse postprandiales lors d'une augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire.**

#### *E.2.3.1 Modifications postprandiales des oxydations protéique, glucidique et lipidique.*

L'effet de l'ingestion du repas test sur l'oxydation protéique est décrit sur la figure 62. Le taux d'oxydation protéique augmentait très significativement après l'ingestion du repas contenant 50% de protéines de lait (jusqu'à à peu près 10 fois le niveau de base une heure après le repas, soit 0,90 Watts), alors qu'il variait peu après l'ingestion du repas contrôle (à 14% de protéines de lait), et atteignait un plateau à 0,2 Watts dès une heure après le repas. Au final, l'énergie totale cumulée produite par l'oxydation des protéines du repas était doublée après le repas à 50% de protéines par rapport au repas à 14% de protéines.

Le taux d'oxydation glucidique augmentait significativement plus chez les animaux du groupe AP-14 calo par rapport à ceux du groupe AP-50 calo (Figure 63). Les aires sous la courbe calculées à 420 min étaient de  $18,2 \pm 2,7$  et  $5,3 \pm 2,2$  kJ pour les groupes AP-14 calo et AP-50 calo, respectivement ( $P < 0,001$ ). Ces valeurs représentaient respectivement 50 et 29% de l'énergie apportée par les glucides du repas. La réduction de l'oxydation protéique postprandiale était donc plus importante que ce qui était attendu du fait de l'apport glucidique moindre lors du repas à 50% de protéines.

Les variations de l'oxydation lipidique postprandiale étaient identiques que les animaux ingèrent un repas à 14% ou à 50% de protéines totales de lait, même si une légère tendance à une moindre oxydation lipidique dans le cas du repas hyperprotéique était observée (Figure 63).

L'addition des variations des oxydations glucidique et lipidique montrait finalement diminution très significative ( $P < 0,001$ ) de l'oxydation non protéique chez les animaux du groupe AP-50 calo par rapport à ceux du groupe AP-14 calo (Figure 63).

#### *E.2.3.2 Effet thermique du repas.*

L'effet thermique du repas a été calculé en faisant la somme des oxydations postprandiales des 3 types de macronutriments (Figure 64), et était significativement plus

faible après le repas à 50% de protéines par rapport au repas à 14% de protéines ( $P < 0,001$  pour l'aire sous la courbe calculée entre 0 et 420 minutes), l'augmentation de l'oxydation protéique ne compensant pas la baisse concomitante de l'oxydation des glucides.

En résumé, la teneur élevée en protéines du repas hyperprotéique entraînait une multiplication par 2 de l'oxydation protéique, une augmentation de Gox 3,4 fois moins importante et pas de variation de Lox, l'ensemble se traduisant par un effet thermique du repas hyperprotéique réduit par rapport au repas normoprotéique.

#### **E.2.4 Désamination et production d'urée.**

Le transfert d'azote alimentaire vers les pools d'urée corporelle et urinaire, ainsi que l'oxydation totale des acides aminés alimentaires ont été évalués pendant les 5 heures suivant le repas (Figure 65). Les résultats obtenus différaient très sensiblement d'un groupe à l'autre aussi bien en terme de quantité d'azote alimentaire oxydé qu'en terme de cinétique de transfert. Dans le groupe AP-50, la teneur du pool d'urée corporelle en azote exogène augmentait régulièrement après le repas et atteignait un maximum de  $0,571 \pm 0,108$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup> 5 heures après le repas, alors que dans le groupe HP-50, un pic ( $0,647 \pm 0,125$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup>) était atteint 3 heures après le repas. Les valeurs obtenues dans le groupe AP-14 étaient beaucoup plus faibles et ne dépassaient jamais  $0,073 \pm 0,014$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup>. La quantité d'azote exogène évacué dans l'urée urinaire était très significativement augmentée après les 15 jours d'adaptation au régime HP. Cinq heures après le repas test, cette quantité atteignait  $1,679 \pm 0,266$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup> dans le groupe HP-50, contre  $0,723 \pm 0,121$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup> dans le groupe AP-50 et seulement  $0,089 \pm 0,017$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup> dans le groupe AP-14. Les cinétiques observées étaient elles aussi différentes: un plateau était mis en évidence dans le groupe HP-50 (dès 3 heures après le repas), alors que dans le groupe AP-50, une augmentation continue est observée entre le repas et la fin de la période d'étude.

La désamination totale - calculée comme la somme de la quantité d'azote (total ou alimentaire) retrouvé dans le pool d'urée corporelle et de la quantité cumulée d'azote (total ou alimentaire) transféré vers l'urée urinaire est présentée sur la figure 66. La production d'urée totale sur l'ensemble de l'étude était très significativement stimulée par l'adaptation au régime HP. Ainsi, elle atteignait  $6,02 \pm 0,99$  mmol N.100 g PC<sup>-1</sup> dans le groupe HP-50 contre  $3,36 \pm 0,36$  mmol dans le groupe AP-50 et seulement  $0,77 \pm 0,10$  mmol N.100 g PC<sup>-1</sup> dans le groupe AP-14. L'azote alimentaire représentait une part non négligeable de l'azote total transféré dans les pools d'urée (entre 25 et 40% dans le groupe HP-50 et entre 19 et 42% dans le groupe AP-50), ce qui était moins le cas dans le groupe AP-14 (jamais plus de

23%). Finalement, 5 heures après le repas, la désamination totale, calculée comme la quantité totale d'azote alimentaire transféré dans les pools d'urée corporelle et urinaire, était de  $2,19 \pm 0,48$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup> dans le groupe HP-50 soit 1,7 fois celle du groupe AP-50 ( $1,29 \pm 0,22$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup>,  $P < 0,001$ , AP-50 vs HP-50) et 17 fois celle du groupe AP-14 ( $0,13 \pm 0,03$  mmol.100 g PC<sup>-1</sup>,  $P < 0,0001$  AP-14 vs HP-50).

### **E.2.5 Cinétiques d'incorporation de l'azote alimentaire dans les tissus. Répartition de l'azote alimentaire dans les différents pools azotés de l'organisme 5 heures après le repas.**

La figure 67 présente les cinétiques d'incorporation de l'azote exogène dans les fractions protéique (P) et non protéique (NP, acides aminés et peptides libres) des différents tissus prélevés pendant les 5 heures qui suivent le repas test. Le tableau 38 donne, 5 heures après le repas, la répartition de l'azote exogène dans les différents pools azotés (organes, tissus, fluides corporels et contenus luminaux) de l'organisme.

#### *E.2.5.1 Muqueuses de l'intestin grêle.*

Pendant toute la période postprandiale, la quantité d'azote exogène incorporé dans les fractions azotées protéique et non protéique de la muqueuse de l'intestin grêle était supérieure dans les groupes AP-50 et HP-50 par rapport au groupe AP-14 ( $P < 0,05$ ). Par contre, à part à 1 et 5 heures dans la fraction NP, les résultats concernant les groupes AP-50 et HP-50 n'étaient pas différents. Les quantités d'azote alimentaire incorporé étaient, pour tous les groupes, beaucoup plus importantes dans la fraction P que dans la fraction NP. Les cinétiques observées étaient elles aussi très différentes entre les 2 fractions. Ainsi, si l'on observait une augmentation croissante des quantités d'azote alimentaire incorporé dans les protéines de la muqueuse intestinale, cela n'était pas le cas en ce qui concerne la fraction NP, pour laquelle on observait tout d'abord une augmentation (jusque vers 3-4 heures) et ensuite une diminution. Cinq heures après le repas, on retrouvait  $57 \pm 4$ ,  $104 \pm 11$  et  $93 \pm 8$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$  dans la fraction P et  $4 \pm 1$ ,  $17 \pm 2$  et  $11 \pm 2$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$  dans la fraction NP de la muqueuse intestinale des rats des groupes AP-14, AP-50 et HP-50, respectivement.

Les données obtenues nous ont permis de calculer le taux de synthèse protéique (ou FSR, Fractional Synthesis Rate), exprimé en  $\% \cdot \text{j}^{-1}$  pour la muqueuse intestinale de l'intestin proximal, médian ou distal et du côlon, en considérant qu'en situation postprandiale les acides aminés de la lumière intestinale étaient les précurseurs majoritaires de la synthèse

protéique dans la muqueuse intestinale (Stoll *et al.*, 1999a) (Tableau 39). Les résultats obtenus une heure après le repas démontraient que le niveau d'apport protéique pendant la période d'adaptation n'avait pas d'effet sur le taux de synthèse protéique (pas de différence significative entre les groupes AP-50 et HP-50). Nous avons aussi observé une diminution de ce taux de synthèse le long de l'intestin, avec des valeurs maximales au niveau proximal (66 et 59%/jour, groupes AP-50 et HP-50, respectivement) et minimales au niveau du côlon (16 et 13%/jour, groupes AP-50 et HP-50, respectivement).

#### *E.2.5.2 Protéines plasmatiques et foie.*

Les quantités d'azote exogène incorporé dans les protéines plasmatiques étaient toujours plus importantes chez les animaux des groupes AP-50 et HP-50 que chez ceux du groupe AP-14 ( $P < 0,05$ ). Les résultats concernant les groupes AP-50 et HP-50 n'étaient statistiquement différents que 5 heures après le repas, avec 2 fois plus d'azote alimentaire incorporé dans les protéines plasmatiques chez les rats AP-50 que chez les rats HP-50 ( $201 \pm 14$  vs  $99 \pm 8$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ , respectivement,  $P < 0,05$ ). Une augmentation brutale de l'incorporation de l'azote exogène dans les protéines plasmatiques du groupe AP-50 était en effet observée entre la 4<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> heure de la période postprandiale.

Dans le foie, aussi bien dans la fraction azotée protéique que dans la fraction azotée non protéique, il y avait significativement plus d'azote alimentaire incorporé chez les rats du groupe AP-50 par rapport aux rats contrôle entre 3 et 5 heures après le repas. En ce qui concerne les rats HP-50, le même résultat était observé mais à toute heure de la période postprandiale. Les quantités d'azote exogène retrouvées dans les fractions P et NP du foie étaient significativement plus élevées 1, 2 et 3 heures (P) et 1, 2, 3 et 4 heures (NP) chez les rats HP-50 que chez les rats AP-50. Cinq heures après le repas, on retrouvait 2 fois plus d'azote alimentaire dans les protéines hépatiques des rats des groupes AP-50 et HP-50 ( $199 \pm 23$  et  $193 \pm 22$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ , respectivement) que dans celles des rats du groupe AP-14 ( $91 \pm 8$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ,  $P < 0,05$ ). En ce qui concerne la fraction non protéique, ce chiffre était de 3 à 4 (AP-14:  $9 \pm 2$ ; AP-50:  $27 \pm 5$  et HP-50 :  $36 \pm 5$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ).

#### *E.2.5.3 Rein.*

La quantité d'azote alimentaire incorporé dans les protéines de rein était très significativement augmentée après les 15 jours de régime hyperprotéique, jusqu'à 5 fois plus ( $30 \pm 6$  vs  $5 \pm 1$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ , rats HP-50 et AP-50 respectivement) 5 heures après le

repas. En ce qui concerne la fraction azotée protéique, il n'y avait jamais de différence dans les quantités d'azote alimentaire incorporé entre les groupes AP-14 et AP-50.

Les cinétiques d'incorporation observées étaient différentes entre les groupes. Ainsi, si un plateau était atteint dès 3 heures dans les groupes AP-14 et AP-50, ce n'était pas le cas dans le groupe HP-50, pour lequel une augmentation constante était observée pendant toute la durée de l'expérience.

Durant les 3 premières heures suivant le repas test, significativement plus d'azote alimentaire était retrouvé dans le pool NP du rein chez les rats HP-50, par rapport aux rats AP-14 et AP-50. Après 3 heures, il y avait plus d'azote exogène dans le pool NP des rats des groupes AP-50 et HP-50 que dans celui des rats du groupe AP-14. Enfin, à 5 heures, la seule différence significative concernait les groupes AP-14 et AP-50 ( $6 \pm 1$  et  $15 \pm 3$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ , respectivement), les animaux du groupe HP-50 atteignant une valeur intermédiaire ( $11 \pm 1$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ ).

Les cinétiques d'incorporation différaient entre les groupes, avec un pic observé à 3 heures dans le groupe HP-50, et une augmentation continue pour les groupes AP-14 et AP-50.

#### *E.2.5.4 Muscles squelettiques.*

Une quantité plus importante d'azote exogène était incorporée dans les protéines des muscles chez les animaux des groupes AP-14 et AP-50, en comparaison avec les résultats du groupe HP-50. Toutefois, la grande variabilité des résultats, surtout dans le groupe AP-50, n'a pas permis d'obtenir de différences significatives entre les groupes. Cinq heures après le repas, les quantités d'azote alimentaire incorporé dans les protéines musculaires étaient de  $618 \pm 317$  ;  $910 \pm 191$  et  $577 \pm 61$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$  dans les groupes AP-14, AP-50 et HP-50, respectivement.

De plus, un plateau était mis en évidence dès 1 heure dans le groupe AP-14 et vers 4 heures dans le groupe AP-50, alors que dans le groupe HP-50, l'apparition d'un plateau était moins nette.

Dans le pool azoté non protéique par contre, significativement plus d'azote alimentaire était retrouvé chez les animaux du groupe HP-50 que chez ceux des groupes AP-14 et AP-50 ( $P < 0,05$  HP-50 vs AP-14 et AP-50, sauf à 3 heures et à 5 heures  $P < 0,05$ , HP-50 vs AP-14 uniquement).

Alors qu'une augmentation de la quantité d'azote alimentaire incorporé dans le pool musculaire NP était observée dans les groupes AP-14 et AP-50 tout au long de la période d'étude, un pic était mis en évidence entre 3 et 4 heures chez les animaux du groupe HP-50.

Finalement, à 5 heures, les pools musculaires NP des rats des groupes AP-14, AP-50 et HP-50 contenaient  $122 \pm 13$ ,  $233 \pm 39$  et  $324 \pm 48$   $\mu\text{mol N}_{\text{exo}} \cdot 100 \text{ g PC}^{-1}$ , respectivement.

### **E.2.6 Extrapolation à l'ingéré journalier.**

Les résultats concernant la répartition postprandiale de l'azote exogène ingéré pendant le repas test ont été extrapolés à l'ingéré azoté journalier total, de façon à déterminer le devenir de l'azote alimentaire entre les différents pools azotés corporels sur 24h. Pour ce faire, nous avons considéré que le repas test était représentatif de l'ensemble des repas ingérés par le rat sur la journée, qu'il soit soumis à un régime normoprotéique (14% de protéines – 3,4 g de protéines ingérées quotidiennement, en moyenne) ou à un régime hyperprotéique (50% de protéines – 10,9 g de protéines ingérées quotidiennement, en moyenne). L'apport protéique est donc multiplié par 3,2 entre les 2 régimes. Les calculs ont été réalisés pour un rat pesant 300 g. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 68.

Le résultat le plus spectaculaire concernait le transfert de l'azote alimentaire vers l'urée, qui est multiplié par 11,9 chez les animaux en régime hyperprotéique. Un autre résultat à noter concernait la quantité d'azote alimentaire qui n'est pas absorbé, celle-ci étant multiplié par 4,6. Dans les organes de la zone splanchnique (intestin grêle et foie), la quantité d'azote alimentaire incorporé était multipliée par 2 en moyenne lorsque l'on comparait le groupe des animaux soumis au régime hyperprotéique à ceux soumis au régime normoprotéique. Il en était à peu près de même dans le côlon. En ce qui concerne les reins, un facteur 3,7 était trouvé entre les 2 groupes. Enfin, en ce qui concerne les muscles, que l'animal ingère 3,4 ou 10,9 g de protéines par jour, la même quantité d'azote alimentaire était incorporée dans les muscles.

### **E.3 EFFET DU NIVEAU HABITUEL D'APPORT PROTEIQUE (NORMO OU HYPERPROTEIQUE) ET DE LA SOURCE PROTEIQUE DU REPAS (LAIT OU SOJA) SUR L'UTILISATION POSTPRANDIALE DE L'AZOTE ET DES ACIDES AMINES ALIMENTAIRES CHEZ L'HOMME.**

Le suivi du régime par les volontaires a été évalué a posteriori par l'analyse des carnets alimentaires. Les régimes étaient basés sur l'utilisation d'aliments courants et les sujets suivaient un schéma normal d'alimentation (3 repas par jour et un minimum de prises alimentaires hors repas). Le dépouillement des carnets alimentaires montre que les 2 régimes ont été correctement suivis. Le régime NP apportait  $2084 \pm 240 \text{ kcal} \cdot \text{j}^{-1}$  (glucides :



54,3% - lipides : 33,3% - protéines : 12,4%) et le régime HP  $2094 \pm 239$  kcal.j<sup>-1</sup> (glucides : 54,3% - lipides : 21,4% - protéines : 24,3%).

### **E.3.1 Paramètres biochimiques mesurés à jeun.**

Le tableau 40 présente les valeurs obtenues pour un certain nombre de paramètres biochimiques mesurés chez les volontaires à l'état post-absorptif.

Le poids des sujets n'était pas modifié entre les 2 périodes d'adaptation, indiquant un niveau d'apport suffisant par rapport aux besoins.

Plusieurs paramètres mesurés à l'état post-absorptif étaient modifiés par l'adaptation au régime HP. Ainsi, après le régime HP, l'urémie plasmatique était très significativement augmentée, passant de  $4,4 \pm 0,2$  à  $6,2 \pm 0,2$  mmol.l<sup>-1</sup> après les régimes NP et HP, respectivement ( $P < 5.10^{-13}$ ), l'ammoniémie n'étant par contre pas significativement modifiée. La concentration plasmatique en protéines était augmentée après adaptation au régime HP, passant de  $779 \pm 17$  à  $818 \pm 13$  mmol N.l<sup>-1</sup> ( $P < 0,02$ ).

Une augmentation de la concentration basale en IGF-I était observée (+ 8%,  $P < 0,02$ ), sans toutefois que ce résultat ne soit significatif. Les autres facteurs hormonaux mesurés n'étaient pas modifiés par le niveau protéique d'adaptation, même si une tendance à une augmentation de la glucagonémie ( $P = 0,06$ ) a pu être notée après la semaine de régime HP.

La teneur totale sérique en AA indispensables était elle aussi sensible à la teneur en protéines du régime, avec une augmentation, mais non significative, (+ 8,6%,  $P < 0,07$ ) entre le régime NP et le régime HP, due principalement, à l'augmentation significative de la concentration sérique totale en AA à chaîne latérale ramifiée (+ 15,6%,  $P < 0,01$ ). La teneur sérique en AA non indispensables était diminuée de 13,1% ( $P < 0,01$ ) tout comme celle en AA néoglucogéniques (-13,6%). Les AA les plus sensibles aux variations du niveau habituel d'apport étaient Glx (-17,2% ;  $P < 0,05$ ), Gly (-17,8% ;  $P < 0,0002$ ), Ala (-15,8% ;  $P < 0,002$ ), Ile (+20%,  $P < 0,02$ ), Val (+18,9% ;  $P < 0,02$ ), Phe (-10,9% ;  $P < 0,05$ ), Lys (+12,8% ;  $P < 0,02$ ) et Cit (-24,2% ;  $P < 0,002$ ).

### **E.3.2 Evolution postprandiale des concentrations plasmatiques en glucose, insuline et glucagon et en acides aminés.**

#### *E.3.2.1 Glucose, insuline et glucagon.*

L'évolution postprandiale des teneurs plasmatiques en glucose, insuline et glucagon a été enregistrée sur les 8 heures suivant l'ingestion du repas test (Figure 69). L'aire sous

chaque courbe a aussi été calculée entre 0 et 8 heures. Il n'y avait pas de différence significative entre les profils obtenus après le régime NP et ceux obtenus après le régime HP, quel que soit le paramètre considéré et quelle que soit la protéine ingérée. Ainsi, dans tous les cas, la glycémie augmentait très rapidement après ingestion du repas, avec un pic entre 30 minutes et 1 heure chez les sujets Lait et proche de 1 heure chez les sujets Soja, pour diminuer ensuite jusqu'à retourner à une valeur basale 4 heures après le repas. De même, l'insulinémie augmentait rapidement, avec un maximum entre 30 minutes et 1 heure chez les sujets Lait et aux alentours de 1 heure chez les sujets Soja, puis une diminution jusqu'à la valeur basale après 5 heures. La concentration plasmatique en glucagon, était, dans tous les cas, très peu sensible à l'ingestion du repas test. Aucun effet statistique (Protéine ou Régime) n'a pu être mis en évidence sur les aires sous la courbe calculées entre 0 et 8 heures.

