



Impact du niveau d'apport protéino-glucidique sur l'homéostasie et le contrôle de l'ingestion des protéines et de l'énergie

Joséphine Gehring

► To cite this version:

Joséphine Gehring. Impact du niveau d'apport protéino-glucidique sur l'homéostasie et le contrôle de l'ingestion des protéines et de l'énergie. Alimentation et Nutrition. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB045 . tel-03483999

HAL Id: tel-03483999

<https://pastel.hal.science/tel-03483999>

Submitted on 16 Dec 2021

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.

Impact du niveau d'apport protéino-
glucidique sur l'homéostasie et le contrôle
de l'ingestion des protéines et de l'énergie
*Impact of protein-carbohydrate intake level on
homeostasis and control of protein and energy intake*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581, Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et
Santé (ABIES)

Spécialité : Sciences de la nutrition

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA,
75005, Paris, France

Référent : AgroParisTech

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 09/11/2021, par**

Joséphine GEHRING

Composition du Jury

Bruno FEVE

Professeur, Sorbonne Université

Président

Yves BOIRIE

Professeur, Université d'Auvergne

Rapporteur & Examineur

Abdul G. DULLOO

Professeur, Université de Fribourg (Suisse)

Rapporteur & Examineur

Patricia PARNET

Directrice de recherche, INRAE Centre Pays de la Loire

Examinatrice

Direction de la thèse

Dalila AZZOUT-MARNICHE

Professeur, AgroParisTech

Directrice de thèse

Patrick C. EVEN

Chargé de recherche, INRAE Centre Jouy-en-Josas

Co-encadrant & Invité

*“Nous sommes faits d'un étrange mélange
d'acides nucléiques et de souvenirs, de rêves et
de protéines, de cellules et de mots.”*

***François Jacob**, extrait d'un discours
à l'Académie française, 1997.*

Sommaire

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES ABREVIATIONS	4
CONTEXTE DE LA THESE	5
VALORISATIONS SCIENTIFIQUES	6
Articles scientifiques.....	6
Communications affichées	7
INTRODUCTION GENERALE	9
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	13
1.1. METABOLISME PROTEIQUE	15
1.1.1. Les protéines.....	15
1.1.2. Les acides aminés.....	16
1.1.3. Le renouvellement des protéines corporelles.....	17
1.1.4. Besoin et qualité des protéines.....	19
1.1.4.A. Détermination du besoin protéique.....	19
1.1.4.B. Qualité des protéines.....	19
1.2. VARIATION DES NIVEAUX D'APPORTS PROTEIQUES DANS LE REGIME ALIMENTAIRE	20
1.2.1. Les régimes hyperprotéiques.....	20
1.2.1.A. La prise alimentaire.....	20
1.2.1.B. La dépense énergétique.....	21
1.2.1.C. Le poids et la composition corporelle.....	21
1.2.2. Les régimes hypo-protéiques.....	22
1.2.2.A. La prise alimentaire.....	22
1.2.2.A.a. <i>Augmentation de la prise alimentaire par la diminution des protéines</i>	22
1.2.2.A.b. <i>Rejet des régimes à déficience sévère en protéines</i>	23
1.2.2.A.c. <i>Augmentation de l'appétence pour les protéines par la diminution des protéines</i>	24
1.2.2.B. La dépense énergétique.....	25
1.2.2.C. Le poids et la composition corporelle.....	26
1.2.3. La signalisation de l'adéquation des apports protéiques.....	26
1.2.4. L'effet levier des protéines.....	28
1.2.4.A. L'hypothèse.....	28
1.2.4.B. Protéine et obésité.....	29
1.2.4.C. Controverse autour de l'hypothèse.....	31
1.3. MODELES DE CHOIX ALIMENTAIRES DANS L'ETUDE DE LA CONSOMMATION PROTEIQUE	32
1.3.1. Les modèles de choix : capacité à sélectionner et contrôler l'apport protéique.....	32
1.3.2. Le choix protéique : un niveau élevé et défendu.....	33
1.3.2.A. Effet de la dilution des protéines.....	33
1.3.2.B. Effet de la qualité des protéines.....	34
1.3.3. Les facteurs de variation du choix protéique.....	35
1.3.3.A. Effets de l'état physiologique.....	35
1.3.3.A.a. <i>Gestation et la lactation</i>	35
1.3.3.A.b. <i>Age</i>	35
1.3.3.A.c. <i>Activité physique</i>	36
1.3.3.A.d. <i>Surpoids et obésité</i>	36
1.3.3.B. Effets de l'environnement.....	37
1.3.3.B.a. <i>Température</i>	37

1.3.3.B.b. Rythme circadien	37
1.3.4. Intérêt métabolique du niveau élevé de consommation spontanée de protéines.....	38
1.3.4.A. Le choix protéique en fonction des autres macronutriments	38
1.3.4.B. Impact du choix protéique sur l'adiposité.....	39
1.3.4.C. Impact du choix protéique sur le métabolisme glucidique	39

CHAPITRE 2 : TRAVAUX PERSONNELS **41**

2.1. JUSTIFICATIONS DES TRAVAUX DE THESE **43**

2.2. METHODOLOGIE **44**

2.2.1. Informations générales.....	44
2.2.2. Techniques utilisées.....	45
2.2.2.A. Dépense énergétique	45
2.2.2.A.a. Technique de mesure: calorimétrie indirecte.....	45
2.2.2.A.b. Technique de mesure : utilisation de la composition corporelle et de la prise alimentaire	47
2.2.2.B. Composition corporelle.....	47
2.2.2.C. Comportement alimentaire.....	48
2.2.2.D. Dosages biochimiques.....	48
2.2.2.E. Métabolisme glucidique.....	49
2.2.2.A.c. Sensibilité à l'insuline	49
2.2.2.A.d. Tolérance au glucose.....	49
2.2.2.F. Biologie moléculaire	49
2.2.3. Protocoles.....	50