#### *E.3.2.2 Acides aminés.*

Les concentrations des acides aminés sériques ont été mesurées pendant les 8 heures de la phase postprandiale (Figure 70). Dans le groupe Lait, le niveau d'apport en protéines avait peu de conséquences sur les variations postprandiales des concentrations en acides aminés. Les seules différences significatives observées ( $P < 0,05$ , NP vs HP) l'étaient pour la Val et la Lys 1 et 2 heures après le repas. Dans le groupe Soja, les profils obtenus étaient aussi très proches sauf pour la Cit ( $P < 0,05$  NP vs HP de 0 à 8 heures) et la Met ( $P < 0,05$ , NP vs HP à 1, 3, 4, 5, 6 et 8 heures). Une différence significative était aussi observée à 6 et 7 heures pour Glx. De plus, dans le groupe Soja, nous observions une augmentation plus rapide et marquée des teneurs plasmatiques en certains AA par rapport à ce qui était observé pour le groupe Lait. Cette différence était accrue par l'adaptation au régime HP. Les effets statistiques Protéine, Régime et Protéine×Régime ont été testés sur les Aires sous la courbe calculées pour chaque AA entre 0 et 8 heures (Tableau 41). Un effet Protéine significatif était obtenu pour la Val, la Met, la Leu, l'Orn, la Lys, les AA à chaîne latérale ramifiée (Leu + Ile + Val) et les AA néoglucogéniques (Ala + Ser + Gly + Gln + Thr). Un effet Régime significatif était noté pour la Thr et la Cit seulement.

#### **E.3.3 Désamination.**

La figure 71 présente pour chacun des groupes les quantités d'azote alimentaire transitant via le pool d'urée corporelle et excrété dans l'urée urinaire ainsi que la désamination totale (urée corporelle + urée urinaire) après ingestion du repas test. La

production d'urée totale, avec ses composantes exogène et endogène sont présentées sur la figure 72.

Dans le groupe Lait, un effet significatif de l'adaptation au régime HP sur les quantités d'azote alimentaire excrété via l'urée urinaire n'était visible que 8 heures après le repas ( $7,56 \pm 0,49$  et  $9,33 \pm 0,71\%$  de l'azote ingéré,  $P < 0,05$ ). Par rapport au groupe NP, l'adaptation au régime HP augmentait significativement les quantités d'azote alimentaire présent dans le pool d'urée corporelle 2, 7 et 8 heures après le repas test ( $P < 0,05$ ) avec un maximum 7 heures après le repas test ( $16,6 \pm 2,0$  et  $14,3 \pm 1,9\%$  de l'azote ingéré, HP et NP, respectivement,  $P < 0,05$ ). Un effet du régime sur la désamination totale était observé 6 et 8 heures après le repas test. Enfin, 8 heures après le repas test, les quantités totales d'azote alimentaire rentrant dans les pertes oxydatives atteignaient  $21,3 \pm 0,6$  et  $14,3 \pm 1,9\%$  de l'azote ingéré, après les régimes HP et NP, respectivement ( $P < 0,05$ ).

Dans le groupe Soja, l'effet de l'adaptation au régime HP sur les phénomènes de désamination était plus sensible. En effet, à toute heure de la période expérimentale, les quantités d'azote alimentaire présent dans le pool d'urée corporelle étaient significativement plus importantes chez les volontaires HP que chez les volontaires NP ( $P < 0,05$ ). De même, la désamination totale de l'azote alimentaire était significativement augmentée après le régime HP et ce à toute heure de la période postprandiale et atteignait  $19,0 \pm 1,2\%$  et  $29,0 \pm 2,1\%$  de l'azote ingéré chez les volontaires NP et HP, respectivement ( $P < 0,0005$ ), 8 heures après le repas test. Les quantités d'azote alimentaire excrété via l'urée urinaire étaient significativement plus importantes dans le groupe HP à partir de la 4<sup>ème</sup> heure après le repas.

Il existe un effet statistique "Régime" très sensible sur les 3 paramètres étudiés, qu'il soit évalué 2 ou 8 heures après le repas test, les pertes d'azote alimentaire dans le pool d'urée totale sont très sensiblement stimulées par l'adaptation au régime HP. L'effet "Protéine" est significatif 2 heures après le repas, quel que soit le paramètre étudié, les protéines de soja étant plus oxydées que celles de lait 2 heures après le repas. Par contre, 8 heures après le repas, il ne reste significatif qu'en ce qui concerne l'urée urinaire. Il n'y a jamais d'interaction "Protéine\*Régime" significative.

Les valeurs d'UPPN (Utilisation Postprandiale Nette) calculées montraient une influence significative du niveau d'apport protéique du régime et passaient de  $74,4 \pm 0,8\%$  après la période NP à  $69,7 \pm 1,1\%$  après la période HP dans le groupe Lait et de  $69,8 \pm 1,6\%$  après la période NP à  $59,4 \pm 2,5\%$  après la période HP dans le groupe Soja (effet régime  $P < 0,0001$ ). De plus, quel que soit le niveau d'apport protéique pendant la période d'adaptation, les valeurs d'UPPN était significativement plus élevées pour les protéines de lait que pour les protéines de soja (effet protéine  $P < 0,0001$ ).

Enfin, nous avons pu déduire la production d'urée totale et ses composantes exogène et endogène (par différence entre la production totale d'urée et la production d'urée à partir de l'azote alimentaire, figure 72). La production d'urée totale, exogène ou endogène sur les 8 premières heures postprandiales était significativement augmentée après adaptation au régime HP (Effet "Régime"  $P < 0,001$ ), et ce, plus sensiblement après le repas Soja. Ainsi, après l'adaptation au régime HP, la production d'urée totale était augmentée de 22 et 40% dans les groupes Lait et Soja respectivement; la production d'urée à partir d'azote exogène était augmentée de 15 et 48% dans les groupes Lait et Soja, respectivement et la production d'urée à partir d'azote endogène était augmentée de 25 et 46% dans les groupes Lait et Soja, respectivement. Il n'y avait pas d'effet "Protéine" notable sur la production d'urée totale ou endogène sur l'ensemble de la période postprandiale. Par contre, la production postprandiale d'urée d'origine exogène était significativement plus importante après le repas contenant des protéines de soja qu'après celui contenant des protéines de lait. La proportion d'urée produite à partir d'azote exogène par rapport au total était constante et atteignait  $26 \pm 1\%$  et  $26 \pm 2\%$  dans les groupes NP et HP respectivement après le repas Lait et  $30 \pm 2\%$  et  $26 \pm 2\%$  dans les groupes NP et HP respectivement après le repas Soja.

#### **E.3.4 Incorporation de l'azote alimentaire dans les protéines plasmatiques.**

Nous avons évalué l'incorporation de l'azote exogène dans le pool des protéines plasmatiques (Figure 73).

La quantité moyenne d'azote total présent dans le pool entier des protéines plasmatiques calculée sur l'ensemble de la période postprandiale était légèrement supérieure après le régime HP ( $2,41 \pm 0,03$  et  $2,33 \pm 0,02$  mol après les périodes HP et NP, respectivement,  $P=0,06$  dans le groupe LAIT et  $2,10 \pm 0,02$  et  $2,17 \pm 0,05$  mol après les périodes HP et NP, respectivement,  $P=0,13$  dans le groupe Soja), ce qui équivaut à des concentrations en protéines plasmatiques de  $65,3 \pm 2,0$  g.l<sup>-1</sup> et  $62,8 \pm 1,6$  g.l<sup>-1</sup>, respectivement dans le groupe Lait et  $65,3 \pm 1,3$  g.l<sup>-1</sup> et  $63,3 \pm 0,8$  g.l<sup>-1</sup>, respectivement dans le groupe Soja ( $N \times 6,25$ ). Le niveau d'ingestion protéique n'avait pas d'influence sur la quantité d'azote alimentaire incorporé dans le pool des protéines plasmatiques et atteignait  $7,2 \pm 1,6\%$  et  $7,0 \pm 1,3\%$  de l'azote ingéré 8 heures après le repas Lait (NP et HP respectivement) et  $6,7 \pm 0,5\%$  et  $7,7 \pm 0,5\%$  de l'azote ingéré 8 heures après le repas Soja (NP et HP respectivement). Aucun effet statistique significatif de la protéine ingérée n'a plus été détecté.

## **F DISCUSSION**

Le but de ce travail était de caractériser les moyens que l'organisme met en œuvre dans le but de s'adapter aux variations quantitatives et qualitatives de l'apport protéique alimentaire à court et à moyen terme assurant ainsi l'homéostasie corporelle. Ce processus complexe, visant à permettre la mise en place d'un "état fonctionnel mieux adapté à la nouvelle situation, même si cette adaptation a un coût métabolique" (Waterlow, 1985), met en jeu une régulation à court et à long terme des voies cataboliques et anaboliques du métabolisme protéique corporel.

L'apport alimentaire est habituellement discontinu (repas) et les caractéristiques nutritionnelles de chaque repas sont elles aussi variables. L'organisme doit donc être capable de répondre de façon adéquate aux transitions état de jeûne / état nourri et aux variations quantitatives et qualitatives de l'apport protéique au sein de chaque repas. Une adaptation à plus long terme se met aussi en place. La zone splanchnique, et tout particulièrement ses capacités d'oxydation, jouent un rôle majeur. Les phénomènes digestifs, la régulation de la prise alimentaire, les variations du turn-over protéique des différents organes et au niveau du corps entier, à la fois en période postprandiale et en période post-absorptive sont aussi impliqués. Des processus coopératifs se mettent aussi en place entre les différents tissus afin de mieux gérer les variations de l'apport. Dans ce contexte, le métabolisme azoté postprandial est de première importance, car c'est lui qui détermine le niveau d'utilisation de la protéine alimentaire (Millward, 1996).

Nous avons donc voulu caractériser les effets d'une variation quantitative (régime normoprotéique vs. régime hyperprotéique) et qualitative (protéines de lait vs. protéines de soja) sur plusieurs paramètres du métabolisme protéique postprandial. Tout d'abord, l'ETUDE 1 visait à étudier l'influence de la source protéique sur les digestibilités de l'azote alimentaire et des AA individuels, chez le rat et chez l'homme. La digestibilité est en effet une caractéristique essentielle de la protéine ingérée, car elle détermine son niveau d'absorption et donc les quantités d'azote et d'AA alimentaires qui pourront être utilisés ensuite par l'organisme. Nous avons également travaillé sur les effets d'une élévation aiguë (chez le rat) puis chronique (chez le rat et chez l'homme) de l'apport protéique (ETUDE 2 et ETUDE 3) afin de comprendre comment la modulation de l'utilisation postprandiale de l'azote alimentaire est une étape critique de l'adaptation. De plus, chez l'homme, nous avons complété ces données par l'utilisation de 2 protéines test (lait et soja) afin de voir (1) comment deux protéines d'origine différente étaient utilisées par l'organisme en phase postprandiale et (2) comment niveau d'apport et source protéique pouvaient interagir quant au devenir de la

protéine alimentaire. Plusieurs étapes apparaissent en fait critiques quant à l'adaptation de l'organisme à une élévation de l'apport protéique alimentaire.

### **F.1 PHENOMENES DE DESAMINATION ET DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE SPLANCHNIQUES.**

La principale réponse de l'organisme à une augmentation de l'apport protéique alimentaire est la stimulation des voies de dégradation des AA alimentaires avec une augmentation marquée de la production d'urée totale et de la désamination des AA exogènes, que ce soit lors de la première ingestion d'un régime hyperprotéique ou après une période d'adaptation, et dans ce cas, la stimulation est encore plus nette. Ce phénomène implique principalement la zone splanchnique, et en premier lieu, le foie, site majeur de la désamination de la plupart des AA. Cet organe est très fortement impliqué dans la régulation du devenir postprandial des AA alimentaires, c'est lui qui module l'influx d'AA depuis l'intestin grêle et contrôle leur passage vers la périphérie.

C'est ainsi que nous avons observé une augmentation nette de l'urémie basale chez les rats ayant consommé pendant 15 jours un régime hyperprotéique par rapport à ceux ayant ingéré un régime normoprotéique sur la même période. Elle était aussi augmentée de plus de 35% chez l'homme après une semaine de régime hyperprotéique. De même, une proportion très importante des AA alimentaires était dirigée vers le catabolisme, ceci étant encore plus marqué après adaptation au régime hyperprotéique. Ainsi, si lors du premier repas hyperprotéique, 23% de l'azote ingéré était oxydé – contre 8% seulement chez les animaux du groupe AP-14 – cette valeur atteignait  $\approx$  40% chez les animaux adaptés au régime hyperprotéique. Chez les volontaires sains ingérant le repas test à base de protéines de lait, ces valeurs étaient de 14 et 21% après les régimes NP et HP respectivement, 19 et 29% dans le cas du repas test à base de protéines de soja. La part de l'azote alimentaire dans l'azote excrété sous forme d'urée représentait 23% chez les animaux du groupe AP-14 (repas test normoprotéique),  $\approx$  40% chez les animaux des groupes AP-50 et HP-50 (repas test hyperprotéique dans les 2 cas) et 26 à 30% chez les volontaires ayant ingéré un régime NP ou HP pendant une semaine (repas test identique dans les 2 situations). Il y a donc plus un effet de la teneur en protéines du repas qu'un effet du niveau usuel de consommation protéique sur la proportion que représente l'azote alimentaire dans l'azote total excrété. Ces résultats concernant la stimulation de la production et de l'excrétion d'urée lorsque l'apport protéique alimentaire augmente sont cohérents avec de nombreuses publications (dont

Young *et al.*, 2000). Nos résultats montrent en plus que l'azote alimentaire est très significativement impliqué dans ce processus.

Ces données traduisent en fait la stimulation des enzymes hépatiques de dégradation des AA, qui sont activées dès le premier repas HP, mais plusieurs jours sont souvent nécessaires à l'optimisation de leurs activités. Anderson *et al.* (1968) ont ainsi démontré que ce délai était d'au moins 3 jours pour la sérine déshydratase. D'autres enzymes, comme la glutaminase par exemple, répondent beaucoup plus rapidement voire même dans les 2 heures qui suivent l'augmentation de l'influx d'AA (Ewart & Brosnan, 1993). Nos résultats confirment les données de la littérature, qui montrent aussi une stimulation des activités de l'alanine et l'aspartate aminotransférases (Colombo *et al.*, 1992 ; Jean *et al.*, 2001 ; Rémésy *et al.*, 1988). Un certain nombre de peptidases intestinales sont aussi activées tout comme l'expression de certains transporteurs membranaires hépatiques (Jean *et al.*, 2001). Le rôle de l'intestin est d'ailleurs très certainement essentiel dans la gestion de l'influx de certains AA (Glu, Gln et Asp) connaissant l'importance des quantités de ces AA utilisés par les cellules de la muqueuse intestinale (Reeds *et al.*, 1996 ; Windmueller & Spaeth, 1975).

Si comme nous venons de le souligner, la désamination et la dégradation splanchniques des AA sont très sensibles au niveau d'apport protéique, cela n'est pas le cas des synthèses protéiques splanchniques, soulignant encore une fois l'importance du catabolisme par rapport à l'anabolisme, en phase postprandiale, pour la gestion d'une élévation aiguë ou chronique de l'apport protéique alimentaire.

Ainsi, si les quantités d'azote alimentaire incorporé dans les synthèses protéiques de la muqueuse intestinale étaient significativement augmentées par la consommation d'un repas hyperprotéique par rapport à l'ingestion d'un repas normoprotéique, il n'y avait par contre pas d'effet de l'adaptation au régime hyperprotéique, les résultats des groupe AP-50 et HP-50 n'étant jamais différents. De plus, nous avons pu calculer les FSR des protéines de la muqueuse intestinale en faisant l'hypothèse que les AA de la lumière intestinale sont les précurseurs directs de la synthèse. En effet, au niveau de la muqueuse intestinale, les AA utilisés pour la synthèse protéique peuvent avoir 2 origines, luminale ou basolatérale. Plusieurs études (Bouteloup-Demange *et al.*, 1998 ; Stoll *et al.*, 1997) qui comparaient les enrichissements des protéines de la muqueuse intestinale obtenus après une perfusion intragastrique ou intraveineuse de traceur, ont montré que celui-ci était plus élevé dans le cas d'une perfusion intragastrique et ont donc conclu que la contribution des AA luminaux était la plus forte. Les résultats que nous obtenons ne sont pas statistiquement différents,

que les rats aient ingéré le repas hyperprotéique pour la première fois ou après 15 jours d'adaptation, et ce, quel que soit le segment intestinal considéré. Ces résultats sont conformes avec les données de la littérature (Bouteloup-Demange *et al.*, 1998 ; Masanès *et al.*, 1999 ; Nakshabendi *et al.*, 1995 ; O'Keefe *et al.*, 1994) et soulignent le fait que la synthèse protéique des muqueuses intestinales n'est pas sensible au niveau d'apport protéique alimentaire habituel. Les niveaux d'incorporation d'azote alimentaire dans les protéines de la muqueuse que nous trouvons sont concordants avec ceux de Stoll *et al.* (1999a) qui ont montré, dans une étude utilisant une perfusion de traceur  $^{13}\text{C}$  combinée à une technique de cathétérisation artério-veineuse, que 2% de la Phe alimentaire était incorporé dans les protéines de la muqueuse intestinale. Dans une autre étude, cette valeur atteignait 6 à 7% pour la Lys, la Thr et la Leu (Stoll *et al.*, 1998). Enfin, il y a plus d'azote alimentaire incorporé au niveau proximal (FSR plus élevé), ce qui confirme les résultats de Metges *et al.* (1999a) qui montraient que, respectivement 40 et 3% de la Leu  $^{13}\text{C}$  était incorporée dans les muqueuses de l'intestin grêle proximal et distal, 5 heures après un repas unique à 14% de protéines.

De même, les quantités d'azote exogène incorporé dans les protéines hépatiques constitutives étaient significativement plus importantes chez les rats des groupes AP-50 et HP-50, que chez les animaux du groupe AP-14. Ces valeurs sont tout à fait concordantes avec celles calculées à partir des résultats de Stoll *et al.* (1998) chez le porcelet (5% pour la Thr, 8% pour la Lys, la Leu et la Phe). Par contre, il ne semblait pas y avoir d'effet majeur de l'adaptation au régime hyperprotéique sur les quantités d'azote alimentaire incorporé, les valeurs obtenues dans les groupes AP-50 et HP-50 étant égales 5 heures après le repas. Toutefois, les cinétiques d'incorporation étaient différentes, et sur les 3 premières heures de la période postprandiale, il y avait significativement plus d'azote alimentaire incorporé dans les protéines hépatiques chez les rats du groupe HP-50 que chez ceux du groupe AP-50, comme si les systèmes de synthèse étaient "prêts" à réagir à l'apport d'azote exogène du fait de l'adaptation préalable. Ceci peut être la conséquence à la fois d'une stimulation des taux de synthèse (Eisenstein & Harper, 1991 ; Hayase *et al.*, 1998) et d'une disponibilité accrue en azote alimentaire, comme indiqué par des quantités d'azote exogène non protéique plus importantes chez les rats du groupe HP-50 que chez les autres.

Les protéines hépatiques exportées (i.e. plasmatiques) incorporaient une fraction non négligeable de l'azote alimentaire (de 2 à 7% de l'azote ingéré, en fonction du modèle considéré et des conditions nutritionnelles). Chez le rat, l'incorporation d'azote alimentaire



dans le pool des protéines plasmatiques était plus importante après l'ingestion du repas hyperprotéique qu'après l'ingestion du repas normoprotéique, que les animaux soient adaptés à un niveau d'apport élevé ou non. Les résultats obtenus n'étaient pas différents entre les groupes AP-50 et HP-50 sauf à 5 heures, où il y avait 2 fois plus d'azote exogène incorporé pour les rats du groupe AP-50 par rapport à ceux du groupe HP-50. Ce résultat suprenant pourrait s'interpréter comme la mise en évidence d'un rôle de "tampon" pour ce pool azoté lors d'une augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire, fournissant ainsi une alternative d'utilisation de l'azote exogène lorsque les capacités d'oxydation du foie sont dépassées. Notre hypothèse est en accord avec celle de De Feo *et al.* (1992) qui montraient une stimulation de la synthèse d'albumine lors de l'ingestion d'un repas contenant AA et glucose, indiquant que ce phénomène pourrait en fait permettre de "mettre de côté" une partie des AA apportés en surplus par le repas, et évitant ainsi leur oxydation irréversible. Les protéines plasmatiques pourraient servir de moyen de transport de ce surplus d'AA vers les organes périphériques. Toutefois, les résultats obtenus chez l'homme diffèrent de ceux obtenus chez le rat. En effet, dans notre expérience chez l'homme, nous avons mis en évidence un effet du niveau d'apport protéique usuel sur la concentration plasmatique basale en protéines, qui était augmentée après une semaine de régime HP (comme chez 25% des sujets de l'étude de Fagan & Oexmann, 1987), ce qui n'était pas le cas dans notre étude chez le rat (résultats confirmés par une autre étude réalisée dans le laboratoire (Lacroix, 2001a)). Par contre, chez l'homme, l'adaptation préalable à un régime NP ou HP n'avait pas d'effet sur l'incorporation postprandiale d'azote exogène dans les protéines plasmatiques contrairement à ce que nous observions chez le rat. Ces derniers résultats concordent avec le fait que la captation splanchnique de Leu ou de Lys reste très stable, quel que soit le niveau d'apport habituel en protéines (Hoerr *et al.*, 1993), même pour des niveaux d'apport très faibles (Cortiella *et al.*, 1988). De plus, Masanès *et al.* (1999) ont démontré que le FSR de l'albumine (qui représente une part importante des protéines plasmatiques) n'était pas sensible au niveau d'apport protéique. L'ensemble des résultats obtenus suggère donc que l'incorporation d'azote alimentaire dans ce pool protéique est beaucoup plus sensible aux variations aiguës de l'apport protéique qu'aux variations à long terme. Des études complémentaires seraient nécessaires pour (1) expliquer les différences obtenues entre les 2 modèles et (2) préciser dans quelle mesure ce pool constitue vraiment une voie d'épargne de l'azote alimentaire.

## F.2 METABOLISME INTERMEDIAIRE ET METABOLISME PROTEIQUE PERIPHERIQUE.

Les phénomènes observés au niveau splanchnique contrôlent la biodisponibilité de l'azote et des AA alimentaires pour le reste de l'organisme, la zone périphérique étant en fait moins impliquée dans la gestion des variations de l'apport protéique alimentaire. Comme nous l'avons décrit plus haut, en régime HP, la dégradation des AA est très nettement augmentée. Les enzymes du métabolisme intermédiaire assurant la dégradation des squelettes carbonés issus de l'oxydation des AA sont aussi stimulées (Garlick *et al.*, 1999). Ces variations du niveau d'oxydation des AA entraînent une modification des voies de production d'énergie (Bradfield & Jourdan, 1973 ; Garlick, 1986 ; Garrow & Hawes, 1972 ; Robinson *et al.*, 1990).

L'ensemble des phénomènes splanchniques influence significativement les concentrations plasmatiques d'AA, assurant un rôle majeur de zone tampon entre ce qui arrive dans l'organisme et la zone périphérique. Toutefois, dans le cas du premier repas hyperprotéique, cette capacité splanchnique de régulation semble dépassée comme illustrée par l'élévation postprandiale des teneurs circulantes en un certain nombre d'AA (notamment Pro, Met, Thr et AACLR). Les teneurs circulantes en AACLR étaient tout particulièrement sensibles à l'augmentation aiguë de l'apport protéique alimentaire, confirmant les résultats de Peters & Harper (1987) et de Semon *et al.* (1988). De plus, les AACLR sont très peu métabolisés au niveau hépatique, le foie n'a en effet qu'une faible capacité AACLR-transférase (Harper *et al.*, 1984 ; Torres *et al.*, 1998).

Concernant les AA plasmatiques, des résultats intéressants ont été apportés par les analyses en GC-C-IRMS. Même si l'utilisation du  $^{15}\text{N}$  ne permet pas la mesure directe du devenir des AA alimentaires du fait des transaminations entraînant des échanges de  $^{15}\text{N}$  entre les AA (sauf pour la Lys, la Thr et apparemment la Pro et l'His (Metges *et al.*, 1999b)), elle permet tout de même l'obtention d'informations sur les cinétiques d'enrichissement de chaque pool plasmatique d'AA en azote exogène et la comparaison de différentes conditions nutritionnelles. En effet, cette technique nous a permis de suivre l'apparition des AA  $^{15}\text{N}$  dans le sang, ce qui reflète en partie l'arrivée des AA alimentaires (réserve faite des AA impliqués dans les transaminations). Dans le groupe HP-50, l'enrichissement en azote  $^{15}\text{N}$  des pools plasmatiques est plus rapide que dans les groupes AP-14 et AP-50, sauf pour l'Orn, mais cet AA est d'origine endogène uniquement, les protéines de lait n'en contenant pas. Ceci traduit certainement la métabolisation accélérée des AA alimentaires par des organismes adaptés. Les quantités cumulées d'AA  $^{15}\text{N}$  ayant transité par le pool plasmatique pendant les 5 heures

de l'expérience étaient réduites dans le cas des rats adaptés au régime hyperprotéique, conséquence de la stimulation de la dégradation des AA alimentaires chez ces animaux. Cette diminution était toutefois moins marquée dans le cas des AACLR, du fait de l'élévation de leurs concentrations basales. La comparaison des résultats des groupes AP-14 et AP-50 est intéressante. Ainsi, si la quantité d'azote exogène apportée par le repas hyperprotéique était 3,5 fois supérieure à celle apportée par le repas normoprotéique, les quantités de Leu et de Val portant un azote exogène et transitant via le pool plasmatique total de Leu ou de Val étaient respectivement 5 et 6 fois plus importantes chez les animaux du groupe AP-50 par rapport à ceux du groupe AP-14. Ceci traduit la faible capacité hépatique de désamination des AACLR après un repas apportant un surplus d'AA alimentaires. Les AACLR retrouvés dans la circulation générale étaient en grande partie des AA directement alimentaires. Par contre, ces coefficients sont de 2,6 et 2,9 pour la Lys et la Thr, respectivement, ce qui traduit la forte capacité du foie à oxyder ces deux AA. Enfin, les différences les plus faibles étaient observées pour les AANI, et tout spécialement pour Ala et Glx. Sachant que la muqueuse de l'intestin grêle extrait 98% du Glu luminal et en catabolise 70% (Wu, 1998), l'azote exogène est transféré en partie sur d'autres AA et n'apparaît donc pas dans le pool plasmatique de Glu, même si c'est l'AA le plus abondant dans la protéine de lait. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'enrichissement du pool plasmatique de Glu n'est pas le plus élevé. Le cas de la Tyr est à noter : c'est le seul AANI pour lequel la quantité d'azote exogène transitant via le pool plasmatique après le repas hyperprotéique était 3 fois supérieure à celle calculée après le repas normoprotéique. Il a été démontré que le taux de conversion de la Phe en Tyr est élevé et peut atteindre 85% de la totalité de la Phe extraite au niveau splanchnique (Matthews *et al.*, 1993). Ceci pourrait expliquer comment le pool plasmatique de Tyr atteint un enrichissement si élevé. Enfin, le cas de l'Orn est aussi intéressant car cet AA est absent des protéines de lait. L'Orn <sup>15</sup>N qui apparaît dans la circulation sanguine est donc uniquement le résultat de la synthèse endogène de cet AA à partir des autres AA du repas.

Nos études ont aussi mis en évidence que les concentrations plasmatiques basales (i.e. mesurées à jeun) étaient sensibles au niveau habituel d'apport protéique. L'adaptation au régime hyperprotéique entraînait une augmentation des teneurs plasmatiques basales en AACLR (+73% dans l'ETUDE 2 chez le rat et +16% dans l'ETUDE 3 chez l'homme), conséquences de la faible régulation des AACLR transférases au niveau hépatique (Windmueller & Spaeth, 1975). Chez l'animal, nous avons aussi observé une augmentation de la concentration basale en Arg, ce qui est assez logique sachant que cet AA est un produit

du cycle de l'urée qui est très clairement stimulé en situation de régime HP. Enfin, les teneurs basales circulantes en AA néoglucogéniques (Thr, Gly, Ser, Ala, Glu et Gln) étaient diminuées après le régime hyperprotéique. Dans l'étude réalisée chez le rat, ce phénomène s'explique principalement par la diminution des quantités de glucides apportées par le régime (75,9% dans le cas du régime à 14% de protéines ; 38,1% dans le cas du régime à 50% de protéines), se traduisant en conséquence par une forte activation de la néoglucogénèse. De plus, en ce qui concerne la Gln, cet AA est beaucoup utilisé par le rein pour la production d'ammoniac (Brosnan, 1987), molécule dont la synthèse est stimulée en régime hyperprotéique. La production de Gln par synthèse *de novo* à partir des AACLR au niveau du muscle, est aussi réduite en régime hyperprotéique (Matthews & Campbell, 1992). Ce même phénomène concourt aussi très certainement à la concentration réduite en Ala. Dans notre étude sur le volontaire sain, la concentration totale en AA néoglucogéniques est aussi diminuée après la semaine de régime hyperprotéique, mais dans une moindre mesure, l'apport glucidique étant équivalent entre les 2 régimes. L'ensemble de ces résultats rejoignent ceux de Forslund *et al.* (2000) qui démontraient, chez l'homme, une diminution des niveaux plasmatiques de Gln, Ala, Gly et Thr associée à une augmentation de la glucagonémie et du ratio insuline/glucagon, après une semaine d'un régime à 2,5 g protéines.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> mais à teneur réduite en glucides par rapport au régime normoprotéique. Nous avons aussi observé une augmentation de la glucagonémie basale (P<0,02) après une semaine de régime hyperprotéique, mais aucun effet sur le ratio insuline/glucagon ou sur l'insulinémie.

Nos résultats, toutefois, sont difficilement comparables avec ceux d'autres études publiées, car nos 2 régimes d'adaptation apportaient les mêmes quantités de glucides, or ce sont les glucides qui sont les régulateurs les plus importants de la sécrétion insulinémique et glucagonémique (Wolever, 2000 ; Wolever & Bolognesi, 1996). Toutefois, Nuttall et ses collaborateurs ont publié plusieurs études portant sur l'effet des protéines alimentaires sur le glucose et les hormones du métabolisme glucidique. Ainsi, Gannon & Nuttall (1995) ont montré que l'administration à des rats à jeun d'une dose de protéines à 2 g.kg PC<sup>-1</sup> entraînait une augmentation marquée de la glucagonémie portale associée à une diminution de la concentration hépatique en glycogène (-50%), c'est-à-dire à une stimulation de la glycogénolyse. Ils observaient parallèlement une légère augmentation de l'insulinémie, mais celle-ci était de beaucoup plus courte durée. La même expérience réalisée avec une dose de 1 g.kg PC<sup>-1</sup> n'entraînait aucune variation par rapport aux valeurs basales. L'ingestion d'une dose élevée de protéines (50g), chez le volontaire sain, ne semble pas avoir d'effet sur la

glycémie mais par contre stimule la sécrétion d'insuline (Nuttall & Gannon, 1991). Toutefois, l'élévation de l'insulinémie observée reste très inférieure à celle obtenue lors de l'ingestion d'une quantité équivalente de glucides (Krezowski *et al.*, 1986). Les AA n'ont pas tous la même capacité de stimulation de l'insulinémie, ainsi une perfusion intraveineuse d'Arg est celle qui, chez l'homme, entraîne l'augmentation d'insulinémie la plus sensible, suivie par la Lys, la Leu, la Phe, la Thr et le Trp (Floyd *et al.*, 1966 ; Fajans *et al.*, 1967). Enfin, l'ingestion de protéines ou d'un mélange d'AA avec des glucides accroît l'effet stimulateur de ces derniers sur la sécrétion d'insuline (Krezowski *et al.*, 1986 ; Westphal *et al.*, 1990 ; van Loon *et al.*, 2000).

Il y a très peu de résultats concernant l'effet à long terme d'un régime hyperprotéique sur la glycémie et les sécrétions d'insuline et de glucagon. De plus, les résultats sont assez discordants. Ainsi, si Linn *et al.* (1996, 1999) montrent qu'un apport accru en protéines entraîne une élévation des concentrations basales en insuline, Pacy *et al.* (1994) et Forslund *et al.* (2000) montrent eux que l'insulinémie basale reste très stable, et ce pour un large éventail d'apports (de 0,36 à 2,5 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>). L'élévation postprandiale est par contre légèrement réduite, reflet de la réduction de la teneur en glucides du régime. Nos résultats, obtenus après 7 jours de régime hyperprotéique, sont concordants avec ces dernières données: pas de différence significative entre les valeurs basales mesurées après la semaine de régime normoprotéique ou après celle de régime hyperprotéique. Les variations postprandiales sont similaires, et les aires sous la courbe équivalentes. Un sujet de controverse, non abordé dans notre étude, concerne le fait que les régimes hyperprotéiques sont soupçonnés de favoriser le développement d'une insulino-résistance (Wolever *et al.*, 1997 ; Patti *et al.*, 1998). Cette hypothèse repose sur la disponibilité accrue en substrats néoglucogéniques (Gln, Glu, Ala, Ser, Gly et Thr). En fait, nous avons trouvé une diminution des concentrations basales en AA néoglucogéniques malgré une multiplication par 2 de l'apport protéique, ce qui va dans le sens d'une activité néoglucogénique accrue. Linn *et al.* (2000) ont montré qu'un apport protéique élevé (1,8 g.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) résultait à long terme en une diminution de la sensibilité à l'insuline, et ce malgré un apport glucidique réduit. Nos résultats montrent que les profils insulinémique et glucagonémique postprandiaux ne sont pas modifiés par un apport protéique chronique accru si l'apport en glucides est maintenu à un niveau adéquat. De plus, des données obtenues dans notre laboratoire (Lacroix *et al.*, 2001b) chez des rats soumis pendant 6 mois à un régime HP ont montré une moindre augmentation de l'insulinémie basale avec l'âge, ce qui irait plutôt dans le sens d'un effet protecteur du régime HP par rapport au développement d'une insulino-résistance. La glycémie mesurée à jeun chez ces animaux était significativement plus faible par rapport à celle

mesurée chez les animaux contrôle qui avait ingéré un régime normoprotéique pendant les 6 mois de l'expérience. En outre, l'ETUDE 3 a montré que une semaine de régime HP entraînait, chez l'homme, une élévation significative de la concentration plasmatique basale en IGF-1, sans modification notable de la sécrétion en hormone de croissance (GH). L'IGF-1 est sécrétée au niveau hépatique sous l'influence de la GH libérée au niveau hypophysaire, ainsi que localement dans différents tissus, dont le muscle. Cette sécrétion serait associée à une stimulation de la synthèse protéique (Fryburg *et al.*, 1995). Les taux circulants d'IGF-1 sont corrélés au niveau d'apport protéique dans le régime, aussi bien chez l'animal que chez l'homme. Nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature montrant une association entre IGF-1 et apports protéiques à la fois dans les cas de régime déficients en protéines et pour des régimes HP (Divino Filho *et al.*, 1999 ; Pacy *et al.*, 1994 ; Sanchez-Gomez *et al.*, 1999 ; Underwood *et al.*, 1994).

Se pose aussi la question de savoir si un régime hyperprotéique peut permettre ou non une rétention accrue d'azote d'où une expansion de la masse maigre corporelle, et notamment de la masse musculaire. Cette question est d'importance non seulement pour les athlètes qui souhaitent augmenter leur masse protéique musculaire, facteur d'amélioration de leurs performances, mais aussi pour les personnes âgées ou les personnes confrontées à certaines conditions physiopathologiques (cancer, SIDA), et chez qui la fonte musculaire doit être minimisée. Les données disponibles jusqu'à présent n'ont pas permis de détecter d'augmentation significative de la masse maigre chez des sujets sains (sédentaires) consommant un régime riche en protéines (Garlick *et al.*, 1999). Dans cet article, Garlick *et al.* suggèrent d'ailleurs que ceci pourrait être dû à un problème de sensibilité des techniques employées, des études à plus long terme avec des méthodes plus sensibles seraient nécessaires. Il y a toutefois un certain nombre de publications qui montrent que le taux de synthèse des protéines musculaires reste insensible à une augmentation de l'apport, certaines études montrant même une diminution du FSR (Almurshed & Grunewald, 2000 ; Laurent *et al.*, 1984 ; Taillandier *et al.*, 1996). Par exemple, Masanès *et al.* (1999) ont récemment montré que lorsque le niveau d'apport en protéines passait de 9 à 36% de l'apport énergétique, le FSR des protéines musculaires diminuait. Nos résultats sont tout à fait concordants avec cette hypothèse. En effet, à la fin de la période postprandiale, il y avait moins d'azote exogène incorporé dans les protéines musculaires chez les rats en régime hyperprotéique par rapport aux animaux en régime normoprotéique (même si ce résultat n'était pas significatif du fait d'une très grande variabilité). En fait, que les animaux ingèrent

3 g ou 11 g de protéines par jour, ils incorporent la même quantité d'azote alimentaire dans leurs synthèses musculaires.

Nous avons observé parallèlement une augmentation très significative et surprenante de la quantité d'azote exogène retrouvé dans la fraction non protéique du muscle squelettique, qui doublait après adaptation au régime hyperprotéique. Ce résultat inattendu va dans le sens des conclusions d'Abumrad *et al.* (1989) qui postulaient que, lorsque le muscle squelettique est soumis à un apport accru en protéines, la majeure partie de ce qui est capté par le muscle n'est pas incorporé dans les protéines mais plutôt conservé dans un pool d'AA libres en vue d'une utilisation ultérieure. De plus, si l'augmentation de la disponibilité en AA dans le pool intracellulaire n'est que le fait d'une captation accrue de AA CLR (dont les concentrations plasmatiques augmentent en régime hyperprotéique), il se crée un déséquilibre entre les différents AA disponibles pour la synthèse protéique, et la synthèse est réduite du fait d'une diminution paradoxale de la disponibilité en certains substrats (Moundras *et al.*, 1993). Nous devons souligner ici, que dans notre étude chez le rat, l'augmentation de l'apport en protéines s'est faite aux dépens de l'apport en glucides, ce qui peut entraîner une modification de la sécrétion d'insuline. Toutefois, même si l'effet anabolique de l'insuline est connu, plusieurs études ont montré que cet effet était surtout vrai pour les protéines splanchniques et moins pour les tissus périphériques (De Feo *et al.*, 1992 ; Fouillet *et al.*, 2001 ; Tessari *et al.*, 1996a). Un autre argument peut aussi être opposé à nos conclusions. La consommation d'un repas ne contenant que des protéines ou à teneur élevée en protéines (et réduite en glucides) entraîne une perte par thermogénèse accrue (Crovetti *et al.*, 1998 ; Garrow, 1985) et la synthèse protéique est consommatrice d'énergie d'où une moindre synthèse lorsque l'apport glucidique est réduit. Très peu de données sont hélas disponibles pour réfuter ou confirmer cette hypothèse. En effet, chez le rat, les échanges caloriques sont le plus souvent réalisés aux dépens des glucides du fait de la faible teneur en lipides des régimes standard. Toutefois, et de façon surprenante, les résultats de notre étude calorimétrique portant sur la première ingestion d'un régime hyperprotéique montrent au contraire une diminution de la thermogénèse postprandiale après le repas HP par rapport au repas contrôle s'expliquant par une très forte réduction de l'oxydation glucidique postprandiale et malgré une nette stimulation de l'oxydation protéique postprandiale. Ce résultat s'explique d'une part par l'apport réduit en glucides lors du repas HP, et d'autre part par une possible compétition entre (1) les squelettes carbonés issus de la désamination, stimulée, des AA alimentaires et (2) les glucides alimentaires dans les voies de production d'énergie. Enfin, Taillandier *et al.* (1996) qui ont échangé lipides et protéines dans le régime ont tout de même démontré une diminution du FSR dans le muscle *tibialis*.

Nous pensons donc que le muscle a une capacité d'adaptation réduite, entre autres du fait de la modification de la disponibilité périphérique des différents AA. Le surplus d'AACLR apporté par le régime n'étant pas suffisamment oxydé, ces AA s'accumulent dans le pool non protéique musculaire et sont proportionnellement moins incorporés dans les synthèses. Ce phénomène serait aussi favorisé par une diminution de la sécrétion d'insuline en régime hyperprotéique. Pour confirmer notre hypothèse, il faudrait vérifier que cette accumulation n'est pas liée à une dégradation protéique accrue. Nous concluons donc que la consommation d'un régime hyperprotéique n'entraîne pas, chez l'animal sédentaire, de stimulation des synthèses protéiques musculaires. Nos résultats ont récemment été confirmés par une étude réalisée dans notre laboratoire (Lacroix *et al.*, 2001b) qui a montré la masse maigre de rats soumis pendant 6 mois à un régime à 50% de protéines totales de lait n'était pas différente de celle d'autres rats soumis pendant la même période à un régime normoprotéique (14% de protéines).

Pour conclure en ce qui concerne l'effet du niveau d'apport habituel en protéines sur la distribution de l'azote alimentaire dans les synthèses protéiques, nous avons évalué les contributions respectives de l'azote alimentaire et de l'azote endogène dans les synthèses protéiques de différents organes, à l'échelle de la journée, chez des rats soumis à un régime normo- ou hyperprotéique. Les résultats obtenus sont donnés sur la figure 74. Pour ce calcul, nous avons utilisé les taux de synthèse (FSR) de la littérature. Nous constatons que chez les animaux en régime HP, la contribution de l'azote alimentaire aux synthèses protéiques est augmentée dans tous les tissus (sauf dans le muscle) avec une moindre ré-incorporation de l'azote d'origine endogène. Il serait intéressant de mener des investigations qui viseraient à évaluer les significations métaboliques et physiologiques de cette modification de la contribution respective de l'azote alimentaire ou recyclé dans les synthèses protéiques corporelles.