2.3. ARTICLES **59**

2.3.1. Etude 1 - Plutôt qu'un ratio protéines/énergie constant, les rats sélectionnent un ratio protéines/glucides constant et présentent des faibles concentrations plasmatiques de FGF21 en condition de choix alimentaire	59
2.3.2. Etude 2 - L'interaction protéines-glucides affecte l'équilibre énergétique, les concentrations plasmatiques de FGF21 et IGF-1, et l'expression des gènes hypothalamiques chez le rat	97
2.3.2.A. Article principal	97
2.3.2.B. Résultats complémentaires.....	134
2.3.3. Etude 3 - D'après les concentrations plasmatiques de FGF21 et la consommation spontanée de protéines en conditions de choix, 15% de protéines semblent être insuffisant pour les rats	139
2.3.4. Etude 4 - L'auto-sélection des protéines est accrue chez les rats nourris avec des régimes à indice glycémique élevé, ce qui réduit l'augmentation postprandiale de la glycémie	163

CHAPITRE 3 : DISCUSSION **191**

3.1. IMPACT DES VARIATIONS DES NIVEAUX D'APPORTS PROTEIQUES DANS LE REGIME ALIMENTAIRE SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE **194**

3.1.1. Régimes à faibles teneurs en protéines	194
3.1.2. Contrôle de FGF21 par la teneur en protéines des régimes.....	196

3.2. SELECTION D'UN RATIO PROTEINES/ENERGIE PLUS ELEVE QUE LE BESOIN PROTEIQUE **198**

3.2.1. Ratio protéines/énergie défendu et s'ajustant en fonction des apports glucidiques	198
3.2.2. Effets bénéfiques de l'auto-sélection des protéines.....	199
3.2.3. Rôle de FGF21 dans l'auto-sélection des protéines	201

CONCLUSION GENERALE **205**

REFERENCES **209**

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de différentes personnes que je tiens à remercier tout particulièrement.

Tout d'abord, je tiens à remercier Yves Boirie (Université d'Auvergne) et Abdul G. Dulloo (Université de Fribourg) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Bruno Fève (Sorbonne Université) et Patricia Parnet (INRAE) d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je remercie Claire Gaudichon (directrice d'unité) et François Blachier (directeur adjoint) de m'avoir accueilli au sein de l'unité PNCA.

Je remercie chaleureusement Patrick Even, mon directeur de thèse, de m'avoir fait confiance il y a 3 ans pour ce projet. J'ai eu la chance d'être sa dernière doctorante, et ainsi de pouvoir profiter d'une carrière entière de conseils et d'anecdotes. Je le remercie pour son encadrement, pour son aide et sa présence quasiment quotidienne dans les expérimentations, qui ont permis à cette thèse de voir le jour.

Je remercie aussi particulièrement Dalila Azzout-Marniche de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir repris la direction de la thèse après le départ à la retraite de Patrick. C'est notamment grâce à elle qu'il y a 3 ans, j'entendais parler de ce projet. Je la remercie pour son aide précieuse durant toutes les étapes de ce projet.

Je remercie Daniel Tomé pour ses conseils toujours avisés que ce soit lors de la préparation du concours de l'école doctorale, lors de discussions sur la thèse ou lors de la relecture de ce manuscrit.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé aux travaux de cette thèse et ont accepté de me transmettre leurs savoirs techniques et scientifiques. Merci à Catherine Chaumontet pour son aide durant toutes les expérimentations et pour son dynamisme. Merci à Morgane Dufay pour tout son travail à l'animalerie, qui permet à nos animaux d'avoir de bonnes conditions de vie, et pour toutes nos discussions. Merci à Julien Piedcoq pour son aide en biologie moléculaire et pour le traitement des IRM. Merci à Anne Blais pour ses conseils à l'animalerie et pour son aide dans les dosages. Merci à Angélique Foucault pour son aide pour les PCR. Merci à Vanessa Hudry pour son aide à l'animalerie.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du laboratoire PNCA que je n'ai pas cité. Merci pour toutes les discussions (scientifiques ou non) que j'ai pu avoir avec certains d'entre vous. Mon passage à PNCA restera un bon souvenir.

J'ai une pensée toute particulière pour tous les rats utilisés dans les travaux de cette thèse : pour ceux qui ont été sacrifiés, et pour ceux qui ont pu continuer leur vie de rat en étant adoptés grâce au merveilleux travail de l'association Graal, qui réhabilite les animaux de laboratoire.

Je remercie Marc Foretz (CNRS) et Simon Thornton (Université de Lorraine) d'avoir participé à mon comité de thèse. Merci d'avoir pris le temps de venir discuter de ma thèse.

Je remercie la plateforme technique de l'hôpital Bichat, pour la réalisation de certains dosages biochimiques, et la plateforme d'imagerie pour petits animaux de l'Université Paris-Descartes, pour la réalisation des IRM.

Je remercie l'ensemble des stagiaires qui ont grandement contribué à l'avancée de ce projet : Marie, Sandra, Eldin, Camille, Florence, Julie et Juliette. J'ai été très fière de vous encadrer. Je vous souhaite pleins de belles choses pour la suite de vos parcours, et beaucoup de courage pour celles qui ont démarré leur thèse cette année.

Je remercie les doctorants, ex-doctorants et post-doctorants avec qui j'ai partagé un bureau mais surtout cette grande aventure : Alya, Alison, Armelle, Chloé, Elie, Erwan, Florence, Gabrielle, Gaëtan, Laurianne, Marion, Moufidath, Nathalie, Romain, Sandra, Simon, Soukaïna et Trenton. Ces trois années n'auraient clairement pas été possible sans vous. Merci pour votre aide et votre soutien quand j'en ai eu besoin, mais surtout merci pour les bons moments passés ensemble. Vous faites entièrement partie des bons souvenirs que je garderai de cette thèse.

Je remercie mes amis, qui sont une source de soutien et de bonne humeur inépuisable. Merci à ceux de Paris (Léa, Lucas, Mélissa et Théo) pour les bons moments et les nombreuses soirées, et bien sûr celles au restaurant grec de la rue Mouffetard. Merci à ceux d'Alsace, huit ans après le lycée c'est toujours aussi génial de vous avoir dans ma vie. Et merci à tous ceux que j'ai croisé et apprécié durant mes études supérieures : à Strasbourg (coucou les déesses) et à Bordeaux (coucou les Spaezles).