### **F.3 RETRO-CONTROLE VIA LA PRISE ALIMENTAIRE ET LES CINETIQUES DIGESTIVES.**

Nous avons aussi mis en évidence d'autres phénomènes de régulation qui se mettent en place lors d'une augmentation aiguë ou chronique de l'apport protéique alimentaire, et qui permettent en fait de réduire les quantités d'AA entrant dans l'organisme.

Tout d'abord, nous avons montré qu'il existait une régulation au niveau digestif, même si ce phénomène est certainement secondaire. Ainsi, les cinétiques digestives



répondent différemment à l'ingestion aiguë ou chronique d'un régime riche en protéines. Le taux de vidange gastrique est modérément affecté par le régime, même si un ralentissement de celui-ci est observé pendant les 2 premières heures qui suivent le repas, par rapport aux animaux ingérant pour la première fois le régime hyperprotéique. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Shi *et al.* (1997) qui montraient une accélération de la vidange gastrique chez des rats adaptés à un régime à 55,9% de protéines par rapport à des animaux adaptés à un régime à 17,0 ou 9,2% de protéines. Toutefois, dans cette étude, le repas expérimental était composé de peptides solubles (et non de protéines entières) et les résultats étaient basés sur le suivi de la phase liquide seule – or la phase solide a un comportement cinétique différent, en particulier pour les protéines qui vont précipiter dans l'estomac sous l'effet de l'acidité du jus gastrique. Dans notre étude, il restait 80 fois plus d'azote alimentaire dans l'estomac des rats qui ingéraient le repas hyperprotéique pour la première fois par rapport aux rats AP-14, et 10 fois plus par rapport aux animaux adaptés au régime hyperprotéique, à la fin de la période expérimentale. Ce phénomène pourrait participer à la régulation du passage des AA alimentaires vers la périphérie, en retardant la libération d'une part non négligeable du bolus alimentaire. De plus, la distension stomacale qui est certainement induite par cette accumulation de protéines pourrait participer à la génération d'un message transmis au SNC via le nerf vague (Phillips & Powley, 1996 & 1998) et induisant une réduction de la prise alimentaire.

Parallèlement, nous avons aussi observé que l'azote alimentaire restait plus longtemps dans le lumen des rats adaptés au régime hyperprotéique par rapport à ceux consommant pour la première fois ce type d'aliment. Ce résultat est surprenant mais peut s'expliquer par une stagnation de l'azote alimentaire dans l'intestin qui va permettre de ralentir le passage des AA alimentaires vers la circulation sanguine. Le ralentissement de l'activité de certains transporteurs d'AA intestinaux participe aussi à retarder ce transfert d'AA vers le milieu intérieur. En effet, des études réalisées au laboratoire (Mathé, 1998 ; Jean, 2001) ont montré une nette diminution des quantités de L-Gln captées par les systèmes de transport Na<sup>+</sup> dépendants dans tout l'intestin, avec un gradient croissant vers l'extrémité distale, il en était de même pour la captation de L-Ala au niveau proximal.

Enfin, nous avons observé une diminution du niveau d'ingestion des animaux lors des premiers jours de présentation du régime hyperprotéique. Ce phénomène d'anorexie passagère a été largement illustré dans la littérature (Peters & Harper, 1987), et se met en place très rapidement après le début de la présentation du régime hyperprotéique. Il est en fait interprété comme un moyen utilisé par l'organisme non adapté pour réduire l'influx d'AA

alimentaires. Ceci implique que des signaux périphériques soient transmis au niveau central, de façon à "informer" l'animal de la richesse protéique du régime, ces signaux étant ensuite intégrés et conduisant à une modification du comportement alimentaire. La précocité de la réponse (qui peut se mettre en place dès 20 minutes, Peters & Harper, 1987), implique que ces signaux métaboliques périphériques ne sont peut être pas les seuls messages impliqués. L'ETUDE 2 visait aussi à voir si ces comportements alimentaires différents pouvaient être corrélés à des modifications en neurotransmetteurs et/ou acides aminés dans certaines zones du cerveau connues pour être impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire. L'hypothèse de départ était que la première ingestion d'un repas hyperprotéique entraîne des modifications de certains paramètres biochimiques (concentrations plasmatiques en AA principalement) qui pourraient être autant de messages transmis au système nerveux central et qui entraîneraient une réponse comportementale. Les résultats obtenus montraient une très nette diminution de la concentration en DOPAC dans le NTS après le premier repas hyperprotéique, avec en parallèle une forte diminution de l'activité dopaminergique exprimée par le rapport DOPAC/DA dans cette même zone. Chez les animaux adaptés au régime hyperprotéique, nous avons mesuré des concentrations en DOPAC très faibles dans le NTS, ainsi qu'une activité dopaminergique réduite. Le groupe "Contrôle" était celui des rats adaptés à un régime normoprotéique et ingérant un repas à 14% de caséine. Il y aurait donc un effet de la teneur en protéines du régime sur le système dopaminergique du NTS. Cette zone est le site de projection des neurones afférents du système vague (Schwartz, 2000). Elle reçoit tous les signaux afférents issus des organes abdominaux. Elle est aussi le premier relais central du goût (Giza *et al.* 1987). Le NTS projette dans l'hypothalamus, zone majeure du contrôle du comportement alimentaire. Le NTS est situé à proximité de l'APo, qui est une zone entourant un ventricule, qui ne possède ni barrière hémato-méningée, ni barrière entre le liquide cérébro-spinal et le cerveau et qui enfin est très richement vascularisée (Hyde & Miselis, 1983). Toutes ces caractéristiques structurelles suggèrent pour cette zone un rôle d'enregistreur des variations des signaux métaboliques ou hormonaux dans le sang ou le LCS. De plus, elle pourrait transmettre ces informations au NTS proche. Ces deux organes interviennent clairement dans le contrôle de la prise alimentaire comme mis en évidence par les expériences de lésions : les animaux dépourvus d'APo et de tout ou partie du NTS deviennent hypophages (Hyde & Miselis, 1993 ; Kenney *et al.*, 1994). Phifer & Berthoud (1998) ont ainsi démontré une activation de l'APo et du NTS (technique immunohistochimique du *c-Fos*) lors de la perfusion intestinale d'un mélange d'AA, avec une sensibilité plus importante de la région du NTS directement adjacente à l'APo. Ce même résultat est retrouvé dans le cas de l'ingestion d'un repas mixte normal (Schwartz, 2000).

Certains neurones du NTS sont sensibles à la distension gastrique induite par un repas (Schwartz, 2000). La distension gastrique très certainement induite par l'accumulation de protéines alimentaires dans l'estomac et la détection de nutriments dans l'intestin sont 2 phénomènes post-ingestifs qui pourraient être impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. Nous avons aussi montré une élévation postprandiale des concentrations plasmatiques en AA qui pourrait être détectée par l'APo et transmise au NTS. Toutefois, des problèmes techniques liés à l'analyse des AA dans les échantillons cérébraux ne nous permettent malheureusement pas d'aller plus loin dans cette hypothèse.

Cette hypothèse "métabolique" ne peut toutefois pas être la seule envisagée, car chez les animaux adaptés au régime hyperprotéique (cHP-50), nous observons aussi une modification de l'activité dopaminergique du NTS par rapport aux animaux du groupe cAP-14. Or, (1) le comportement alimentaire des rats cHP-50, évalué par leur niveau de consommation, est redevenu normal, (2) les concentrations plasmatiques d'AA sont chez les rats cHP-50 d'une remarquable stabilité durant la phase postprandiale et (3) la vidange gastrique du repas chez les rats adaptés au régime hyperprotéique est pratiquement équivalente à celle des rats contrôle.

Les effets de la dopamine sur la prise alimentaire sont apparemment contradictoires, et en fait dépendent de la zone cérébrale étudiée et de la technique expérimentale utilisée (Meguid *et al.*, 1997). Par exemple, au niveau du système mésolimbique (nucleus accumbens), la dopamine a plutôt un effet stimulant sur la prise alimentaire (Westerink *et al.*, 1997) alors qu'au niveau hypothalamique elle aurait plutôt un rôle inhibiteur de la prise alimentaire (Gillard *et al.*, 1993). La dopamine serait impliquée dans la médiation du degré de satisfaction associé à l'ingestion d'un aliment ("Food reward") (Berridge, 1996 ; Smith, 1998). Ce concept repose sur l'existence d'un processus de motivation induit par les stimuli sensoriels et les phénomènes ingestifs liés à l'aliment présenté.

Il est de plus établi que le NTS est la première zone centrale relayant les signaux afférents concernant le goût et la palatabilité. L'évaluation de la palatabilité d'un aliment est réalisée, la plupart du temps, par une mesure des quantités ingérées. Or apparemment, il n'est pas toujours vrai que l'équation "Vouloir un aliment = Aimer un aliment" soit vraie. Plusieurs études ont démontré que l'ingestion de fluides ou d'aliments très palatables entraînait une plus forte libération de dopamine (Blackburn *et al.*, 1992 ; Martel & Fantino, 1996). Nous pourrions donc expliquer nos résultats de la façon suivante : les rats "n'aiment pas" le régime riche en protéines. En conséquence, la première ingestion de ce régime entraîne une chute de l'activité dopaminergique qui reste basse même après 2 semaines sur

ce régime ; les animaux ingèrent le régime (qui ne leur est pas physiologiquement nuisible et auquel leur organisme est finalement métaboliquement adapté) mais ne "l'aiment pas". Ces résultats sont en accord avec ceux de McArthur *et al.* (1993) qui montraient que la palatabilité initiale du régime hyperprotéique – définie comme "*les propriétés physiques et chimiques du régime qui en stimulent ou qui en inhibent l'ingestion pendant la période pré-absorptive ou immédiatement post-absorptive, c'est à dire une réponse non conditionnée par les effets métaboliques qui seront ensuite associés à son ingestion* – était faible. Ceci a d'ailleurs été confirmé depuis au sein de notre équipe. Bensaïd *et al.* (2002) ont en effet montré que la dépression instantanée de la prise alimentaire observée lors de la première présentation d'un régime hyperprotéique n'était pas une aversion gustative conditionnée (comme c'est par exemple le cas pour les régimes déficients en un AA), mais plutôt la conséquence d'une faible palatabilité initiale du régime. De plus, ces auteurs ont aussi montré que les effets post-ingestifs du régime pouvaient être à l'origine d'une "palatabilité conditionnée" plus faible dans le cas du régime hyperprotéique par rapport au régime normoprotéique. Des expériences complémentaires sont bien sûr nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

#### **F.4 CONSEQUENCES POUR LA DEFINITION DES BESOINS ET POUR L'EVALUATION DE LA QUALITE DES PROTEINES.**

Nous avons mis en évidence que l'organisme possède la capacité de s'adapter à des variations importantes du niveau d'apport protéique, via un certain nombre de modifications comportementales et métaboliques. Se pose alors logiquement la question de savoir comment cette faculté peut interférer lors de la définition des besoins de l'organisme en protéines, et de l'établissement des niveaux d'apport recommandés. Faut-il de plus définir une limite supérieure de consommation, c'est à dire un niveau d'apport en protéines au delà duquel l'adaptation pose problème? Une autre question concerne l'influence que peut avoir le niveau habituel d'apport protéique alimentaire sur l'évaluation de la qualité nutritionnelle d'une protéine. L'indice – PD-CAAS – dont l'utilisation est actuellement recommandée par la FAO/OMS est-il adapté i.e. permet-il de prendre en compte cette composante? Quelle peut être l'interaction entre les facteurs intrinsèques – c'est à dire propres à la protéine, comme sa composition en AA ou sa digestibilité – et les facteurs extrinsèques – comme le niveau alimentaire d'apport protéique – dans l'évaluation de la qualité d'une protéine?

Les valeurs des besoins minimaux en protéines ( $0,6 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) et des recommandations d'apport ( $0,75 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) sont maintenant clairement établies. De plus, il est vrai dans les pays occidentaux le niveau moyen d'apport est tel que le risque de carence dans la population générale est minime. Par contre, la définition de la limite supérieure tolérable d'ingestion ("Tolerable Upper Intake Level", TUIL) est plus complexe. L'IDECG (International Dietary Energy Consultative Group) a défini l'apport protéique optimal comme celui permettant l'entretien d'un indice de masse corporel (IMC ou BMI) acceptable (18 à 24 chez la femme, 19 à 25 chez l'homme), le maintien d'une masse musculaire suffisante à des exercices physiques, le tout sans dysfonctionnement organique ou changement comportemental particulier (Durnin *et al.*, 1999). Ce groupe de travail recommande un niveau d'apport de  $0,8$  à  $2 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  chez l'adulte à l'entretien ; ces apports pouvant atteindre  $3 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  chez certains athlètes (haltérophiles, sprinters...). Millward (1999) recommande lui de ne pas dépasser un niveau d'apport égal au double des recommandations habituelles, soit  $1,5 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ . Metges & Barth (2000), enfin, proposent arbitrairement  $2 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  comme TUIL. Il n'y a donc clairement pas de consensus quant à cet "apport maximal tolérable", principalement du fait de la capacité de l'organisme à s'adapter à des niveaux d'apport élevés. De plus, les résultats discordants des études épidémiologiques et le manque d'études nutritionnelles à long terme ne facilitent pas le débat. Une étude réalisée récemment dans notre laboratoire (Lacroix, 2001b) chez des rats Wistar nourris avec un régime contenant 50% de protéines totales de lait a mis en évidence à 6 mois (1) une nette diminution de la masse grasse des animaux, (2) pas d'effet sur la masse maigre, (3) une augmentation moins marquée de la glycémie et de l'insulinémie basales avec l'âge, (4) pas d'effets délétères sur le foie et le rein (coupes histologiques) et (5) pas d'augmentation du stress oxydant. Ces résultats tendraient à montrer que l'adaptation métabolique au régime hyperprotéique permet réellement à l'animal de disposer au mieux des nouvelles conditions nutritionnelles qui lui sont offertes.

Si les besoins en protéines sont clairement établis, il n'en est pas de même pour les besoins en AA, qui sont actuellement très discutés. Les résultats que nous avons obtenus dans l'ETUDE 1 apportent de nouvelles données qui devront être prises en compte. Nous avons montré que les quantités d'AAI endogènes retrouvées au niveau de l'iléon terminal sont comprises entre 3 et  $7 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$ . Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles de Fuller *et al.* (1994) mesurées chez le sujet iléostomisé. S'ajoutent en plus à peu près  $10 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{jour}^{-1}$  de pertes iléales d'AAI alimentaires. Les recommandations habituelles de consommation s'appuient soit sur la mesure de la balance azotée (FAO/OMS), et dans ce cas

les pertes iléales potentielles sont évaluées par la mesure de l'excrétion azotée fécale ; soit sur des études utilisant des traceurs (M. I. T.) et dans ce cas, les pertes iléales ne sont pas prises en compte, étant considérées comme négligeables par rapport aux pertes oxydatives. Nos données suggèrent fortement que cela n'est pas le cas. En effet, les pertes iléales totales (endogènes + alimentaires) représentent même de 26 (His) à 103% (Thr) des apports recommandés en AAI dans le groupe Lait et de 29 (His) à 127% (Thr) de ces mêmes recommandations dans le groupe Soja. En ce qui concerne les autres AAI, ces pertes représentent 40 à 60% des apports recommandés. La question de l'adéquation des recommandations d'apport se pose donc, et tout particulièrement pour les AACLR et la Thr. Il y a un consensus de plus en plus général en faveur d'une révision de ces chiffres, le débat portant surtout sur les problèmes méthodologiques (Fuller & Garlick, 1994 ; Millward *et al.*, 2000 ; Reeds, 2000 ; Young & Borgonha, 2000 ; Zello *et al.*, 1995). Dans le cas de la Thr, l'apport nutritionnel recommandé est de 7 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> par la méthode de la balance azotée, valeur revue à 20 mg.kg<sup>-1</sup>.jour<sup>-1</sup> par des équipes utilisant la méthode des traceurs (Wilson *et al.*, 2000 ; Young *et al.*, 1989). En utilisant cette dernière valeur, les pertes iléales de Thr représenteraient 44 à 54% des recommandations. En comparant nos valeurs de pertes iléales aux apports recommandés établis par Young et ses collaborateurs (Young *et al.*, 1989), les pourcentages obtenus varient de 20 à 40% dans la plupart des cas. Nos résultats vont donc aussi fortement dans le sens d'une nécessaire révision des recommandations d'apport alimentaires en AAI.

Dans l'ÉTUDE 3, réalisée chez l'homme, nous avons, lors du repas test réalisé à la fin des périodes d'adaptation, utilisé 2 protéines – lait et soja – de qualité différente. En effet, les protéines de lait ont un PD-CAAS de 1,21 (ramené à 1,00 suivant la définition de cet indice) et celles de soja, un PD-CAAS de 0,92. Dans des études antérieures du laboratoire, les UPPN évalués dans le cas d'un repas protéines + saccharose étaient de 80 et 72% pour le lait et le soja, respectivement. Les données que nous obtenons ici montrent que cette hiérarchie est conservée, avec des UPPN plus élevés pour les protéines de lait par rapport aux protéines de soja, dans les 2 conditions nutritionnelles (NP et HP). L'examen plus précis des valeurs d'UPPN montre un effet significatif du niveau d'apport habituel en protéines, avec une baisse sensible des UPPN dans le cas du régime HP. De plus, il existe clairement une interaction entre niveau d'apport protéique et source protéique, l'amplitude de la baisse de l'UPPN n'étant pas la même en fonction de la protéine considérée (-6% dans le cas du lait, -15% dans le cas du soja). L'adaptation à un régime HP provoquerait donc une importante diminution de la valeur nutritionnelle d'une protéine si celle-ci n'est pas

qualitativement idéale. Il est possible que la composition en AA de la protéine qui contribue à définir son niveau d'utilisation en condition d'apport protéique normal devienne un facteur limitant dans un système dont les capacités d'oxydation sont fortement stimulées.

La digestibilité des protéines est très certainement une caractéristique importante de la protéine quant à la définition de son niveau d'utilisation. Notre ETUDE 1 a montré que les pertes iléales azotées étaient plus importantes dans le cas de l'ingestion d'un repas à base de protéines de soja par rapport aux protéines de lait, du fait d'une digestibilité totale des protéines de soja inférieure à celle des protéines de lait. L'ingestion du repas contenant les protéines de soja entraînait une augmentation des pertes azotées iléales, d'origine à la fois endogène et alimentaire. La modélisation de ces données (Fouillet *et al.*, 2002) a permis de montrer que les vitesses de vidange gastrique des protéines de lait et de soja étaient à peu près équivalentes, mais que par contre, l'absorption des AA était plus rapide dans le cas du soja que dans le cas du lait, les AA alimentaires se retrouvant donc plus précocement dans le pool des AA libres splanchniques. Ceci est d'ailleurs illustré par l'augmentation plus marquée des teneurs plasmatiques de certains AA observée chez les volontaires ingérant le repas Soja. Les résultats de modélisation montrent que ces AA arrivant rapidement dans la zone splanchnique sont dirigés soit vers les synthèses protéiques splanchniques soit vers l'oxydation. Ceci est tout à fait concordant avec le fait que 2 heures après le repas, nous retrouvons significativement plus d'azote exogène dans les pools d'urée corporelle et urinaire chez les volontaires du groupe Soja. L'adaptation au régime HP amplifie encore ce phénomène. Ainsi, dès 2 heures après le repas, dans le groupe Soja, la désamination totale est significativement plus importante après la semaine de régime HP qu'après la semaine de régime NP, alors que dans le groupe Lait, il faut attendre 6 heures pour observer une différence significative. Ces résultats rejoignent ceux de Boirie *et al.* (1997) et sont en accord avec le concept développé par cette équipe concernant l'existence de protéines dites "lentes" et de protéines dites "rapides", les protéines "rapides" étant plus rapidement absorbées et finalement plus oxydées que les protéines "lentes" ; et cette différence est encore plus sensible dans le cas d'un organisme adapté à un régime HP, et dont les systèmes d'oxydation sont particulièrement activés. En fait, l'ingestion de protéines "lentes" serait plus favorable à une stimulation de la synthèse protéique périphérique (Fouillet *et al.*, 2002).

De plus, le fait que, d'une part, la composition en AA des protéines de soja ne soit pas idéale (déficit en AA soufrés) et que, d'autre part, la digestibilité individuelle de certains AA soit inférieure dans le cas du soja – c'est ainsi le cas de 3 AAI (His, Thr et Val) et de 3 AANI (Pro, Tyr et Ala), la Thr étant l'AA le moins digestible dans le cas des protéines de soja mais pas dans le cas des protéines de lait – peut provoquer un déséquilibre du pool corporel

d'AA libres, qui serait alors légèrement déséquilibré en certains AA. Ce déséquilibre relatif pourrait être aussi à l'origine d'une oxydation accrue après l'ingestion des protéines de soja, ce qui rejoint les résultats de Deutz *et al.* (1998) et de Nimni & Bavetta (1961), et ceci serait encore plus prononcé chez un organisme adapté à un régime HP. L'effet de ce déséquilibre sur les synthèses protéiques corporelles est plus discuté, certains auteurs montrant une stimulation des synthèses hépatiques seules (Nimni & Bavetta, 1961 ; Lecavalier *et al.*, 1991), d'autres au contraire mettent en évidence une inhibition de ces synthèses (Deutz *et al.*, 1998).

Ces différences de qualité entre les 2 protéines utilisées dans le repas test sont clairement exacerbées chez des organismes adaptés à un régime HP. En fait, l'apport "juste adéquat" en un certain nombre d'AA lors de la consommation d'une protéine telle que le soja peut devenir limitant, critique dans un système dont les capacités d'oxydation sont stimulées comme c'est le cas après adaptation à un régime HP. Ceci est d'ailleurs tout à fait cohérent avec les évolutions des concentrations plasmatiques observées pour la Met, l'Arg et la Cit qui sont très différentes après la semaine de régime HP et après celle de régime NP. Il est donc, en ce qui concerne les protéines de soja, difficile de compenser leur moindre qualité par un apport plus important du moins à l'échelle d'un repas. Ceci rejoint les conclusions de Montellano *et al.* (1983) qui concluaient, chez le rat, qu'augmenter la quantité apportée ne permettait pas d'équilibrer les problèmes liés à la qualité de la protéine. Nos conclusions s'inscrivent bien dans la controverse actuelle concernant l'utilisation du PD-CAAS comme indice pour évaluer la qualité nutritionnelle d'une protéine, et ce, à plusieurs niveaux. Le PD-CAAS mesure le ratio entre l'AA le plus limitant de la protéine et le besoin correspondant en cet AA pondéré par la digestibilité fécale mesurée chez le rat. Tout d'abord, (1) cet indice ne prend pas en compte le niveau habituel d'apport protéique alimentaire, or, nous l'avons vu, c'est un paramètre essentiel conditionnant le niveau d'utilisation d'une protéine alimentaire par l'organisme. Le PD-CAAS mesuré après une semaine de régime HP est le même que celui mesuré après une semaine de régime NP, ce qui n'est pas le cas pour l'UPPN, certainement plus discriminant dans ce cas. Il est très difficile de prévoir la qualité d'une protéine à partir de sa seule composition en AA. Et ce d'autant plus que (2) la digestibilité des AA n'est pas la même pour tous, et n'est pas bien évaluée par la digestibilité totale de la protéine comme mis en évidence dans notre ETUDE 1. Enfin (3), une dernière remarque concerne l'utilisation de valeurs de digestibilité mesurées chez le rat, qui d'après d'autres résultats de notre ETUDE 1, ne serait pas un modèle idéal pour évaluer les digestibilités des protéines chez l'homme. En effet, les valeurs de digestibilités caecales des AA alimentaires mesurées chez le rat



correspondent difficilement à celles mesurées au niveau iléal chez l'homme. En fait, les digestibilités totales des protéines de lait et de soja mesurées chez le rat étaient supérieures aux valeurs obtenues chez l'homme. De plus, le modèle "rat" est moins discriminant, les différences entre les 2 protéines obtenues sont de plus faible amplitude. Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer ces différences. Premièrement, le site de prélèvement est différent. Or le métabolisme microbien utilise les composés azotés d'origine alimentaire et produit de l'ammoniac qui peut être ré-absorbé dans le côlon. Ce métabolisme microbien explique d'ailleurs les différences observées entre digestibilité fécale et digestibilité iléale (Darragh & Hodgkinson, 2000). Toutefois, il est peu probable que notre temps de collecte (6 heures) ait permis le développement d'un métabolisme microbien caecal tel qu'il pourrait expliquer toutes les différences observées. Deuxièmement, la composition des repas test était différentes. Dans l'étude chez l'animal, un repas mixte était ingéré alors que chez l'homme, le repas ne contenait que des protéines. Nous ne pensons pas que cette différence puisse expliquer les résultats observés, la composition du repas modifiant certes les cinétiques digestives mais pas la digestibilité iléale mesurée chez l'homme (Gaudichon *et al.*, 1999 ; Mariotti *et al.*, 1999). Troisièmement, les processus de digestion chez l'homme et chez le rat ne sont pas complètement équivalents. Bach Knudsen *et al.* (1994) ont ainsi montré que la digestibilité fécale apparente était plus élevée chez le rat que chez l'homme. Une différence de 3 à 4% était aussi mise en évidence pour la digestibilité fécale vraie (Wisker *et al.*, 1996). Une autre étude avait aussi mis en évidence que la digestibilité des protéines végétales était plus élevée chez les rats que chez l'homme (Forsum *et al.*, 1981). Ces résultats restent à être plus clairement établis, car Bodwell *et al.* (1980) ont par exemple montré qu'il existait une bonne corrélation entre les digestibilités mesurées chez le rat ou chez l'homme. La résolution de la controverse actuelle concernant le PD-CAAS passera entre autres par une clarification de ce problème (FAO/OMS, 1990 ; Schaafsma, 2000).

## **G CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES**

Ce travail visait à mettre en évidence les étapes critiques de l'adaptation de l'organisme aux variations de l'apport protéique alimentaire, et plus spécifiquement à montrer quels sont les phénomènes métaboliques qui sont mis en place dans le cas de la consommation chronique d'un régime hyperprotéique. Nous avons aussi cherché à évaluer quelles étaient les interactions entre niveau et qualité de l'apport protéique alimentaire.

Nos résultats soulignent l'importance de la zone splanchnique dans la réponse de l'organisme aux variations de l'apport protéique. En effet, la réponse majeure de l'organisme est une nette stimulation de l'oxydation des AA d'origine alimentaire fournis en surplus par l'alimentation. Des phénomènes participant à la régulation de l'apport se mettent aussi en place au niveau du tube digestif. Il y a par contre, une relative insensibilité de la zone périphérique, et du muscle squelettique tout particulièrement. Chez le rat sédentaire, l'entrée de l'azote alimentaire dans les synthèses protéiques musculaires n'est pas sensible à l'augmentation chronique de l'apport protéique. Nous avons cependant observé un doublement de la taille du pool non protéique d'azote musculaire, phénomène dont les significations métaboliques restent à être explorées.

Nos résultats montrent aussi une probable modification des contributions respectives de l'azote d'origine alimentaire ou endogène dans les synthèses protéiques, la contribution de l'azote alimentaire augmentant avec le niveau d'apport protéique habituel. En effet, si la quantité d'azote disponible en périphérie reste stable que le régime soit normo- ou hyperprotéique, sa qualité (i.e. AA recyclés ou d'origine alimentaire) n'est pas la même dans les deux cas. Ces résultats demandent cependant à être confirmés par des mesures précises des flux de synthèse et de dégradation protéiques. D'autre part, les conséquences de ces modifications et leur importance dans la détermination d'un apport protéique "idéal" restent à être évaluées.

Une autre conclusion importante de ce travail concerne la difficulté qu'il y a à trouver un bon indicateur de la qualité nutritionnelle d'une protéine. En effet, d'après nos résultats, le PD-CAAS, dont l'utilisation est actuellement recommandée par la FAO/OMS, mais controversée au sein de la communauté scientifique, ne semble pas l'indice le plus adéquat. En effet, nous avons mis en évidence plusieurs défauts le concernant, dont le principal est qu'il ne tient pas compte du niveau habituel d'apport protéique des sujets pour lesquels la protéine est évaluée, or ce paramètre conditionne l'utilisation métabolique d'une protéine

alimentaire. De plus, la mesure de la digestibilité fécale chez le rat, méthode préconisée pour le calcul du PD-CAAS, est différente de la digestibilité iléale chez l'homme. De surcroît, nos résultats contribuent à démontrer la nécessité de réévaluer les besoins en acides aminés, puisque nous avons mis en évidence que les pertes iléales contribuent de façon majeure aux pertes totales. Ces pertes sont jusqu'à présent négligées dans les nouvelles tentatives d'évaluation des besoins en AA proposées par Young et ses collaborateurs.

Ce travail ouvre plusieurs perspectives de recherche. Il faudrait tout d'abord mieux caractériser à beaucoup plus long terme les effets d'un régime HP sur la composition corporelle, et tout particulièrement sur la masse maigre, en étudiant par exemple les flux de synthèse et de dégradation du pool des protéines musculaires. D'autres études devront permettre de mieux comprendre la signification biologique de l'accumulation d'azote alimentaire dans le pool azoté musculaire non protéique. L'étude des conséquences du régime HP sur le métabolisme protéique en phase postabsorptive serait aussi intéressante.

Il serait aussi intéressant de réaliser le même type d'étude dans des conditions physiologiques particulières. Ainsi, une étude combinant régime HP et exercice permettrait l'obtention de nouvelles données sur le métabolisme musculaire. Nous pourrions aussi envisager l'étude de l'adaptation au régime HP chez la personne âgée ou chez le sujet cachexiant, situations dans lesquelles la masse maigre diminue.

D'autre part, les travaux de neurobiologie présentés dans cette thèse n'ont fait qu'effleurer l'effet d'un régime HP sur le métabolisme central des neuromédiateurs impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire. Il serait donc logique d'approfondir les résultats obtenus, à la fois sur les zones qui semblent répondre aux variations de l'apport protéique et aussi sur les réponses métaboliques des différents neuromédiateurs. Nous ne savons finalement pas encore précisément comment l'animal se rend compte du changement de teneur en protéines du régime qui lui est proposé, ni comment cela entraîne une modification de son comportement alimentaire, et notamment quels sont les signaux métaboliques impliqués.

**RÉFÉRENCES**

1. Abelow B. J., Holfords T. R. & Insogna K. L. (1992) Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture : a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* **50** : 14-18.
2. Adibi S. A. & Mercer D. W. (1973) Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal and plasma amino acid concentration after meal. *J. Clin. Invest.* **52** : 1586-1594.
3. Abumrad N. N., Rabin D., Wise K. L. & Lacy W. W. (1982) The disposal of an intravenously administered amino acid load across the human forearm. *Metabolism* **31** : 463-470.
4. Abumrad N. N., Williams P., Frexes-Steed M., Geer R., Flakoll P., Cersosimo E., Brown L. L., Melki I., Bulus N., Hourani H., Hubbard M. & Ghishan F. (1989) Inter-organ metabolism of amino acids *in vivo*. *Diabetes Metab. Rev.* **5** : 213-226.
5. American Dietetic Association (ADA) (2000) Position of the American Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine : Nutrition and athletic performance. *J. Am. Diet. Assoc.* **100** : 1543-1556.
6. Adegoke O. A. J., McBurney M. I. & Baracos V. E. (1999) Jejunal mucosal protein synthesis : validation of luminal flooding dose method and effect of luminal osmolarity. *Am. J. Physiol.* **276** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **39**) : G14-G20.
7. Adibi S. A. & Mercer D. W. (1973) Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal and plasma amino acid concentration after meals. *J. Clin. Invest.* **52** : 1586-1594.
8. Adolf T., Eberhardt W., Hesecker H., Hartmann S., Herwig A., Matiaske B., Moch K. J., Schneider R. & Kübler W. (1994) Lebensmittel- und Nährstoffaufnahme in der Bundesrepublik Deutschland. Ergänzungsband zum Ernährungsbericht 1992 (Consumption d'aliments et de nutriments en République Fédérale d'Allemagne. Supplément au Rapport Nutrition de 1992), Kübler W., Anders H. J. & Heeschen W. eds, Vol. 12, VERA-Schriftenreihe, Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck, Niederkleen, Allemagne.
9. Aichholz R. & Fischer P. (1989) Systematic investigation of enantiomer resolution of N-pivaloyl derivatized amino acid esters. *HRC and CC.* **12** : 213-217.
10. Ahn S. & Phillips A. G. (1999) Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *J. Neurosci.* **19** : RC29.
11. Almurshed K. S. & Grunewald K. K. (2000) Dietary protein does not affect overloaded skeletal muscle in rats. *J. Nutr.* **130** : 1743-1748.
12. Anderson H. L., Benevenga N. J. & Harper A. E. (1968) Associations among food and protein intake, serine dehydratase and plasma amino acids *Am. J. Physiol.* **214** : 1008-1013.
13. Anderson G. H. (1979) Control of protein and energy intake : role of plasma amino acids and brain neurotransmitters. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **57** : 1043-1057.
14. Anderson G. H. (1994) Regulation of food intake *in* Modern Nutrition in Health and Disease. Shils M. E., Olson J. A., Shike M. eds. Philadelphia, PA. USA.

15. Anthony J. C., Anthony T. G., Kimball S. R., Vary T. C. & Jefferson L. S. (2000) Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J. Nutr.* **130** : 139-145.
16. Anthony J. C., Anthony T. G., Kimball S. R. & Jefferson L. S. (2001) Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *J. Nutr.* **131** : 856S-860S.
17. Azpiroz F. (1994) Control of gastric emptying by gastric tone. *Dig. Dis. Sci.* **39** : 18S-19S.
18. Bach Knudsen K. E., Wisker E., Daniel M., Feldheim W. & Eggum B. O. (1994) Digestibility of energy, protein, fat and non-starch polysaccharides in mixed diets : comparative studies between man and the rat. *Br. J. Nutr.* **71** : 471-487.
19. Balage M., Sinaud S., Prod'homme M., Dardevat D., Vary T. C., Kimball S. R., Jefferson L. S. & Grizard J. (2001) Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E•eIF4G complex in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281** : E565-E574.
20. Ball R. O., Atkinson J. L. & Bayley H. S. (1986). Proline as an essential amino acid for the young pig. *Br. J. Nutr.* **55** : 659-668.
21. Bankir L. & Kriz W. (1995) Adaptation of the kidney to protein intake and to urine concentrating activity : similar consequences in health and CRF. *Kidney Int.* **47** : 7-24.
22. Barkeling B., Rossner S. & Bjorvell H. (1990) Effects of a high-protein meal (meat) and a high-carbohydrate meal (vegetarian) on satiety measured by automated computerized monitoring of subsequent food intake, motivation to eat and food preferences. *Int. J. Obes.* **14** : 743-751.
23. Beaufrère B. (1992) Contrôle nutritionnel à court terme de la synthèse et du catabolisme protéique. *Cah. Nutr. Diét.* **27** : 218-223.
24. Bennett W. M., Connacher A. A., Scrimgeour C. M. & Rennie M. J. (1990) The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[<sup>15</sup>N] phenylalanine and L-[1-<sup>13</sup>C] leucine exchange. *Eur. J. Clin. Invest.* **20** : 14-50.
25. Bensaïd A., Tomé D., L'Heureux-Bouron D., Even P.C., Gietzen D., Morens C., Gaudichon C., Fromentin G.. A high protein diet does not induce a conditioned food aversion in rats. FASEB 2002, New Orleans, USA.
26. Berridge K. C. (1996) Food reward : brain substrates of wanting and liking. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20** : 1-25.
27. Beverly J. L., Gietzen D. W. & Rogers Q. R. (1990) Effect of dietary limiting amino acid in prepyriform cortex on food intake. *Am. J. Physiol.* **259** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **28**): R709-R715.
28. Billington C. J., Briggs J. E., Grace M. & Levine A. S. (1991) Effects of intracerebro ventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol.* **260** : R321-R327.
29. Biolo G., Gastaldelli A., Zhang X. J. & Wolfe R. R. (1994) Protein synthesis and breakdown in skin and muscle : a leg model of amino acid kinetics. *Am. J. Physiol.* **267** : E467-E474.

30. Biolo G., Declan Fleming R. Y. & Wolfe R. R. (1995) Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **95** : 811-819.
31. Biolo G., Williams R. Y., Fleming R. Y. D. & Wolfe R. R. (1999) Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. *Diabetes* **48** : 949-957.
32. Blackburn J. R., Pfaus J. G. & Phillips A. G. (1992) Dopamine functions in appetitive and defensive behaviours. *Prog. Neurobio.* **39** : 242-279.
33. Blomstrand E. & Saltin B. (2001) BCAA intake affects protein metabolism in muscle after but not during exercise in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281** : E365-E374.
34. Bodwell C. E., Satterlee L. D. & Hackler L. R. (1980) Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymic digestion methods. *Am. J. Clin. Nutr.* **33** : 677-686.
35. Bohé J., Low J. F. A., Wolfe R. R. & Rennie M. J. (2001) Latency and duration of stimulation of human muscle protein synthesis during continuous infusion of amino acids. *J. Physiol.* **532.2** : 575-579.
36. Boirie Y., Dangin M., Gachon P., Vasson M. P., Maubois J. L. & Beaufrère B. (1997) Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 14930-14935.
37. Boosalis M. G., Gemayel N., Lee A., Bray G. A., Laine L. & Cohen H. (1992) Cholecystokinin and satiety : effect of hypothalamic obesity and gastric bubble insertion. *Am. J. Physiol.* **262** : R241-R244.
38. Booth D. A., Chase A. & Cambell A. T. (1970) Relative effectiveness of protein in the late stages of appetite suppression in man. *Physiol. Behav.* **5** : 1299-1302.
39. Bos C., Mahé S., Gaudichon C., Benamouzig R., Gausserès N., Luengo C., Ferrière F., Rautureau J. & Tomé D. (1999) Assessment of milk protein nutritional quality by net postprandial utilization of [<sup>15</sup>N]-labeled milk nitrogen in humans. *Br. J. Nutr.* **81** : 221-226.
40. Botbol V. & Scornik O. A. (1997) Measurement of muscle protein degradation in live mice by accumulation of bestatin-induced peptides. *Am. J. Physiol.* **273** (*Endocrinol. Metab.* **36**) : E1149-E1157.
41. Bouteloup-Demange C., Boirie Y., Déchelotte P., Gachon P. & Beaufrère B. (1998) Gut mucosal protein synthesis in fed and fasted humans. *Am. J. Physiol.* **274** (*Endocrinol. Metab.* **37**) : E541-E546.
42. Bozzetti F., Regalia E., Barbieri A., Facchetti G., Bombardieri E., Montalto F., Cozzaglio L. & Gennari L. (1993) Does portal nutrition benefit liver protein synthesis? *J. Parenter. Enteral Nutr.* **17** : 20-24.
43. Bradfield R. B. & Jourdan M. H. (1973) Relative importance of specific action in weight-reducing diets. *Lancet* **2** : 640-643.

44. Brändle E., Sieberth H. G. & Hautmann R. E. (1996) Effect of chronic dietary protein intake on the renal function in healthy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50** : 734-740.
45. Brannon P. M. (1990) Adaptation of the exocrine pancreas to diet. *Annuv. Rev. Nutr.* **10** : 85-105.
46. Bray G. A. & York D. A. (1979) Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* **59** : 719-809.
47. Bray G. A. (1992) Peptides affect the intake of specific nutrients and the sympathetic nervous system. *Am. J. Clin. Nutr.* **55** : 265S-271S.
48. Brosnan J. T. (1987) The 1986 Borden Award Lecture. The role of kidney in amino acids metabolism and nutrition. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65** : 2355-2362.
49. Brunetti L., Michelotto B., Orlando G. & Vacca M. (1999) Leptin inhibits norepinephrine and dopamine release from rat hypothalamic neuronal endings. *Eur. J. Pharmacol.* **372** : 237-240.
50. Burn-Murdoch R. A., Fisher M. A. & Hunt J. N. (1978) The slowing of gastric emptying by proteins in test meals. *J. Physiol.* **274** : 477-485.
51. Burvin R., Zloczower M. & Karnieli E. (1998) Double-vein jugular/inferior vena cava clamp technique for long-term in vivo studies in rats. *Physiol. Behav.* **15**: 511-515.
52. Buse M. G. & Reid S. S. (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J. Clin. Invest.* **56** : 1250-1261.
53. Calloway D. H. & Margen S. (1971) Variation in endogenous nitrogen excretion nitrogen excretion and dietary nitrogen utilization as determinants of human protein requirements. *J. Nutr.* **101** : 205-216.
54. Cayol M., Boirie Y., Prugnaud J., Gachon P., Beaufrère B. & Obled C. (1996) Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans : effects of tracer route infusion and dietary proteins. *Am. J. Physiol.* **270** (*Endocrinol. Metab.* **33**) : E980-E987.
55. Cherel Y., Attaix D., Rosolowska-Huszcz D., Arnal M. & Le Maho Y. (1991a) Brief fasting decreases protein synthesis in the brain of adult rats. *Neurochem. Res.* **16** : 843-847.
56. Cherel Y., Attaix D., Rosolowska-Huszcz D., Belkhou R., Robin J. P., Arnal M. & Le Maho Y. (1991b) Whole-body and tissue protein synthesis during brief and prolonged fasting in the rat. *Clin. Sci. (Colch.)* **81** : 611-619.
57. Chow W. H., Gridley G., McLaughlin J. K., Mandel J. S., Wacholder S., Blot W. J., Niwa S. & Fraumeni J. F. Jr. (1994) Protein intake and risk of renal cell cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **86** : 1131-1139.
58. Clague M. B., Keir M. J., Wright P. D. & Johnston I. D. (1983) The effects of nutrition and trauma on whole-body protein metabolism in man. *Clin. Sci. (Colch)* **65** : 165-175.
59. Clemens M. J. (1994) Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *Mol. Biol. Rep.* **19** : 201-210.
60. Clugston G. A. & Garlick P. J. (1982) The response of protein and energy metabolism to food intake in lean and obese man. *Hum. Nutr. Clin. Nutr.* **36C** : 57-70.