Je remercie ma famille qui a toujours su m'encourager et me soutenir, même s'ils n'ont pas toujours compris ce que je faisais. Je tiens tout particulièrement à remercier mes parents, mes principaux supporters depuis 26 ans. Merci pour votre amour et votre bienveillance. Merci d'avoir toujours été là dans toutes les étapes de mon parcours. Merci aussi pour les nombreux déménagements et d'avoir toujours répondu présents pour profiter avec moi des endroits où j'étudiais aux 4 coins de la France et de l'Irlande.

Je remercie enfin mon chéri, celui qui m'accompagne depuis maintenant 10 ans, celui avec qui je me suis pacsée durant cette thèse, celui qui relis tout ce que j'écris à la recherche de la moindre faute, celui qui me fera toujours rire, celui qui supporte mon caractère (et la rédaction de cette thèse n'a pas aidé), et surtout celui qui a été présent tous les jours de ces 3 années pour me rappeler que j'en étais capable.

Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'azote.....	15
Figure 2. Les acides aminés protéinogènes.....	17
Figure 3. Renouvellement des protéines.....	18
Figure 4. Mécanisme de contrôle de la prise alimentaire via le ratio tryptophane/acides aminés neutres (AAN) et la sécrétion de sérotonine.....	23
Figure 5. Choix alimentaire sur 24h entre les régimes "Low-Protein" LP, "Normo-Protein" NP et "High-Protein" HP chez des rats préalablement adaptés pendant 15 jours avec soit un régime NP soit un régime LP.....	25
Figure 6. Comparaison des principaux sites d'expression anatomique du FGF21 chez la souris et l'Homme.....	27
Figure 7. Représentation du concept de "Protein Leverage" dérivé du modèle de Simpson et Raubenheimer.....	29
Figure 8. Evolution du pourcentage d'énergie sous forme de macronutriments par rapport à la prévalence d'obésité chez les adultes au début des années 1990.....	30
Figure 9. Protocole expérience 1 : Choix protéique selon différentes teneurs en glucides et lipides	50
Figure 10. Protocole expérience 2 : Choix protéique selon différentes teneurs en protéines, glucides et lipides	51
Figure 11. Protocole expérience 3 : Impact de la teneur en protéines sur le métabolisme énergétique.....	52
Figure 12. Protocole expérience 4 : Taux plasmatiques de FGF21 sous auto-sélection alimentaire	54
Figure 13. Protocole expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique (groupe 1)	55
Figure 14. Protocole expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique (groupe 2)	56
Figure 15. Protocole expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique (groupe 3)	56

Liste des tableaux

Tableau 1. Bilan des quatorze régimes composites utilisés dans l'expérience 3.	52
Tableau 2. Bilan de l'utilisation des expériences dans les articles.	57
Tableau 3. Effets des teneurs en protéines sur la composition corporelle et le métabolisme énergétique, par rapport au groupe 15P (Etude 2 Page 97).....	194

Liste des abréviations

ABIES	Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé
AAN	Acides Aminés Neutres
APReM	Apport Protéique et Régulation de Métabolisme
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
CCK	Cholécystokinine
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
DSS	Dietary Self-Selection
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21
GCN2	General Control Nonderepressible 2
HP	High-Protein
IG	Indice Glycémique
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IMC	Indice de Masse Corporelle
INRAE	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
LP	Low-Protein
MSS	Macronutrient Self-Selection
NAcc	Noyau Accubems
NP	Normo-Protein
NPY	Neuropeptide Y
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PNCA	Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire
POMC	Pro-Opiomélanocortine
PYY	Peptide YY
Ratio PE	Ratio Protéines/Energie
Ratio PG	Ratio Protéines/Glucides
UCP	Uncoupling Protein

Contexte de la thèse

Cette thèse a été réalisée, d'octobre 2018 à septembre 2021, au sein de l'unité mixte de recherche 914 « Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire » (PNCA) dépendant de l'Université Paris-Saclay, d'AgroParisTech et de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE). Cette unité est actuellement dirigée par le Pr Claire Gaudichon. Les objectifs de recherche de l'unité sont d'évaluer l'impact des variations de l'apport protéique, en qualité et en quantité, sur la physiologie, le métabolisme et le comportement alimentaire en situations physiologiques ou physiopathologiques.

Ce travail de thèse a été dirigé par le Dr Patrick C. Even puis, à son départ à la retraite en juin 2021, par la Pr Dalila Azzout-Marniche, au sein de l'équipe qu'elle dirige « Apport Protéique et Régulation de Métabolisme » (APReM) dont les recherches portent sur l'évaluation des conséquences des variations de l'apport protéino-énergétique sur le métabolisme et la physiologie, dans différentes situations physiologiques et pathologiques.

Cette thèse a été financée par une bourse de l'école doctorale ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé) de l'Université Paris-Saclay, par l'UMR PNCA et par le département Alim'H de l'INRAE.

Valorisations scientifiques

Articles scientifiques

Publiés

J. Gehring, C. Gaudichon, P. C. Even. *L'influence de la teneur en protéines de l'alimentation sur le contrôle de la prise alimentaire et la régulation du poids*. Cahier de Nutrition et de Diététique, 2020. <https://doi.org/10/ghpv4d>.

J. Gehring, C. Gaudichon, P. C. Even. *Food intake control and body weight regulation by dietary protein*. Cahier de Nutrition et de Diététique, 2020. <https://doi.org/10/ghpv4f>.

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, P. C. Even. *Variability in Plasma FGF21 Levels in Rats Fed A Standard 15% Protein Diet is not Sensitive Enough to Reflect Differences in Protein Requirements*. Archives of diabetes & obesity, 2020. <https://doi.org/10.32474/ADO.2020.03.000154>.

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, J. Piedcoq, C. Gaudichon, P. C. Even. *Rats Self-Select a Constant Protein-to-Carbohydrate Ratio Rather Than a Constant Protein-to-Energy Ratio and Have Low Plasma FGF21 Concentrations*. Journal of Nutrition, 2021. <https://doi.org/10/gjn7nq>.

P. C. Even, J. Gehring, D. Tomé. *What Does Self-Selection of Dietary Proteins in Rats Tell Us about Protein Requirements and Body Weight Control?* Obesity Reviews, 2021. <https://doi.org/10.1111/obr.13194>.

Accepté

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, J. Piedcoq, C. Gaudichon, P. C. Even. *Protein-carbohydrate interaction effects on energy balance, FGF21, IGF-1 and hypothalamic genes expression in rats*. Soumis à American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.

Soumis

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, C. Gaudichon, P. C. Even. *Plasma FGF21 concentrations and spontaneous self-selection of protein suggest that 15% protein in the diet may not be enough for male adult rats*. Soumis à American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.

En cours de préparation

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, C. Gaudichon, P. C. Even. *Self-selection of protein is increased in rats fed high-glycemic index diets, which reduces postprandial increase in blood glucose*.

J. Gehring, P. C. Even. *Components of energy expenditure responsible for the increase in total energy expenditure in low-protein fed rats*.

Communications affichées

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, D. Tomé, C. Gaudichon, P. C. Even. *Rats spontaneously select protein above the level required for adequate growth and body composition*. Congrès de la Federation of European Nutrition Societies (FENS), 2019.

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, J. Piedcoq, D. Tomé, C. Gaudichon, P. C. Even. *Étude de l'évolution de FGF21 en fonction du taux de protéines couplé à différents ratios glucides/lipides chez le rat Wistar*. Journée Francophone de Nutrition (JFN), 2019.

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, J. Piedcoq, D. Tomé, C. Gaudichon, P. C. Even. *Consommation spontanée de protéines supérieure au niveau recommandé : Impact sur la sensibilité aux régimes gras*. Congrès annuel de l'Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (AFERO), 2020.

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, J. Piedcoq, D. Tomé, C. Gaudichon, P. C. Even. *Plasma FGF21 levels in rats are dependent on dietary protein but not on dietary carbohydrates or fats*. Nutrition Live Online, 2020.

J. Gehring, D. Azzout-Marniche, C. Chaumontet, C. Gaudichon, P. C. Even. *Les rats en choix alimentaire choisissent un ratio protéines/glucides constant plutôt qu'un ratio protéines/énergie constant et maintiennent des taux plasmatiques de FGF21 très faibles*. Journée Francophone de Nutrition (JFN) Live, 2020.

Introduction générale

Le statut nutritionnel en protéines et en acides aminés, en tant qu'éléments nutritionnels essentiels, est contrôlé de façon très précise. Un apport inadéquat de protéines génère des signaux spécifiques agissant sur le comportement alimentaire. Ce contrôle spécifique de l'ingestion des protéines semble exister en parallèle des mécanismes de contrôle de l'apport énergétique, et des conflits peuvent se produire entre la nécessité d'assurer simultanément le besoin en protéines et en énergie. Les mécanismes périphériques et centraux gérant ces équilibres restent encore discutés.

Les changements induits sur le comportement alimentaire par des modifications de la teneur en protéines du régime alimentaire dépendent de l'apport protéique cible, que les individus tendent à atteindre et contrôler. Il est admis d'assimiler l'homéostasie protéique à l'obtention d'un bilan azoté équilibré qui est atteint avec des régimes dont la teneur en protéines oscille entre 10% et 20% de l'apport énergétique, selon les espèces, les conditions environnementales et l'état physiologique. Cependant, l'hypothèse que cette valeur représente le niveau d'apport protéique cible est contredite par de nombreuses études. En effet, lorsque des rats ont la possibilité de choisir librement leur niveau d'apport protéique, ils sélectionnent très souvent des niveaux beaucoup plus élevés, le plus fréquemment de l'ordre de 30% de l'apport énergétique. Le contrôle du niveau d'apport protéique ne serait donc pas uniquement dépendant des mécanismes de la régulation de l'homéostasie protéique. Puisque les protéines sont à la fois impliquées dans le métabolisme protéique et dans le métabolisme énergétique, il y aurait deux contrôles. Un contrôle très spécifique est mis en place pour éviter des niveaux d'apport faibles en protéines et d'assurer l'homéostasie protéique. Et d'autre part, un contrôle énergétique plus général a pour objectif d'assurer un équilibre entre les apports en protéines et des macronutriments énergétiques, notamment les glucides afin d'optimiser le métabolisme énergétique, et en particulier la répartition entre mise en réserve et oxydation des glucides, lipides et protéines en période postprandiale.

La situation dans laquelle un conflit entre le contrôle protéique et énergétique apparaît le plus évident est lorsqu'un sujet est confronté à un régime faible en protéine. Les données expérimentales convergent pour indiquer qu'un apport limité en protéines (5-7% environ de l'apport énergétique) tend à augmenter la prise alimentaire, et il a été fait l'hypothèse que le moteur principal de cette hyperphagie serait de limiter le déficit d'apport en protéine, donnant la priorité au contrôle protéique sur le contrôle énergétique. Ces effets du niveau d'apport protéique dans l'alimentation sur le comportement alimentaire et la composition corporelle ont été théorisés dans le cadre de l'hypothèse d'un effet levier des protéines ou « protein leverage hypothesis ». Sur la base de données expérimentales nombreuses mais dont certaines restent controversées, cette théorie suggère que, du fait de l'essentialité d'un apport protéique adéquat en quantité et en qualité, les mécanismes du contrôle du niveau d'ingestion protéique dominent fortement ceux qui contrôlent le niveau de l'ingestion énergétique. En conséquence, une carence même faible de la teneur en protéines du régime peut induire des augmentations significatives du niveau d'ingestion calorique pour assurer un apport protéique suffisant et conduire à une consommation énergétique excessive, et à terme au surpoids ou à l'obésité. Les mécanismes mis en jeu dans cette hyperphagie induite par un régime limité en protéines apparaissent complexes et reflètent les interactions multiples entre les régulations du métabolisme énergétique et du métabolisme protéique.