61. Colombo J. P., Cervantes H., Kokorovic M., Pfister U. & Perritaz R. (1992) Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. *Ann. Nutr. Metab.* **36** : 23-33.
62. Cortiella J., Matthews D. E., Hoerr R. A., Bier D. M. & young V. R. (1988) Leucine kinetics at graded leucine intakes in young men : quantitative fate of dietary leucine. *Am. J. Clin. Nutr.* **48** : 998-1009.
63. Crovetti R., Porrini M., Santangelo A. & Testolin G. (1998) The influence of thermic effect of food on satiety. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52** : 482-488.
64. Cubero I., Lopez M., Navarro M. & Puerto A. (2001) Lateral parabrachial lesions impair taste aversion learning induced by blood-borne visceral stimuli. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **69** : 157-163.
65. Czarnecki S. K. & Kritchevsky D. (1993) Dietary protein and atherosclerosis. *In* : Dietary protein : How they alleviate disease and promote better health. Eds. Liepa G. U., Beitz D. C., Beynen A. C. & Gorman M. A. Chapter 5 : pp 42-55.
66. Daenzer M., Petzke K. J., Bequette B. J. & Metges C. C. (2001) Whole-body nitrogen and splanchnic metabolism differ in rats fed mixed diets containing casein or its corresponding amino acid mixture. *J. Nutr.* **131** : 1965-1972.
67. Dangin M., Boirie Y., Garcia-Rodenas C., Gachon P., Fauquant J., Callier P., Ballèvre O. & Beaufrère B. (2001) The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280** : E340-E348.
68. Daniel H., Vohwinkel M. & Rehner G. (1990) Effect of casein and  $\beta$ -casomorphins on gastrointestinal motility in rats. *J. Nutr.* **120** : 252-257.
69. Darragh A. J. & Hodgkinson S. M. (2000) Quantifying the digestibility of dietary protein. *J. Nutr.* **130** : 1850S-1856S.
70. Dardevet D., Sornet C., Balage M. & Grizard J. (2000) Stimulation of *in vitro* rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J. Nutr.* **130** : 2630-2635.
71. Davidson J. S. & Clarke G. D. (1988) Mechanical properties and sensitivity to CCK of vagal gastric slowly adapting mechanoreceptors. *Am. J. Physiol.* **255** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **18**) : G55-G61.
72. De Feo P., Fritz F. & Haymond M. W. (1992) Meal stimulation of albumin synthesis : a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. *Am. J. Physiol.* **263** : E794-E799.
73. Department of Health and Social Security (1979) *Recommended Daily Amounts of Food Energy and Nutrients for Groups of People in the UK. Report on Health and Social Subjects.* n°15. Londres: H. M. Stationery Office.
74. De Stephani E., Ronco A., Mendilaharsu M., Denea-Pellegrini H. (1999) Diet and risk of cancer of the upper aerodigestive tract – II. Nutrients. *Oral. Oncol.* **35** : 22-26.



75. Deutz N. E. P., Bruins M. J. & Soeters P. B. (1998) Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *J. Nutr.* **128** : 2435-2445.
76. Deutz N. E. P., Wagenmakers A. J. M. & Soeters P. B. (1999) Discrepancy between muscle and whole body protein turnover. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2** : 29-32.
77. Divino Filho J.C., Hazel S. J., Anderstam B., Bergström J., Lewitt M. & Hall K. (1999) Effect of protein intake on plasma and erythrocyte free amino acids and serum IGF-1 and IGFBP-1 levels in rats. *Am. J. Physiol.* **277** (*Endocrinol. Metab.* **40**) : E693-E701.
78. Dunger A., Berg S., Klötting I. & Schmidt S. (1997) Functional alterations in the rat kidney induced either by diabetes or high protein diet. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **105** : 48-50.
79. Durnin J. V., Garlick P., Jackson A. A., Schurch B., Shetty P. S. & Waterlow J. C. (1999) Report of the IDECG Working Group on lower limits of energy and protein and upper limits of protein intakes. *Eur. J. Clin. Nutr.* **53** : S174-S176.
80. Eastwood M. (1997) Principles of human nutrition. Chapman & Hall eds. London, UK.
81. Eisenstein R. S. & Harper A. E. (1991) Relationship between protein intake and hepatic protein synthesis in rats. *J. Nutr.* **121** : 1581-1890.
82. el-Khoury A. E., Fukagawa N. K., Sanchez M., Tsay R. H., Gleason R. E., Chapman T.E. & Young VR. (1994) The 24-h pattern and rate of leucine oxidation, with particular reference to tracer estimates of leucine requirements in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **59** : 1012-1020.
83. Erickson R. H., Gum J. R., Lindstrom M. M., McKean D. & Kim Y. S. (1995) Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216** : 249-257.
84. Ewart H. S., Jois M. & Brosnan J. T. (1992) Rapid stimulation of the hepatic glycine-cleavage system in rats fed on a single high-protein meal. *Biochem. J.* **283** : 441-447.
85. Ewart H. S. & Brosnan J. T. (1993) Rapid activation of hepatic glutaminase in rats fed on a single high-protein meal. *Biochem. J.* **293** : 339-344.
86. Fournoux P., Rémésy C. & Démigné C. (1990) Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. *Am. J. Physiol.* **259** (*Endocrinol. Metab.* **22**) : E614-E625.
87. Fagan T. C. & Oexmann M. J. (1987) Effects of high protein, high carbohydrate, and high fat diets on laboratory parameters. *J. Am. Coll. Nutr.* **6** : 333-343.
88. Fajans S. S., Floyd J. C. Jr, Knopf R. F. & Conn F. W. (1967) Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man. *Recent Prog. Horm. Res.* **23** : 617-662.
89. Fernström J. D. & Faller D. V. (1978) Neutral amino acids in the brain : changes in response to food ingestion. *J. Neurochem.* **30** : 1531-1538.
90. Fernström J. D., Fernström M. H., Grubb P. E. & Volk E. A. (1985) Absence of chronic effects of dietary protein content on brain tryptophan concentrations in rats. *J. Nutr.* **115** : 1337-1344.
91. Ferraris R. P., Diamond J. & Kwan W. W. (1988) Dietary regulation of intestinal transport of the dipeptide carnosine. *Am. J. Physiol.* **255** : G143-G150.

92. Feskanich D., Willet W. C., Stampfer M. J. & Colditz G. A. (1996) Protein consumption and bone fractures in women. *Am. J. Epidemiol.* **143** : 472-479.
93. Floyd J. C. Jr., Fajans S. S., Conn J. W. & Rull J. (1966) Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J. Clin. Sci.* **45** : 1487-1502.
94. Food and Agriculture Organization / World Health Organization (1973) Energy and protein requirements: report of a joint FAO-WHO ad hoc expert committee. Rome, 22 March - 2 April 1971. *WHO Tech. Rep. Ser.*, **522** : 1-118.
95. Food and Agriculture Organization / World Health Organization / United Nation University (1985). *Energy and Protein Requirements. WHO Tech. Rep. Ser.*, n°724. Genève : WHO.
96. Food and Agriculture Organization / World Health Organization / United Nation University (1990). *Protein Quality Evaluation*. Food and Agricultural organization of the United Nations, FAO Food and Nutrition Paper 51, Rome.
97. Forbes J. M. (2001) Consequences of feeding for future feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **128** : 463-470.
98. Forslund A.H., Hambraeus L., Olsson R. M., El-Khoury A. E., Yu Y. & Young V. R. (1998) The 24-h whole body leucine and urea kinetics at normal and high protein intakes with exercise in healthy adults. *Am. J. Physiol.* **275** : E310-E320.
99. Forslund A. H., Hambraeus L., Van Beurden H., Holmbäck U., El-Khoury A. E., Hjorth G., Stridsberg M., Wide L., Akerfeldt T., Regan M. & Young V. R. (2000) Inverse relationship between protein intake and plasma free amino acids in healthy men at physical exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **278** : E857-E867.
100. Forsum E., Goranzon H., Rundgren M., Thilen M. & Hambraeus L. (1981) Protein evaluation of mixed diets. Comparative study in man and in pig and rat of vegetable-animal and vegetable protein diets. *Ann. Nutr. Metab.* **25** : 137-150.
101. Fouillet H., Gaudichon C., Mariotti F., Bos C., Huneau J. F. & Tomé D. (2001) Energy nutrients modulate the splanchnic sequestration of dietary nitrogen in humans : a compartmental analysis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281** : E248-E260.
102. Fouillet H., Mariotti F., Gaudichon C., Bos C. & Tomé D. (2002) Peripheral and splanchnic metabolism of dietary nitrogen are differently affected by the protein source in humans as assessed by compartmental modeling. *J. Nutr.* **132** : 125-133.
103. Frassetto L. A., Todd K. M., Morris R. C. Jr & Sebastian A. (1998) Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein contents. *Am. J. Clin. Nutr.* **68** : 576-583.
104. French S. J. (1999) The effects of specific nutrients on the regulation of feeding behaviour in human subjects. *Proc. Nutr. Soc.* **58** : 553-540.
105. Fryburg D. A., Jahn L. A., Hill S. A., Oliveras D. M. & Barrett E. J. (1995) Insulin and insulin-like growth factor-1 enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. *J. Clin. Invest.* **96** : 1722-1729.

106. Fuller M. F. & Garlick P. J. (1994) Human amino acid requirements : can the controversy be resolved? *Annu. Rev. Nutr.* **14** : 217-241.
107. Fuller M. F., Milne A., Harris C. I., Reid T. M. & Keenan R. (1994) Amino acid losses in ileostomy fluid on a protein-free diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **59** : 70-73.
108. Gannon M. C. & Nuttall F. Q. (1995) Physiological doses of oral casein affect hepatic glycogen metabolism in normal food-deprived rats. *J. Nutr.* **125** : 1159-1166.
109. Garlick P. J., Millward D. J. & James W. P. T. (1973) The diurnal response of muscle and liver protein synthesis *in vivo* in meal-fed rats. *Biochem. J.* **136** : 935-945.
110. Garlick P. J. (1986) Protein synthesis and energy expenditure in relation to feeding. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **56** : 197-200.
111. Garlick P. J., McNurlan M. A. & Patlak C. S. (1999) Adaptation of protein metabolism in relation to limits to high dietary protein intake. *Eur. J. Clin. Nutr.* **53** : S34-S43.
112. Garrow J. S. & Hawes S. F. (1972) The role of amino acid oxidation in causing specific dynamic action in man. *Br. J. Nutr.* **27** : 211-219.
113. Garrow J. S. (1985) The contribution of protein synthesis to thermogenesis in man. *Int. J. Obes.* **9 (suppl 2)** : 97-101.
114. Gaudichon C., Mahé S., Roos N., Benamouzig R., Luengo C., Huneau J. F., Sick H., Bouley C., Rautureau J. & Tomé D. (1995) Exogenous and endogenous nitrogen flow rates and level of protein hydrolysis in the human jejunum after [<sup>15</sup>N]-milk and [<sup>15</sup>N]-yoghurt ingestion. *Br. J. Nutr.* **74**, 251-260.
115. Gaudichon C., Mahé S., Luengo C., Laurent C., Meaugeais P., Krempf M. & Tomé D. (1996) A <sup>15</sup>N-Leucine-dilution method to measure endogenous contribution to luminal nitrogen in the human upper jejunum. *Eur. J. Clin. Nutr.* **50** : 261-268.
116. Gaudichon C., Mahé S., Benamouzig R., Luengo C., Fouillet H., Daré S., van Oycke M., Ferrière F., Rautureau J. & Tomé D. (1999) Net postprandial utilization of [<sup>15</sup>N]-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *J. Nutr.* **129** : 890-895.
117. Gausserès N., Mahé S., Benamouzig R., Luengo C., Drouet H., Rautureau J. & Tomé D. (1996) The gastro-ileal digestion of <sup>15</sup>N-labeled pea nitrogen in adult humans. *Br. J. Nutr.* **76** : 75-85.
118. Gelfand R. A. & Barrett E. J. (1987) Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J. Clin. Invest.* **80** : 1-6.
119. Gibbs J. & Smith G. P. (1988) Peptides of digestive system and brain. Model of the cholecystokinin. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **49** : 113-120.
120. Gillard E.R., Dang D.Q. & Stanley B.G. (1993) Evidence that neuropeptide Y and dopamine in the perifornical hypothalamus interact antagonistically in the control of food intake. *Brain. Res.* **628** : 128-36
121. Giordano C., dePascale C., Balestrieri C., Cittadini D. & Grescenzi A. (1968) Incorporation of urea <sup>15</sup>N in amino acids of patients with chronic renal failure on low nitrogen diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **21** : 394-404.

122. Giza B. K. & Scott T. R. (1987) Intravenous insulin infusions in rats decrease gustatory-evoked responses to sugars. *Am. J. Physiol.* **252** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **21**) : R994-R1002.
123. Glaeser B. S., Maher T. J. & Wurtman R. J. (1983) Changes in brain levels of acidic, basic and neutral amino acids after consumption of single meals containing various proportions of protein. *J. Neurochem.* **41** : 1016-1021.
124. Glanville N. T. & Anderson G. H. (1984) The effect of insulin deficiency, dietary protein intake, and plasma amino acid concentrations on brain amino acid levels in the rat. *Can. J. Pharmacol.* **63** : 487-494.
125. Godfrey K. M. & Barker D. J. (2000) Fetal nutrition and adult disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71** : 1344S-1352S.
126. Goldberg A. L. & Chang T. W. (1978) Regulation and significance of amino acid metabolism in skeletal muscle. *Fed. Proc.* **37** : 2301-2307.
127. Greiwe J. S., Kwon G., McDaniel M. L. & Semenkovich C. F. (2001) Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281** : E466-E471.
128. Groff J. L., Gropper S. S. & Hunt S. M. (1995) *Advanced nutrition & Human metabolism*, 2<sup>nd</sup> edition. West Publishing Company, St Paul, MN, USA.
129. Hamamura M., Leng G., Emson P. C. & Kiyama H. (1991) Electrical activation and c-Fos mRNA expression in rat neurosecretory neurones after systemic administration of cholecystokinin. *J. Physiol.* **444** : 51-63.
130. Hamon M. (1995) *Sérotonine, 5-hydroxytryptamine (5-HT) in Neuropeptides & Neuromédiateurs* (2<sup>ème</sup> édition). Sandoz eds. Paris. France.
131. Hara H., Nishikawa H. & Kiriya S. (1992) Different effects of casein and soybean protein on gastric emptying and small intestine transit after spontaneous feeding of diets in rats. *Br. J. Nutr.* **68** : 59-66.
132. Hara H., Narakino H., Kiriya S. & Kasai T. (1995) Induction of pancreatic growth and proteases by feeding a high amino acid diet does not depend on cholecystokinin in rats. *J. Nutr.* **125** : 1143-1149.
133. Hara H., Ohyama S. & Hira T. (2000) Luminal dietary protein, not amino acids, induces pancreatic protease via CCK in pancreaticobiliary-diverted rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **278** : G937-G945.
134. Harper A. E. (1965) Effect of variations in protein intake on enzymes of amino acid metabolism. *Can. J. Biochem.* **43** : 1589-1603.
135. Harper A. E., Benevenga N. J., Wohlhueter R. M. (1970) Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* **50** : 428-558.
136. Harper A. E., Miller R. H. & Miller K. P. (1984) Branched-chain amino acid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.* **4** : 409-454.

137. Haut Comité de Santé Publique (2000) Rapport "Pour une politique nutritionnelle de santé publique : enjeux et recommandations". <http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/nutri2000>.
138. Häussinger D. (1990) Nitrogen metabolism in liver : structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.* **267** : 281-290.
139. Hayase K., Koie M. & Yokogoshi H. (1998) The quantity of dietary protein affects brain protein synthesis rate in aged rats. *J. Nutr.* **128** : 1533-1536.
140. Heaney R. P. (1998) Excess dietary protein may not adversely affect bone. *J. Nutr.* **128** : 1054-1057.
141. Heys S. D., Park K. G., McNurlan M. A., Keenan R. A., Miller J. D. & Garlick P. J. (1992) Protein synthesis rates in colon and liver : stimulation by gastrointestinal pathologies. *Gut* **33** : 976-981.
142. Hill A. J. & Blundell J. E. (1986) Macronutrients and satiety : the effects of a high protein or high carbohydrate meal on subjective motivation to eat and food preferences. *Nutr. Behav.* **3** : 133-144.
143. Hoebel B. G., Hernandez L., Schwartz D. H., Mark G. P. & Hunter G. A. (1989) Microdialysis studies and brain norepinephrine, serotonin, and dopamine release during ingestive behavior. *Ann. NY Acad. Sci.* **575** : 171-191.
144. Hoerr R. A., Matthews D. E., Bier D. M. & Young V. R. (1993) Effects of protein restriction and acute refeeding on leucine and lysine kinetics in young men. *Am. J. Physiol.* **264** : E567-E575.
145. Hoffer L. J., Yang R. D., Matthews D. E., Bistrian B. R., Bier D. M. & Young V. R. (1985) Effects of meal consumption on whole body leucine and alanine kinetics in young adult men. *Br. J. Nutr.* **53** : 31-38.
146. Holmes R.P., Goodman H. O., Hart L. J. & Assimos D. G. (1993) Relationship of protein intake to urinary oxalate and glycolate excretion. *Kidney Int.* **44** : 366-372.
147. Horn C. C., Addis A. & Friedman M. I. (1999) Neural substrate for an integrated metabolic control of feeding behavior. *Am. J. Physiol.* **276** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **45**) : R113-R119.
148. Hoogeveen E. K., Kostense P. J., Jager A., Heine R. J., Jakobs C., Bouter L. M., Donker A. J. & Stehouwer C. D. (1998) Serum homocysteine level and protein intake are related to risk of micro albuminuria : the Hoorn Study. *Kidney Int.* **54** : 203-209.
149. Hu F. B., Stampfer M. J., Manson J. E., Rimm E., Colditz G. A., Speizer F. E., Hennekens C. H. & Willett W. C. (1999) Dietary protein and risk of ischemic heart disease in women. *Am. J. Clin. Nutr.* **70** : 221-227.
150. Hunt J. N. & Stubbs D. F. (1975) The volume and energy contents of meals as determinants of gastric emptying. *J. Physiol.* **245** : 209-225.
151. Hyde T. M. & Miselis R. R. (1983) Effects of area postrema/caudal medial nucleus of solitary tract lesions on food intake and body weight. *Am. J. Physiol.* **244** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **13**) : R577-587.
152. Jackson A. A. (1999) Limits of adaptation to high dietary protein intakes. *Eur. J. Clin. Nutr.* **53** : S44-S52.