Il est aujourd'hui bien établi que les productions animales ont un impact négatif sur l'environnement, et qu'il est nécessaire de les limiter, voire de les réduire. En outre, la consommation de produits animaux, notamment la viande rouge, est de plus en plus mise en cause pour des effets possiblement délétères sur la santé. Dans un objectif d'obtenir un mode de

consommation plus saine et durable, les politiques publiques recommandent donc de réduire la consommation de viande et d'augmenter la part des produits d'origine végétale. De plus, dans l'idée que la population mondiale est toujours en croissance, l'augmentation de la production végétale permettrait d'améliorer les rendements agricoles avec un coût énergétique plus faible. Dans ce contexte de transition alimentaire, la question des conséquences liées à des modifications de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur la santé est particulièrement sensible. L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'ingestion de protéine, leur relation avec le contrôle de l'apport énergétique et les conséquences de ces processus sur la prise alimentaire, la régulation du métabolisme, et la composition corporelle.

Chapitre 1 - Introduction bibliographique

1.1. Métabolisme protéique

1.1.1. Les protéines

La notion de « protéine » est établie en 1835 aux Pays-Bas par le chimiste organicien Gerardus Johannes Mulder et son confrère suédois Jöns Jacob Berzelius. Le terme est défini à partir du grec « *proteno* » signifiant « je prends la première place », puisqu'il est vite apparu que ces éléments étaient les seules sources d'azote utilisables par l'Homme et sans lesquels la vie serait impossible.

Il existe trois familles de macronutriment : les protéines, les glucides et les lipides. Les protéines sont définies comme des macromolécules composées d'un enchaînement d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Elles diffèrent selon l'enchaînement, le nombre et les proportions d'acides aminés, ainsi que leur organisation dans l'espace. Par rapport aux deux autres macronutriments, les protéines alimentaires sont les seules à apporter de l'azote lié aux acides aminés.

Les organismes vivants, animaux ou végétaux, sont constitués pour une part importante de protéines, et l'azote qui y est intégré passe d'un organisme à un autre par différents processus (Figure 1).

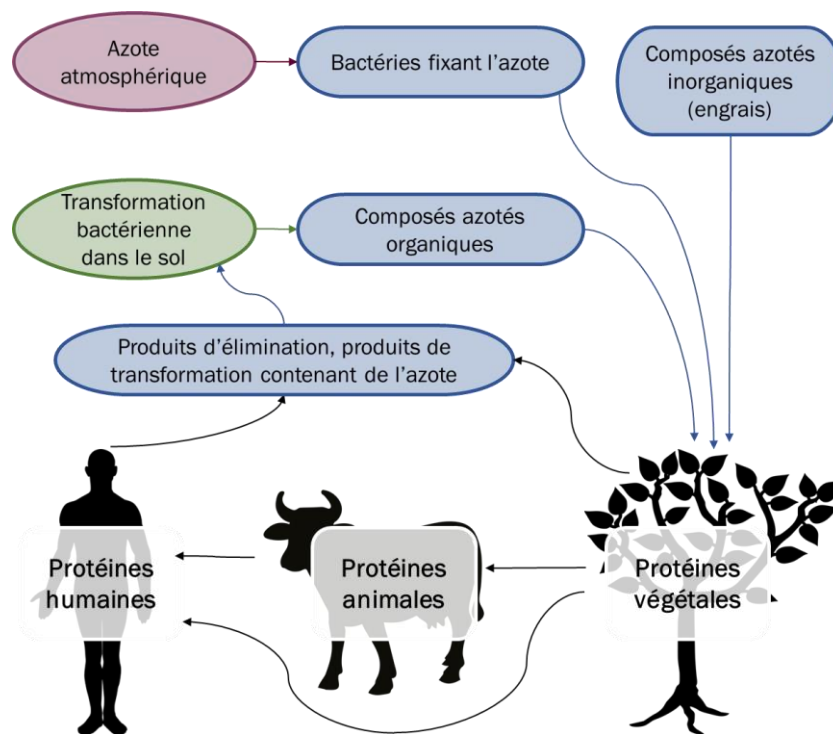


Figure 1. Cycle de l'azote.

Les végétaux fixent l'azote à partir de composés azotés organiques (décomposition des plantes, excréments) ou inorganiques (engrais) en provenance du sol, qui leur permettent de fabriquer des acides aminés et les assemblent pour en faire des protéines. Ces protéines d'origine végétale seront consommées soit par les animaux, soit directement par l'Homme ou indirectement via la consommation de produits d'origine animale. (Hans Konrad Biesalski et al., 2017)

Chez l'adulte, le compartiment protéique est relativement stable. Il est estimé que chez un homme de 70 kg le compartiment protéique représente environ 15% du poids corporel donc 10-12 kg (Arnal M. et al., 1997). Les protéines sont présentes dans l'ensemble de l'organisme, mais de façon inégale. En effet, par leur rôle de structure, environ la moitié des protéines corporelles sont présentes dans les muscles squelettiques.

Les protéines ont de nombreux rôles dans l'organisme. A l'instar du collagène, qui représente un tiers de la masse protéique totale de l'Homme, les protéines de structure participent à la stabilité des organes et des tissus. Les protéines entrent aussi en jeu dans les mécanismes de transport de diverses substances à travers le plasma, les cellules ou encore les membranes cellulaires. Elles ont également un rôle de défense de l'organisme car elles agissent dans le système immunitaire (les immunoglobulines par exemple). Enfin, les protéines jouent un rôle fonctionnel essentiel, puisque l'ensemble des contrôles et régulations de l'organisme nécessitent la présence d'enzymes, d'hormones, ou de récepteurs associés qui sont très majoritairement des protéines.

1.1.2. Les acides aminés

Chez l'Homme, vingt acides aminés sont dits protéinogènes, c'est-à-dire qu'ils sont impliqués dans la formation des protéines (**Figure 2**). Ces molécules ont toutes en commun de posséder une fonction acide carboxylique -COOH (extrémité C-terminale) et une fonction amine -NH, qui est une fonction -NH₂ (extrémité N-terminale), à l'exception de la proline qui possède une fonction amine cyclique. Les fonctions acide et amine sont toutes deux liées à un carbone central appelé carbone α . La partie variable des acides aminés, appelée chaîne latérale ou radical, peut se composer de différents éléments (carbone, soufre, azote...).

D'un point de vue chimique, les acides aminés peuvent être divisés, selon la nature chimique de leur radical, en 4 groupes : non polaire (forment les noyaux hydrophobes ou localisés dans les parties en contact avec les lipides membranaires), polaire (forment des ponts hydrogènes et responsables de la structure tertiaire), basiques et acides (forment des liaisons ioniques). Cependant, d'un point de vue biologique et nutritionnel, ils peuvent aussi être divisés selon le fait qu'ils sont indispensables (ou nutritionnellement essentiels) ou non indispensables (ou non nutritionnellement essentiels, « *dispensable* » en anglais) (**Figure 2**).

Les acides aminés indispensables (isoleucine, leucine, valine, phénylalanine, tryptophane, histidine) sont ceux dont la synthèse *de novo* par l'organisme n'est pas possible ou trop lente, et donc qu'il est nécessaire d'apporter par l'alimentation. Il existe aussi deux acides aminés considérés comme strictement indispensables (lysine et thréonine) en raison de leur transamination irréversible. Les acides aminés non indispensables sont ceux que l'organisme est capable de synthétiser à partir d'azote et de précurseurs carbonés, ou d'autres acides aminés, et donc qu'il n'est pas nécessaire d'apporter par l'alimentation. Certains sont considérés comme conditionnellement indispensables, car ils sont uniquement synthétisés à partir d'autres acides aminés (cystéine, tyrosine), ou parce qu'ils deviennent indispensables dans certaines situations physiologiques (arginine, glutamine, proline).

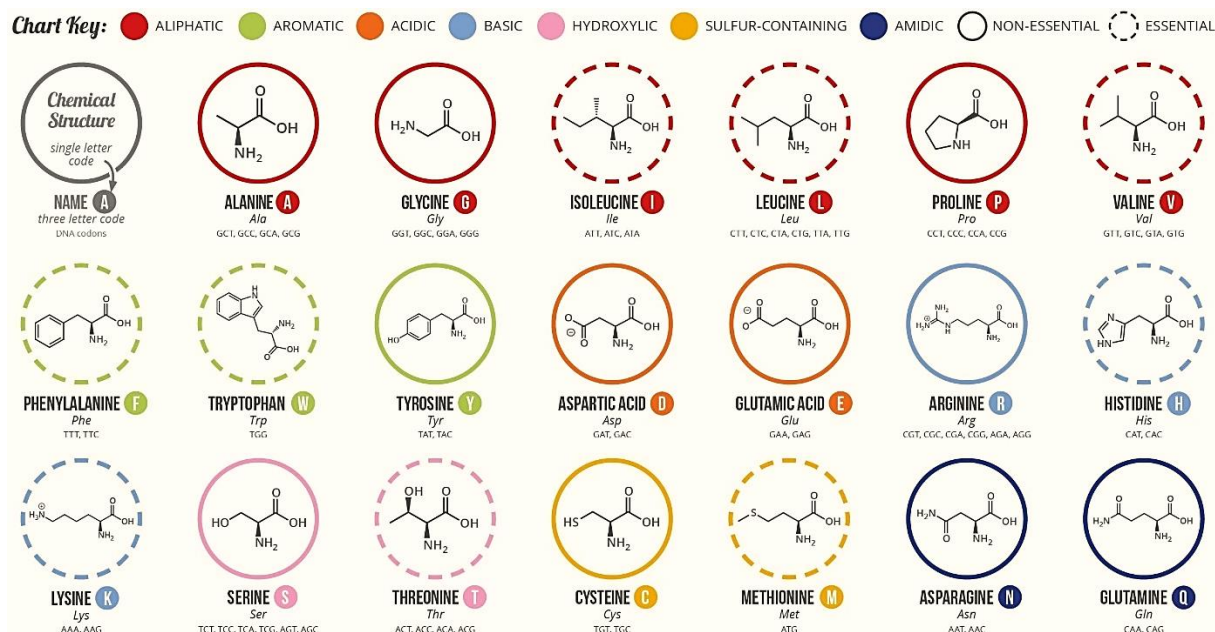


Figure 2. Les acides aminés protéinogènes.

Les acides aminés sont les éléments constitutifs des protéines des organismes vivants. On trouve plus de 500 acides aminés dans la nature. Cependant, le code génétique humain n'en code directement que 20. Les acides aminés "indispensables" doivent être obtenus par l'alimentation (cercles en pointillés), tandis que les acides aminés "dispensables" peuvent être synthétisés par l'organisme (cercles pleins). (Coupoundchem.com)

1.1.3. Le renouvellement des protéines corporelles

Les protéines corporelles sont en constante synthèse et dégradation (**Figure 3**). Ce mécanisme permet un renouvellement permanent pour que les protéines puissent assurer leurs fonctions physiologiques. Deux voies métaboliques interviennent dans ce processus : la protéosynthèse (fabrication de nouvelles protéines) et la protéolyse (dégradation des protéines). Ainsi, entre 250 et 300 g de protéines sont renouvelées chaque jour. Cependant, ce renouvellement n'est pas identique dans chaque tissu : 120 g/j dans le foie, le pancréas, le tissu intestinal, les cellules sanguines et la peau, 80 g/j dans le muscle et 50 g/j dans le reste des tissus (Arnal M. et al., 1997).

La protéosynthèse se fait via le recyclage endogène d'acides aminés provenant de la dégradation des protéines de l'organisme complété par un apport exogène de protéines provenant de l'alimentation. Il existe six étapes liées au processus de synthèse protéique : la transcription de l'ADN en ARN messager, le transport de l'ARN messager depuis le noyau vers le cytosol, l'aminocyclisation des ARN de transfert, la traduction de l'ARN messager en chaînes polypeptidiques (initiation, élongation et terminaison), et les modifications post-traductionnelles des protéines. Toutes ces étapes de synthèse sont sous le contrôle de mécanismes complexes, dont certains dépendent de l'état nutritionnel, et nécessitent un coût énergétique importante et de nombreuses molécules. Le catabolisme des protéines se fait quant à lui via la protéolyse permettant de libérer des acides aminés libres. Il existe quatre systèmes : lysosomal, ubiquitine-protéasome, calpaïne, et caspase.