153. Jackson A. A. (2001) Human protein requirement : policy issues. *Proc. Nutr. Soc.* **60** : 7-11.
154. Jean C. (2001) Capacités d'adaptation comportementale et métabolique à un régime hyperprotéique chez le rat. Thèse de doctorat INA-PG.
155. Jean C., Rome S., Mathé V., Huneau J. F., Aattouri Najat, Fromentin G., Larue-Achagiotis C. & Tomé D. (2001) Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr.* **131** : 91-98.
156. Jeanningros R. (1982) Vagal unitary responses to intestinal amino acid infusions in the anesthetized cat : a putative signal for protein induced satiety. *Physiol. Behav.* **28** : 9-21.
157. Jian R., Ruskone A., Filali A., Ducrot F., Rain J. D. & Bernier J. J. (1986) Effet de l'augmentation de la charge calorique d'un repas sur la vidange gastrique de ses phases solide et liquide. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **10** : 831-836.
158. Johnson D. J., Li E. T., Coscina D. V. & Anderson G. H. (1979) Different diurnal rhythms of protein and non protein energy intake in rats. *Physiol. Behav.* **22** : 777-780.
159. Jungermann K. & Kietzmann T. (1996) Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu. Rev. Nutr.* **16** : 179-203.
160. Karasov W. H., Solberg D. H. & Diamond J. M. (1987) Dependence of intestinal amino acid uptake on dietary protein or amino acid levels. *Am. J. Physiol.* **252** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **15**) : G614-G625.
161. Kashyap S. & Heird W. C. (1994) Protein requirement of low birth weight, very low birth weight, and small for gestational age infants. *In* : Protein metabolism during infancy. Rähä NCR. Workshop series, **33**, Nestec Ltd, Vevey Raven Press, NY, USA.
162. Kenney N. J., Tomoyasu N. & Burkhardt M. J. (1994) Food aversion induced by area postrema ablation. *Appetite* **22** : 205-220.
163. Kerstetter J. E., Mitnick M. E., Gundberg C. M., Caseria D. M., Ellison A. F., Carpenter T. O. & Insogna K. L. (1999) Changes in bone turnover in young women consuming different levels of dietary protein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84** : 1052-1055.
164. Khan M. A., Gannon M. C. & Nuttall F. Q. (1992) Glucose appearance rate following protein ingestion in normal subjects. *J. Am. Coll. Nutr.* **11** : 701-706.
165. Klahr S., Levey A. S., Beck G. J., Caggiula A. W., Hunsicker L., Kusek J. W. & Striker G. (1994) The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. *N. Eng. J. Med.* **330** : 877-884.
166. Krezowski P. A., Nuttall F. Q., Gannon M. C. & Bartosh N. H. (1986) The effect of protein ingestion on the metabolic response to oral glucose in normal individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* **44** : 847-856.
167. Lacroix M. (2001a) Modifications des paramètres anatomiques, histologiques, métaboliques et biochimiques chez des rats pubères soumis pendant 6 mois à un régime hyperprotéique. Rapport de DEA.

168. Lacroix M., Morens C., Gaudichon C., Huneau J. F., Larue-Achagiotis C. & Tomé D. (2001b) La consommation d'un régime hyperprotéique chez le rat entraîne à long terme une réduction de la masse adipeuse. Poster. AFERO/AFN/SNDLF, Paris.
169. Lajtha A., Dunlop D., Patlak C. & Toth J. (1979) Compartments of protein metabolism in the developing brain. *Biochem. Biophys. Acta* **561** : 491-501.
170. Laurent B. C., Moldawer L. L., Young V. R., Bistran B. R. & Blackburn G. L. (1984) Whole-body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *Am. J. Physiol.* **246** (*Endocrinol. Metab.* **9**) : E444-E451.
171. Lavoigne A., Baquet A. & Hue L. (1987) Stimulation of glycogen synthesis and lipogenesis by glutamine in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **248** : 429-437.
172. Lazaris-Brunner G., Rafii M., Ball R. O. & Pencharz P. B. (1998) Tryptophan requirement in young adult women as determined by indicator amino acid oxidation with L-[<sup>13</sup>C]phenylalanine. *Am. J. Clin. Nutr.* **68** : 303-310.
173. Lecavalier L., De Feo P. & Haymond M. W. (1991) Isolated hypoisoleucinemia impairs whole body but not hepatic protein synthesis in humans. *Am. J. Physiol.* **261** : E578-E586.
174. Leung P. M. B., Gietzen D.W. & Rogers Q. R. (1986) Effect of area postrema (AP) lesions on food intake responses of rats fed disproportionate amounts of dietary amino acids (abstract). *Federation Proc.* **45** : 1091.
175. Li E. T. S. & Anderson G. H. (1982) Meal composition influences subsequent food selection in the young rat. *Physiol. Behav.* **29** : 779-783.
176. Li E. T. S. & Anderson G. H. (1983) Amino acids and the regulation of food intake. *Nutrition Abstracts and Reviews in Clinical Nutrition* **53** : 169-181.
177. Li E. T. S. & Anderson G. H. (1984) A role for vagus nerve in regulation of protein and carbohydrate intake. *Am. J. Physiol.* **247** (*Endocrinol. Metab.* **10**) : E815-E821.
178. Lin H. C., Doty J. E., Reedy T. J. & Meyer J. H. (1989) Inhibition of gastric emptying by glucose depends on length of intestine. *Am. J. Physiol.* **256** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **19**) : G404-G412.
179. Lin H. C., Doty J. E., Reedy T. J. & Meyer J. H. (1990) Inhibition of gastric emptying by sodium oleate depends on length of intestine exposed to nutrient. *Am. J. Physiol.* **259** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **22**) : G1031-G1036.
180. 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.
181. Linn T., Santosa B., Grönemeyer D., Aygen S., Scholz N., Busch M. & Bretzel R. G. (2000) Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. *Diabetologia* **43** : 1257-1265.
182. van Loon L. J. C., Saris W. H. M., Verhagen H. & Wagenmakers A. J. M. (2000) Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *Am. J. Clin. Nutr.* **72** : 96-105.

183. Louard R. J., Barrett E. J. & Gelfand R. A. (1990) Effect of infused branched-chain amino acids on muscle and whole-body amino acid metabolism in man. *Clin. Sci. (Colch.)* **79** : 457-466.
184. Luhman C. M. & Beitz D. C. (1993) Dietary protein and blood cholesterol homeostasis. Dietary protein : How they alleviate disease and promote better health. Liepa G. U., Beitz D. C., Beynen A. C. & Gorman M. A. eds. Chapter 6 : pp 57-76.
185. Luo S. Q. & Li E. T. (1990) Food intake and selection pattern of rats treated with dexfenfluramine, fluoxetine and RU 24969. *Brain Res. Bull.* **24** : 729-733.
186. Luo S. Q., Ransom T. & Li E. T. (1990) Selective increase in carbohydrate intake by rats treated with 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetraline or buspirone. *Life Sci.* **46**: 1643-1648.
187. McArthur L. H., Kelly W. F., Gietzen D. W. & Rogers Q. R. (1993) The role of palatability in the food intake response of rats fed high-protein diets. *Appetite* **20** : 181-186.
188. McCarthy D. M., Nicholson J. A. & Kim Y. S. (1980) Intestinal enzyme adaptation to normal diets of different composition. *Am. J. Physiol.* **239** : G445-G451.
189. McNurlan M. A. & Garlick P. J. (1989) Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetes Metab. Rev.* **5** : 165-189.
190. McNurlan M. A., Essen P., Milne E., Vinnars E., Garlick P. J. & Wernerman J. (1993) Temporal responses of protein synthesis in human skeletal muscle to feeding. *Br. J. Nutr.* **69** : 117-126.
191. Makkink C. A., Berntsen P. J., op den Kamp B. M., Kemp B. & Verstegen M. W. (1994) Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein source in newly weaned pigs. *J. Anim. Sci.* **72** : 2843-2850.
192. Marchini J. S., Nguyen P., Deschamps J.-Y., Maugère P., Krempf M. & Darmaun D. (1999) Effect of intravenous glutamine on duodenal mucosa protein synthesis in healthy growing dogs. *Am. J. Physiol.* **276** (*Endocrinol. Metab.* **39**) : E747-E753.
193. Mariotti F., Mahé S., Benamouzig R., Luengo C., Daré S., Gaudichon C. & Tomé D. (1999) Nutritional value of [15N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. *J. Nutr.* **129** : 1992-1197.
194. Maroni B. J. & Mitch W. E. (1997) Role of nutrition in prevention of the progression of renal disease. *Annu. Rev. Nutr.* **17** : 435-455.
195. Martel P. & Fantino M. (1996) Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward : a microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **53** : 221-226.
196. Masanès R., Fernandez-Lopez J. A., Alemany M., Remesar X. & Rafecas I. (1999) Effect of dietary protein content on tissue protein synthesis rates in Zucker lean rats. *Nutr. Res.* **19** : 1017-1026.
197. Mathé V. (1998) Effets d'un régime hyperprotéique sur le comportement alimentaire, et sur le transport et le métabolisme des acides aminés dans la zone splanchnique chez le rat. Mémoire d'Ingénieur CNAM.
198. Matthews D. E. & Campbell R. G. (1992) The effect of dietary protein intake on glutamine and glutamate nitrogen metabolism in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **55** : 963-970.



199. Matthews D. E., Marano M. A. & Campbell R. G. (1993) Splanchnic bed utilization of leucine and phenylalanine in humans. *Am. J. Physiol.* **264** : E109-E118.
200. Meek S. E., Persson M., Ford G. C. & Nair K. S. (1998) Differential regulation of amino acid exchange and protein dynamics across splanchnic and skeletal muscle beds by insulin in healthy human subjects. *Diabetes* **47** : 1824-1835.
201. Meguid M. M., Yang Z. J. & Laviano A. (1997) Meal size and number : relationship to dopamine levels in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Am. J. Physiol.* **272** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **41**) : R1925-R1930.
202. Meguid M. M., Fetissov S. O., Varma M., Sato T., Zhang L., Laviano A. & Rossi-Fanelli F. (2000) Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* **16** : 843-857.
203. Mei N. (1992) Intestinal chemosensitivity. In : *Advances in the Innervation of the Gastrointestinal Tract*, edited by G. E. Holle and J. D. Wood. Amsterdam, The Netherlands : Elsevier, p 273-281.
204. Mellinkoff S. M., Frankland M., Boyle D. & Greipel M. (1956) Relationship between serum amino acid concentration and fluctuation in appetite. *J. Appl. Physiol.* **8** : 535-538.
205. Melville S., McNurlan M. A., Calder A. G. & Garlick P. J. (1990) Increased protein turnover despite normal energy metabolism and responses to feeding in patients with lung cancer. *Cancer Res.* **50** : 1125-1131.
206. Mercer J. G. & Speakman J. R. (2001) Hypothalamic neuropeptide mechanisms for regulating energy balance : from rodent models to human obesity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **25** : 101-116.
207. Metges C. C., Petzke K. J. & Hennig U. (1996) Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric combustion of N-acetyl- and N-pivaloyl amino acid esters to measure <sup>15</sup>N isotopic abundances in physiological samples : a pilot study on amino acid synthesis in the upper gastrointestinal tract of minipigs. *J. Mass Spectrom.* **31** : 215-225.
208. Metges C. C., Daenzer M., Bequette B. J. & Petzke K. J. (1999a) Splanchnic utilization of protein bound and free leucine and lysine. *Faseb J.* **13** : A566, abstract 447.6.
209. Metges C. C., Petzke K. J., El-Khoury A. E., Henneman L., Grant I., Bedri S., Regan M. M., Fuller M. F. & Young V. R. (1999b) Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *Am. J. Clin. Nutr.* **70** : 1046-1058.
210. Metges C. C., El-Khoury A. E., Henneman L., Petzke K. J., Grant I., Bedri S., Pereira P., Ajami A. M., Fuller M. F. & Young V. R. (1999c) Availability of intestinal microbial lysine to lysine homeostasis in human subjects. *Am. J. Physiol.* **277** : E597-E607.
211. Metges C. C. & Barth C. A. (2000) Metabolic consequences of a high dietary-protein intake in adulthood : assessment of the available evidence. *J. Nutr.* **130** : 886-889.
212. Miller L. J., Malagelada J. R., Taylor W. F. & Go V. L. W. (1981) Intestinal control of human postprandial gastric function. The role of components of jejunoileal chyme in regulating gastric secretion and gastric emptying. *Gastroenterology* **80** : 763-769.

213. Millward D. J. (1995) A protein-stat mechanism for the regulation of growth and maintenance of the lean-body mass. *Nut. Res. Rev.* **8** : 93-120.
214. Millward D. J., Fereday A., Gibson N. R. & Pacy P. J. (1996) Post-prandial protein metabolism. *Baillière's Clin. Endocrinol. Metab.* **10** : 533-549.
215. Millward D. J. (1997) Human amino acids requirements. *J. Nutr.* **127** : 1842-1846.
216. Millward D. J. (1999) Optimal intakes of protein in the human diet. *Proc. Nutr. Soc.* **58** : 403-413.
217. Millward D. J., Fereday A., Gibson N. R. & Pacy P. J. (2000) Human adult amino acid requirements : [1-<sup>13</sup>C]leucine balance evaluation of the efficiency of utilization and apparent requirements for wheat protein and lysine compared with those for milk protein in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **72** : 112-121.
218. Millward D. J. (2001) Methodological considerations. *Proc. Nutr. Soc.* **60** : 3-5.
219. Montagne L., Toullec R., Savidge T. & Lalles J. P. (1999) Morphology and enzyme activities of the small intestine are modulated by dietary protein source in the preruminant calf. *Reprod. Nutr. Dev.* **39** : 455-466.
220. Montellano M. A., Urbano G. & Varela G. (1983) Proteic-anabolic capacity in rats – influence of the quality and quantity of dietary protein. *Nahrung* **27** : 909-916.
221. Moran B. J. & Jackson A. A. (1990) Metabolism of <sup>15</sup>N-labeled urea in the functioning and defunctioned human colon. *Clin. Sci.* **79** : 253-258.
222. Motil K. J., Bier D. M., Matthews D. E., Burke J. F. & Young V. R. (1981a) Whole body leucine and lysine metabolism studied with [1-<sup>13</sup>C]leucine and [ $\alpha$ -<sup>15</sup>N]lysine : response in healthy young men given excess energy intake. *Metabolism* **30** : 783-791.
223. Motil K. J., Matthews D. E., Bier D. M., Burke J. F., Munro H. N. & Young V. R. (1981b) Whole-body leucine and lysine metabolism : response to dietary protein intake in young men. *Am. J. Physiol.* **240** : E712-E721.
224. Moundras C., Rémésy C. & Demigné C. (1993) Dietary protein paradox : decrease of amino acid availability induced by high protein diets. *Am. J. Physiol.* **264** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **27**) : G1057-G1065.
225. Munger R. G., Cerhan J. R. & Chiu B. C. H. (1999) Prospective study of dietary protein intake and risk of hip fracture in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **69** : 147-152.
226. Munro H. N. & Crim M. C. (1988). The proteins and amino acids *in* Modern nutrition in health and disease. Shils M. E. and Young V. R. (ed.). pp 1-37. Lea and Febiger. Philadelphia. USA.
227. Musten B., Peace D. & Anderson G. H. (1974) Food intake regulation in the weanling rat : self-selection of protein and energy. *J. Nutr.* **104** : 563-572.
228. Nair K. S., Schwartz R. G. & Welle S. (1992) Leucine as a regulator of whole body and skeletal muscle protein metabolism in humans. *Am. J. Physiol.* **263** (*Endocrinol. Metab.* **26**) : E928-E934.

229. Nakshabendi I. M., Obeidat W., Russell R. I., Downie S., Smith K. & Rennie M. J. (1995) Gut mucosal protein synthesis measured using intravenous and intragastric delivery of stable tracer amino acids. *Am. J. Physiol.* **269** (*Endocrinol. Metab.* **32**) : E996-E999.
230. Nakshabendi I. M., McKee R., Downie S., Russell R. I. & Rennie M. J. (1999) Rates of small intestinal mucosal protein synthesis in human jejunum and ileum. *Am. J. Physiol.* **277** (*Endocrinol. Metab.* **40**) : E1028-E1031.
231. National Research Council (1995) Nutrient requirements of Laboratory animals. Revised edition. National Academy Press, Washington D. C. USA.
232. Nicolaidis S., Rowland N., Meile M. J., Marfaing-Jallat P. & Pesez A. (1974) A flexible technique for long term infusions in unrestrained rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2** :131-136.
233. Niiyama M., Deguchi E., Kagota K. & Namioka S. (1979) Appearance of <sup>15</sup>N-labeled intestinal microbial amino acids in the venous blood of the pig colon. *Am. J. Vet. Res.* **40** : 716-718.
234. Nimni M. E. & Bavetta L. A. (1961) Dietary composition and tissue protein synthesis. I. Effect of tryptophan deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **108** : 38-45.
235. Nishi T., Hara H. & Kasai T. (1998) Guanidinated casein hydrolysate stimulates pancreatic secretagogue release by direct action to the intestine in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **218** : 357-364.
236. Nonogaki K., Strack A. M., Dallman M. F. & Tecott L. H. (1998) Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Nat. Med.* **4** : 1152-1156.
237. Nuttall F. Q. & Gannon M. C. (1991) Plasma glucose and insulin response to macronutrients in nondiabetic and NIDDM subjects. *Diabetes Care* **14** : 824-838.
238. Nyachoti C. M., de Lange C. F. M., McBride B. W., Leeson S. & Gabert V. M. (2000) Endogenous gut nitrogen losses in growing pigs are not caused by increased protein synthesis rates in the small intestine. *J. Nutr.* **130** : 566-572.
239. O'Brien R. M. & Granner D. K. (1996) Regulation of gene expression by insulin. *Physiol. Rev.* **76** : 1109-1161.
240. Ohlson M. A. & Hart B. P. (1965) Influence of breakfast on total day's food intake. *J. Am. Diet. Assoc.* **47** : 282-286.
241. O'Keefe S. J., Haymond M. W., Bennett W. M., Oswald B., Nelson D. K. & Shorter R. G. (1994) Long acting somatostatin analogue therapy and protein metabolism in patients with jejunostomies. *Gastroenterology* **107** : 379-388.
242. Pacy P. J., Price G. M., Halliday D., Quedevo M. R. & Millward D. J. (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.* **86** : 103-116.
243. Panksepp J. & Booth D. A. (1971) Decreased feeding after nutrient infusion : effect of hypothalamic lesions and vagotomy. *Physiol. Behav.* **22** : 107-113.

244. Pannemans D. L. E., Wagenmakers A. J. M., Westerterp K. R., Schaafsma G. & Halliday D. (1998) Effect of protein source and quantity on protein metabolism in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.* **68** : 1228-1235.
245. Parizkova J. & Rolland-Cachera M. F. (1997) High proteins early in life as a predisposition for later obesity and further health risks. *Nutrition* **13** : 818-819.
246. Parnaud G. & Corpet D. E. (1997) Colorectal cancer : controversial role of meat consumption. *Bull. Cancer.* **84** : 899-911.
247. 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.
248. Peraino C., Rogers Q. R., Yoshida M., Chen M. L. & Harper A. E. (1959) Observations of protein digestion *in vivo*. II. Dietary factors affecting the rate of disappearance of casein from the gastrointestinal tract. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** : 1475-1491.
249. Peters J. C., Bellissimo D. B. & Harper A. E. (1984a) L-Tryptophan fails to alter nutrient selection in rats. *Physiol. Behav.* **32** : 253-259.
250. Peters J. C. & Harper A. E. (1984b) Influence of dietary protein level on protein self-selection and plasma and brain amino acid concentrations. *Physiol. Behav.* **33** : 789-790.
251. Peters J. C. & Harper A. E. (1985) Adaptation of rats to diets containing different levels of protein. *J. Nutr.* **115** : 382-398.
252. Peters J. C. & Harper, A. E. (1987) Acute effects of dietary protein on food intake, tissue amino acids and brain serotonin. *Am. J. Physiol.* **252** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **21**) : R902-R914.
253. Pfeuffer M., Ahrens F., Hagemeister H. and Barth C. A. (1988) Influence of casein versus soy isolate on lipid metabolism of minipigs. *Ann. Nutr. Metab.* **32** : 83-89.
254. Phifer C. B. & Berthoud H.-R. (1998) Duodenal nutrient infusions differentially affect sham feeding and fos expression in rat brain stem. *Am. J. Physiol.* **274** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **43**) : R1725-R1733.
255. Phillips R. J. & Powley T. L. (1996) Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am. J. Physiol.* **271** : R766-R769.
256. Phillips R. J. & Powley T. L. (1998) Gastric volume detection after selective vagotomies in rats. *Am. J. Physiol.* **274** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **43**) : R1626-R1638.
257. Plata-Salaman C. R. (1991) Regulation of hunger and satiety in man. *Dig. Dis.* **9** : 253-268.
258. Potter J. D. & McMichael A. J. (1986) Diet and cancer of the colon and rectum : a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **76** : 557-569.
259. Preston T. & McMillan D. C. (1988) Rapid sample throughput for biochemical stable isotope studies. *Biochem. Environ. Mass Spectr.* **16** : 229-235.
260. Raybould H. E. (1998) Does your gut taste? Sensory transduction in the gastrointestinal tract. *News Physiol. Sci.* **13** : 275-280.