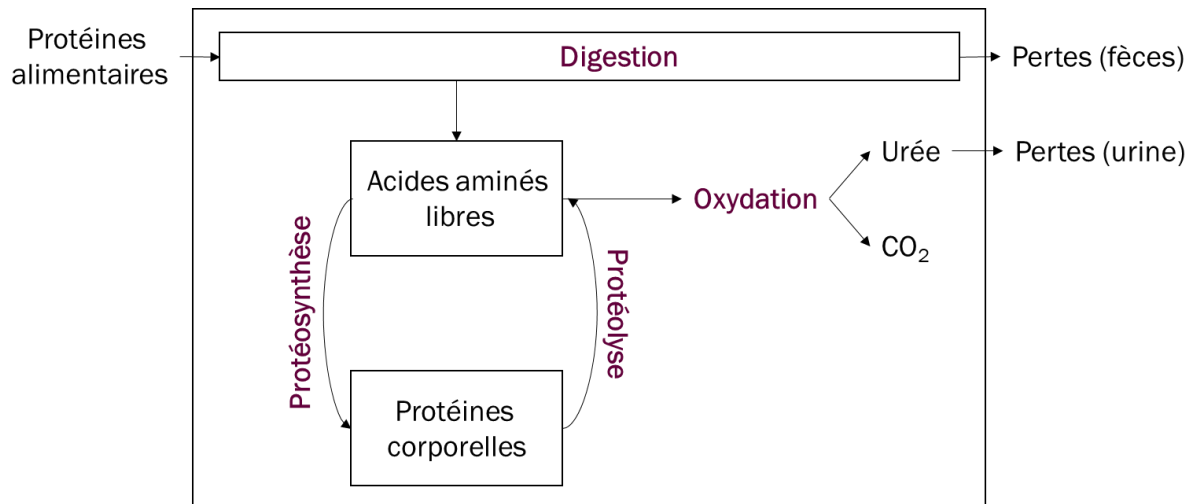


Figure 3. Renouvellement des protéines.

Le pool de protéines corporelles est constamment en renouvellement via des processus de synthèse (protéosynthèse) et de dégradation (protéolyse). Pour permettre ce renouvellement, il y a des apports de nouveaux acides aminés régulièrement par l'alimentation, et d'acides aminés endogènes provenant de la protéolyse des protéines corporelles.

A moyen terme, chez un individu adulte à l'entretien, qui n'est pas en croissance, tous les acides aminés apportés par l'alimentation sont oxydés, soit immédiatement après l'ingestion en période postprandiale (environ 20% selon le niveau d'apport), soit après avoir été préalablement intégrés dans des synthèses protéiques, puis libérés lors de la dégradation des protéines. Ainsi, à moyen terme, si par exemple la teneur en protéines de l'alimentation est de 15%, le catabolisme des acides aminés alimente 15% du métabolisme énergétique. Pour cela, les acides aminés sont désaminés, perdant leur fonction amine soit par désamination (perte de la fonction amine directement) ou par transamination (transfert de la fonction amine). Le squelette carboné résultant de ces processus rentre alors dans les voies cataboliques, car il peut être converti en acétyl-CoA et participer à la production d'énergie au même titre que les lipides et les glucides via le cycle de Krebs (Stepien et al., 2016). L'utilisation des squelettes carbonés peut se faire directement, mais peut aussi se faire par la synthèse de glucose via la gluconéogenèse et donc intervenir dans le métabolisme glucidique. En effet, certains acides aminés peuvent être transformés en pyruvate intervenant dans le processus de gluconéogenèse, et le glucose formé est alors utilisé dans le métabolisme énergétique. Enfin, il faut noter que la production d'énergie par le catabolisme des acides aminés est supérieure à celui du glucose (24 kJ/g) mais une partie de cette énergie est perdue lors de l'élimination de l'azote via l'urée, et l'énergie disponible est alors comparable à celle du glucose (16,7 kJ/g) et inférieure à celle des lipides (37,6 kJ/g).

L'azote libéré lors des processus de dégradation des acides aminés se retrouve sous forme d'ammoniaque dans l'organisme. Le caractère toxique de cette ammoniaque sur l'organisme et plus spécifiquement sur le système nerveux central fait qu'il est nécessaire de l'éliminer. Dans le foie, il va donc entrer dans le cycle de l'urée, qui est une forme non toxique et hydrosoluble pouvant être conduite jusqu'au reins et excrétée dans l'urine. L'ammoniaque formé dans les tissus périphériques tels que le muscle, qui n'expriment pas l'uréogenèse, est transféré vers le foie sous forme d'alanine et de glutamine.

1.1.4. Besoin et qualité des protéines

Dans le cadre du renouvellement constant des protéines, le besoin alimentaire en protéines correspond à la quantité nécessaire au remplacement des pertes de protéines et éventuellement aux besoins supplémentaires liés à la croissance, la gestation ou l'allaitement. Ce besoin est variable selon le sexe, l'âge, l'état physiologique et le niveau d'activité physique. La FAO définit ce besoin comme « *l'apport minimum en protéines de bonne qualité permettant d'atteindre l'équilibre azoté chez un adulte en bonne santé avec un niveau d'activité physique modéré* » (FAO/WHO/UNU Expert Consultation et al., 2007).