261. Read W. W. C., Harrison R. A. & Halliday D. (1982) A resin-based method for the preparation of molecular nitrogen for  $^{15}\text{N}$  analysis from urinary and plasma components. *Anal. Biochem.* **123** : 249-254.
262. Read N. W., McFarlane A., Kinsman R. I., Bates T. E., Blackhall N. W. , Farrar G. B., Hall J. C., Moss G., Morris A. P., O'Neill B. *et al.* (1984) Effect of infusion of nutrient solutions into the ileum on gastrointestinal transit and plasma levels of neurotensin and enteroglucagon. *Gastroenterology* **86** : 274-280.
263. Reeds P. J., Burrin D. G., Jahoor F., Wykes L. Henry & Frazer E. M. (1996) Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. *Am. J. Physiol.* **270** : E413-E418.
264. Reeds P. J. (2000) Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* **130** : 1835S-1840S.
265. Reeds P. J., Burrin D. G., Stoll B. & Jahoor F. (2000) Intestinal glutamate metabolism. *J. Nutr.* **130** : 978S-982S.
266. Reeds P. J. (2001) The biology of amino acid requirements : what do they mean and can we measure them? *Proc. Nutr. Soc.* **60** :13-14.
267. Remer T. & Manz F. (1994) Estimation of the renal net acid excretion by adults consuming diets containing variable amounts of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **59** : 1356-1361.
268. Remer T., Pietrzik K. & Manz F. (1996) A moderate increase in daily protein intake causing an enhanced endogenous insulin secretion does not alter circulating levels or urinary excretion of dehydroepiandrosterone sulfate. *Metabolism* **45** : 1483-1486.
269. Rémésy C., Moundras C., Morand C. & Demigné C. (1997) Glutamine or glutamate release by the liver constitutes a major mechanism for nitrogen salvage. *Am. J. Physiol. 272 (Gastrointest. Liver Physiol.)* **35** : G257-G264.
270. Rennie M. J., Edwards R. H. T., Halliday D., Matthews D. E., Wolman S. L. & Millward D. J. (1982) Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man : the effects of feeding and fasting. *Clin. Sci.* **63** : 519-523.
271. Rigaud D., Giachetti I., Deheeger M., Borys J. M., Volatier J. L., Lemoine A. & Cassuto D. A. (1997) Enquête française de consommation alimentaire I. Energie et macronutriments. *Cah. Nutr. Diét.* **32** : 379-389.
272. Robertson W. G., Heyburn P. J., Peacock M., Hanes F. A. & Swaminathan R. (1979) The effect of high animal protein intake on the risk of calcium stone-formation in the urinary tract. *Clin. Sci. (Colch)* **57** : 285-288.
273. Robertson W. G. & Peacock M. (1982) The pattern of urinary stone disease in Leeds and the United Kingdom in relation to animal protein intake during the period 1960-1980. *Urol. Int.* **37** : 394-399.
274. Robinson S. M., Jaccard C., Persaud C., Jackson A. A., Jequier E. & Schutz Y. (1990) Protein turnover and thermogenesis in response to high-protein and high-carbohydrate feeding in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **52** : 72-80.

275. Rolland-Cachera M. F., Deheeger M., Akrouit M. & Bellisle F. (1995) Influence of macronutrients on adiposity development : a follow up study of nutrition and growth from 10 months to 8 years of age. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **19** : 573-578.
276. Rolls B., Hetherington M. & Burley V. (1988) The specificity of satiety : the influence of foods of different macronutrient content on the development of satiety. *Physiol. Behav.* **43** : 145-153.
277. Rose W. C., Haines W. J., Warner D. T. (1954) The amino acid requirements of man, V. The role of lysine, arginine and tryptophan. *J. Biol. Chem.* **206** : 421-430.
278. Rose W. C. (1957) The amino acid requirements of adult man. *Nutr. Abstr. Rev.* **27** : 631-647.
279. Rowland N. E., Crews E. C. & Gentry R. M. (1997) Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin. *Regul. Pept.* **71** : 171-174.
280. Said A. K. & Hegsted D. M. (1970) Response of adult rats to low dietary levels of essential amino acids. *J. Nutr.* **100** : 1363-1375.
281. Saito M. & Suda M. (1975) Effect of diet on enzymes of the brush border of the small intestine and kidney of rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **21** : 207-215.
282. Sanchez-Gomez M., Malmlof K., Mejia W., Bermudez A., Ochoa M. T., Carrasco-Rodriguez S. & Skottner A. (1999) Insulin-like growth factor-1, but not growth hormone is dependent on a high protein intake to increase nitrogen balance in the rat. *Br. J. Nutr.* **81** : 145-152.
283. Schaafsma G. (2000) The Protein Digestibility – Corrected Amino Acid Score. *J. Nutr.* **130** : 1865S – 1867S.
284. Scharrer E. (1999) Control of food intake by fatty acid oxidation and ketogenesis. *Nutrition* **15**: 704-714.
285. Schimke R. T. (1962) Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.* **237** : 459-468.
286. Schwartz D. H., McClane S., Hernandez L. & Hoebel B. G. (1989) Feeding increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. *Brain Res.* **479** : 349-354.
287. Schwartz G. J., Berkow G., McHugh P. R. & Moran T. H. (1993) Gastric branch vagotomy blocks nutrient and cholecystokinin-induced suppression of gastric emptying. *Am. J. Physiol.* **264** : R630-R637.
288. Schwartz G. J. & Moran T. H. (1998) Duodenal nutrient exposure elicits nutrient-specific gut motility and vagal afferent signals in rat. *Am. J. Physiol.* **274** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **43**) : R1236-R1242.
289. Schwartz G. J. (2000) The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* **16** : 866-873.
290. Schwartz M. W., Woods S. C., Porte Jr D., Seeley R. J. & Baskin D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404** : 661-671.
291. Scornik O. A., Howell S. K. & Botbol V. (1997) Protein depletion and replenishment in mice : different roles of muscle and liver. *Am. J. Physiol.* **273** (*Endocrinol. Metab.* **36**) : E1158-E1167.

292. Semon B. A., Leung P. M. B., Rogers Q. R. & Gietzen D. W. (1988) Increase in plasma ammonia and amino acids when rats are fed a 44% casein diet. *Physiol. Behav.* **43** : 631-636.
293. Semon B. A., Leung P. M. B., Rogers Q. R. & Gietzen D. W. (1989) Plasma and brain ammonia and amino acids in rats measured after feeding 75% casein or 28% egg white. *J. Nutr.* **119** : 1583-1592.
294. Sharp P. E. & La Regina M. C. (1998) *The Laboratory Rat*. CRC Press LLC, Boca Raton, Floride, USA.
295. Shi G., Leray V., Scarpignato C., Bentouimou N., Bruley des Varannes S., Cherbut C. & Galmiche J. P. (1997) Specific adaptation of gastric emptying to diets with differing protein content in the rat : is endogenous cholecystokinin implicated? *Gut* **41** : 612-618.
296. Shiraga T., Miyamoto K., Tanaka H., Yamamoto H., Taketani Y., Morita K., Tamai I., Tsuji A. & Takeda E. (1999) Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H<sup>+</sup>/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology* **116** : 354-362.
297. Siegle M. L., Schmid H. R. & Ehrlein H. J. (1990) Effects of ileal infusions of nutrients on motor patterns of canine small intestine. *Am. J. Physiol.* **259** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **22**) : G78-G85.
298. Smith G. P. & Gibbs J. (1981) Brain-gut peptides and the control of food intake. *In* : Martin J. B., Reclin S. & Bick K. L. (Eds). *Neurosecretion and Brain Peptides*. Raven Press, 389-395. NY. USA.
299. Smith G. P. (1998) Dopamine and food reward. *In* : Morrison A., Fluharty S. (Eds). *Progress in psychobiology and psychological psychology*. Academic Press. NY. USA.
300. Specter S. E., Stern J. S. & Horwitz B. A. (1996) Hypothalamic monoaminergic activity in obese Zucker rats in response to acute and chronic dietary stimuli. *Am. J. Physiol.* **270** : E677-E688.
301. Spiller R. C., Trotman I. F., Higgins B. E., Ghatei M. A., Grimble G. K., Lee Y. C. & Bloom S. R. (1984) The ileal brake-inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut* **25** : 365-374.
302. Stanley B. G., Kyrkouli S. E., Lampert S. & Leibowitz S. F. (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus : a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* **7** : 1189-1192.
303. Steffens A. B. (1969) A method for frequent sampling of blood and continuous infusion of fluids in the rat without disturbing the animal. *Physiol Behav* **4**: 833-836.
304. Stoll B., Burrin D. G., Henry J., Jahoor F. & Reeds P. J. (1997) Phenylalanine utilization by the gut and liver measured with intravenous and intragastric tracers in pigs. *Am. J. Physiol.* **273** (*Gastrointest. Liver Physiol.* **36**) : G1208-G1217.
305. Stoll B., Burrin D. G., Henry J., Yu H., Jahoor F. & Reeds P. J. (1998) Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets. *J. Nutr.* **128** : 1517-1524.
306. Stoll B., Burrin D.G., Henry J.F., Jahoor F. & Reeds P.J. (1999a) Dietary and systemic phenylalanine utilization for mucosal and hepatic constitutive protein synthesis in pigs. *Am. J. Physiol.* **276** : G49-57.

307. Stoll B., Burrin D. G., Henry J., Yu H., Jahoor F. & Reeds P. (1999b) Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. *Am. J. Physiol.* **277** (*Endocrinol. Metab.* **40**): E168-E175.
308. Suzuki Y., Erickson R. H., Sedlmayer A., Chang S. K., Ikehara Y. & Kim Y. S. (1993) Dietary regulation of rat intestinal angiotensin-converting enzyme and dipeptyl peptidase IV. *Am. J. Physiol.* **264** : G1153-G1159.
309. Szczypka M. S., Mandel R. J., Donahue B. A., Snyder R. O., Leff S. E. & Palmiter R. D. (1999a) Viral gene delivery selectively restores feeding and prevents lethality of dopamine-deficient mice. *Neuron* **22** :167-178.
310. Szczypka M. S., Rainey M. A., Kim D. S., Alaynick W. A., Marck B. T., Matsumoto A. M. & Palmiter R. D. (1999b) Feeding behavior in dopamine-deficient mice. *PNAS* **96** : 12138-12143.
311. Taillandier D., Guezennec C. Y., Patureau-Mirand P., Bigard X., Arnal M. & Attaix D. (1996) A high protein diet does not improve protein synthesis in the non weight-bearing rat tibialis anterior muscle. *J. Nutr.* **126** : 266-272.
312. Teff K. L. & Young S. N. (1988) Effects of carbohydrate and protein administration on rat tryptophan and 5-hydroxytryptamine : differential effects on the brain, intestine, pineal and pancreas. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **66** : 683-688.
313. Tessari P., Garibotto G., Inchiostro S., Robaudo C., Saffioti S., Vettore M., Zanetti M., Russo R. & Deferrari G. (1996a) Kidney, splanchnic and leg protein turnover in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. *J. Clin. Invest.* **98** : 1481-1492.
314. Tessari P., Zanetti M., Barazzoni R., Vettore M. & Michielan F. (1996b) Mechanisms of postprandial protein accretion in human skeletal muscle. Insight from leucine and phenylalanine forearm kinetics. *J. Clin. Invest.* **98** : 1361-1372.
315. Thet L. A., Delaney M. D., Gregorio C. A. & Massaro D. (1977) Protein metabolism by rat lung: influence of fasting, glucose and insulin. *J. Appl. Physiol.* **43** : 463-467.
316. Thonney M. L. & Ross D. A. (1987) Composition of gain of rats fed low or high protein diets and grown at controlled rates from 80 to 205 grams. *J. Nutr.* **117** : 2135-2141.
317. Tokunaga K., Fukushima M., Lupien J. R., Bray G. A., Kemnitz J. W. & Schemmel R. (1989) Effects of food restriction and adrenalectomy in rats with VMH or PVH lesions. *Physiol. Behav.* **45**: 1131-1137.
318. Tomé D. & Bos C. Dietary protein and nitrogen utilization. (2000) *J. Nutr.* **130** : 1868S-1873S.
319. Torres N., Lopez G., Inchiostro S., Robaudo C., Saffioti S., Vettore M., Zanetti M., Russo R. & Deferrari G. (1996) Kidney, splanchnic, and leg protein turn-over in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. *J. Clin. Invest.* **98** : 1481-1492.
320. Trichopoulou A., Tzonou A., Hsieh C. C., Toupadaki N., Manousos O. & Trichopoulos D. (1992) High protein, saturated fat and cholesterol diet, and low levels of serum lipid in colorectal cancer. *Int. J. Cancer.* **51** : 386-389.
321. Trilok G. & Draper H. H. (1989) Sources of protein-induced endogenous acid production and excretion by human adults. *Calcif. Tissue Int.* **44** : 335-338.



322. Underwood L. E., Thissen J. P., Lemozy S., Ketelslegers J. M. & Clemmons D. R. (1994) Hormonal and nutritional regulation of IGF-1 and its binding proteins. *Horm. Res.* **42** : 145-151.
323. Vandewater K. & Vickers Z. (1996) Higher-protein foods produce greater sensory-specific satiety. *Physiol. Behav.* **59** : 579-583.
324. Vlajinac H. D., Marinkovic J. M., Ilic M. D. & Kocev N. I. (1997) Diet and prostate cancer : a case-control study. *Eur. J. Cancer.* **33** : 101-107.
325. Volatier J. L. & Verger P. (1999) Recent national French food and nutrient intake data. *Brit. J. Nutr.* **81** : S57-S59.
326. Volpi E., Lucidi P., Cruciani G., Monacchia F., Reboldi G., Brunetti P., Bolli G. B. & De Feo P. (1996) Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. *Diabetes* **45** : 1245-1252.
327. Volpi E., Fraando A. A., Yeckel C. W., Tipton K. D. & Wolfe R. R. (1998) Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J. Clin. Invest.* **101** : 2000-2007.
328. Volpi E., Mittendorfer B., Wolf S. E. & Wolfe R. R. (1999) Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am. J. Physiol.* **277** (*Endocrinol. Metab.* **40**) : E513-E520.
329. Voss S., Kroke A., Klipstein-Grobusch K. & Boeing H. (1998) Is macronutrient composition of dietary intake affected by underreporting? Results from the EPIC-Postdam Study. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52** : 119-126.
330. Wahren J., Felig P. & Hagenfeldt L. (1976) Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and patients with Diabetes Mellitus. *J. Clin. Invest.* **57** : 987-999.
331. Walls E. K. & Koopmans H. S. (1992) Differential effects of intravenous glucose, amino acids and lipid on daily food intake in rats. *Am. J. Physiol.* **262** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **31**) : R225-R234.
332. Waterlow J. C. (1985) What do we mean by adaptation? *in* Nutritional adaptation in man. Blaxter & Waterlow eds. John Libbey, London & Paris. pp 1-11.
333. Watt P. W., Corbett M. E. & Rennie M. J. (1992) Stimulation of protein synthesis in pig skeletal muscle by infusion of amino acids during constant insulin availability. *Am. J. Physiol.* **263** (*Endocrinol. Metab.* **26**) : E453-E460.
334. Wayner M. J., Ono T., DeYoung A. & Barone F. C. (1975) Effects of essential amino acids on central neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **3 suppl. 1** : 85-90.
335. Weiner N. (1970) Regulation of norepinephrine biosynthesis. *A. Rev. Pharmac.* **10** : 273-290.
336. Weingarten H. P., Chang P. K. & McDonald T. J. (1985) Comparison of the metabolic and behavioural disturbances following paraventricular- and ventromedial-hypothalamic lesions. *Brain Res. Bull.* **14** : 551-559.
337. Westerink B.H., Kwint H.F. & de Vries J.B. (1997) Eating-induced dopamine release from mesolimbic neurons is mediated by NMDA receptors in the ventral tegmental area: a dual-probe microdialysis study. *J. Neurochem.* **69** : 662-668.

338. Westphal S. A., Gannon M. C. & Nuttall F. Q. (1990) Metabolic response to glucose ingested with various amounts of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **52** : 267-272.
339. Williams G., Harrold J. A. & Cutler D. J. (2000) The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis : lifting the lid on black box. *Proc. Nutr. Soc.* **59** : 385-396.
340. Wilson D. C., Rafii M., Ball R. O. & Pencharz P. B. (2000) Threonine requirement in young men determined by indicator amino acid oxidation with use of L-[1-<sup>13</sup>C]phenylalanine. *Am. J. Clin. Nutr.* **71** : 757-7640
341. Windmueller H. G. (1982) Glutamine utilization by the small intestine. *Adv. Enzymol.* **53** : 201-237.
342. Windmueller H. G. & Spaeth A. E. (1975) Intestinal metabolism of glutamine and glutamate from the lumen as compared to glutamine from the blood. *Arch. Biochem. Biophys.* **171** : 662-672.
343. Windmueller H. G. & Spaeth A. E. (1976) Metabolism of absorbed aspartate, asparagine, and arginine by rat small intestine in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* **175** : 670-676.
344. Wisker E., Bach Knudsen K. E., Daniel M., Feldheim W. & Eggum B. O. (1996) Digestibilities of energy, protein, fat and nonstarch polysaccharides in a low fiber diet and diets containing coarse or fine whole meal rye are comparable in rats and humans. *J. Nutr.* **126** : 481-488.
345. Wolever T. M. & Bolognesi C. (1996) prediction of glucose and insulin responses of normal subjects after consuming mixed meals varying in energy, protein, fat, carbohydrate and glycemic index. *J. Nutr.* **126** : 2807-2812.
346. Wolever T. M. (2000) Dietary carbohydrates and insulin action in humans. *Br. J. Nutr.* **83 (Supl 1)** : S97-S102.
347. Wolever T. M., Hamad S., Gittelsohn J., Gao J., Hanley A. J., Harris S. B. & Zinman B. (1997) Low dietary fiber and high protein intakes associated with newly diagnosed diabetes in a remote aboriginal community. *Am. J. Clin. Nutr.* **66** : 1470-1474.
348. Wolfe R. R. (2000a) Protein supplements and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.* **72** : 551S-557S.
349. Wolfe R. R. (2000b) Effects of insulin on muscle tissue. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **3** : 67-71.
350. Wrong O. M., Vince A. J. & Waterlow J. C. (1985) The contribution of endogenous urea to faecal ammonia in man, determined by <sup>15</sup>N labeling of plasma urea. *Clin. Sci.* **68** : 193-199.
351. Wu G. (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J. Nutr.* **128** : 1249-1252.
352. Yamagishi T. & Debas H. T. (1978) Control of gastric emptying : interaction of the vagus and pyloric antrum. *Ann. Surg.* **187** : 91-94.
353. Yanagisawa H. & Wada O. (1998) Effects of dietary protein on eicosanoid production in rat renal tubules. *Nephron* **78** : 179-186.s
354. Yang Z. J., Meguid M. M., Chai J. K., Chen C. & Oler A. (1997) Bilateral hypothalamic dopamine infusion in male Zucker rat suppresses feeding due to reduced meal size. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **58** : 631-635.

355. Yoshizawa F., Nagasawa T., Nishizawa N. & Funabiki R. (1997) Protein synthesis and degradation change rapidly in response to food intake in muscle of food-deprived mice. *J. Nutr.* **127** : 1156-1159.
356. Yoshizawa F., Kimball S. R., Vary T. C. & Jefferson L. S. (1998) Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.* **275** (*Endocrinol. Metab.* **38**) : E814-E820.
357. Young V. R., Bier D. M., Pellet P. L. (1989) A theoretical basis for increasing current estimates of amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* **50** : 80-92.
358. Young V. R. & Borgonha S. (1999) Adult human amino acid requirements. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2** : 39-45.
359. Young V. R., El-Khoury A. E., Raguso C. A., Forslund A. H. & Hambraeus L. (2000) Rates of urea production and hydrolysis and leucine oxidation change linearly over widely varying protein intakes in healthy adults. *J. Nutr.* **130** : 761-766.
360. Yu Y. M., Wagner D. A., Tredget E. E., Walaszewski J. A., Burke J. F. & Young V. R. (1990) Quantitative role of splanchnic region in leucine metabolism : L-[1-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] leucine and substrate balance studies. *Am. J. Physiol.* **259** (*Endocrinol. Metab.* **22**) : E36-E51.
361. Yu Y. M., Ryan C. M., Burke J. F., Tompkins R. G. & Young V. R. (1995) Relations among arginine, citrulline, and ornithine and leucine kinetics in adult burn patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **62** : 960-968.
362. Zello G. A., Wykes L. J., Ball R. O. & Pencharz P. B. (1995) Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. *J. Nutr.* **125** : 2907-2915.
363. Zhang X. J., Sakurai Y. & Wolfe R. R. (1996) An animal model for measurement of protein metabolism in the skin. *Surgery* **119** : 326-332.
364. Zhang X. J., Chinkes D. L., Doyle D. & Wolfe R. R. (1998) Metabolism of skin and muscle protein is regulated differently in response to nutrition. *Am. J. Physiol.* **274** (*Endocrinol. Metab.* **37**) : E484-E492.
365. Zhao X. T., Miller R. H., McCamish M. A., Wang L. & Lin H. C. (1996) Protein absorption depends on load-dependent inhibition of intestinal transit in dogs. *Am. J. Clin. Nutr.* **64** : 319-323.
366. Zhao X. T., McCamish M. A., Miller R. H., Wang L. & Lin H. C. (1997) Intestinal transit and absorption of soy protein in dogs depend on load and degree of protein hydrolysis. *J. Nutr.* **127** : 2350-2356.
367. Zittel T. T., Glatzle J., Kreis M. E., Starlinger M., Eichner M., Raybould H. E., Becker H. D. & Jehle E. C. (1999) *C-fos* protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res.* **846** : 1-11.