1.1.4.A. Détermination du besoin protéique

Ce besoin est défini chez l'adulte sur la base du bilan azotée, qui correspond à la différence entre l'azote ingéré (prise alimentaire) et les pertes azotées (pertes urinaires, fécales, ...)(Pencharz and Ball, 2003). La perte d'azote obligatoire a été estimée à 54 mg/kg/j, correspondant à un besoin protéique de 0,34 g/kg/j pour une protéine idéale avec un rendement de 100%. Sur la base du bilan azotée, le besoin a été établi à 0,66 g/kg/j de protéines pour un adulte en bonne santé (FAO/WHO/UNU Expert Consultation et al., 2007). Comme il existe une variabilité interindividuelle au sein de la population, deux écarts-types (12,5%) ont été ajoutés à ce besoin moyen pour définir la recommandation d'apport en protéines de 0,83 g/kg/j, correspondant à un ratio protéines/énergie (PE) de 10-15%.

Cette méthode du bilan azotée est utilisée pour le besoin protéique des adultes en bonne santé. Lorsque l'individu est dans un état physiologique différent (croissance, grossesse ou allaitement), la méthode factorielle est privilégiée car elle tient compte des besoins spécifiques supplémentaires de ces situations. Cette méthode consiste à calculer le besoin en protéines en faisant la somme du besoin d'entretien défini à partir du bilan azoté chez l'adulte, et du besoin supplémentaire pour le dépôt et la production de protéines additionnelles associés à la croissance, la gestation ou l'allaitement, pondéré par l'efficacité d'utilisation des protéines ingérées pour la synthèse de ces protéines (FAO/WHO/UNU Expert Consultation et al., 2007).

1.1.4.B. Qualité des protéines

Les protéines alimentaires peuvent être distinguées selon leur qualité, définie comme leur capacité à répondre aux besoins en azote et à fournir les besoins en acides aminés indispensables pour assurer le renouvellement des protéines corporelles (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 2007). La qualité est influencée par le profil en acides aminés de la protéine, mais aussi par sa digestibilité (FAO/WHO/UNU Expert Consultation, 2011).

Les protéines d'origine animale (œuf, lait, viande, poisson) sont de meilleure qualité que celles d'origine végétale (blé, riz, soja, lentilles, ...). Elles ont un profil en acides aminés équilibré, et donc une meilleure qualité. Les protéines d'origine végétale sont en effet souvent limitantes en certains acides aminés indispensables (généralement lysine pour les céréales et méthionine ou cystéine pour les légumineuses).

1.2. Variation des niveaux d'apports protéiques dans le régime alimentaire

Un apport journalier en protéines est nécessaire pour le maintien des tissus et des fonctions physiologiques. Différents processus de détection et de signalisation modulant le métabolisme protéique et énergétique ainsi que le comportement alimentaire sont mobilisés pour atteindre et maintenir un statut protéique équilibré. Aujourd'hui, il existe de nombreuses études qui se sont intéressées à ces mécanismes face à différentes teneurs en protéines classées comme élevées (plus de 25-30% d'énergie sous forme de protéines), normale (10-20% d'énergie), modérément restreinte (5-8% d'énergie), ou sévèrement restreinte (2-3% d'énergie)(Tomé et al., 2020).

1.2.1. Les régimes hyperprotéiques

Les régimes hyperprotéiques sont utilisés dans un objectif de contrôle du poids, comme stratégie de perte de masse grasse et de maintien de la masse maigre. Dans ces régimes, les protéines sont substituées aux lipides et éventuellement aux glucides. Lorsqu'il s'agit de régimes hypocaloriques, la diminution de l'ingéré calorique total se fait sur la part des lipides et des glucides sans modifier l'ingérer protéique ce qui augmentent la part relative des protéines dans l'ingéré total. Lorsqu'il s'agit de régimes normo-caloriques, l'augmentation de la teneur en protéines permet une réduction des autres nutriments énergétiques et il y a donc augmentation de l'ingéré protéique total.

Les régimes enrichis en protéines sont aussi largement utilisés par les sportifs dans le but de maîtriser leur poids et de développer leur masse musculaire. Dans ces conditions, l'ingéré protéique peut augmenter de façon significative mais la démonstration que l'augmentation de la prise protéique au-delà d'un certain niveau a des effets significatifs sur la masse musculaire reste discutée.

A partir d'une certaine teneur en protéines (au-delà de 50% de l'apport énergétique), l'augmentation de l'excrétion urinaire de l'azote résultant du catabolisme des acides aminés est suspectée d'effets potentiellement délétères. Cependant, chez les individus qui ne souffrent d'aucun problème rénaux, il a été montré que les régimes hyperprotéiques induisent rapidement des réponses adaptatives augmentant les étapes d'oxydation des acides aminés excédentaires dans le foie et que du fait des capacités importantes de l'uréogénèse et de la filtration glomérulaire, des effets délétères sur les reins n'ont pas été observés chez le rat (Azzout et al., 1984; Jean et al., 2001; Stepien et al., 2016).

1.2.1.A. La prise alimentaire

Les régimes hyperprotéiques ont tendance à réduire la prise alimentaire. Il a été montré que ces effets sur la consommation sont modérés mais peuvent perdurer sur une longue période (Jean et al., 2001; Lacroix et al., 2004). Cela est dû à l'effet satiétogène des protéines, qui est plus important et dure plus longtemps qu'avec les autres macronutriments (Bensaïd et al., 2003, 2002; Marmonier et al., 2000), ce qui entraîne une réduction de la prise alimentaire (Westerterp-Plantenga, 2008). Cet effet est lié en particulier à la stimulation par les protéines de la sécrétion postprandiale de peptides gastro-intestinaux anorexigènes tels que la cholécystokinine (CCK) ou le

peptide YY (PYY) (Batterham et al., 2006; Journal et al., 2012; Veldhorst et al., 2008). De plus, la plus faible palatabilité des protéines par rapport aux glucides et aux lipides (Bensaïd et al., 2003; Jean et al., 2001) réduit la motivation sensorielle, comme cela peut être observé avec des régimes gras et sucrés, et induit aussi une prise alimentaire mieux contrôlée par les besoins strictement liés à la régulation énergétique.

1.2.1.B. La dépense énergétique

Il a été montré dans plusieurs études que les régimes hyperprotéiques avaient la capacité de moduler l'expression des protéines de découplage UCP (Petzke et al., 2007). La consommation de régimes hyperprotéiques semble augmenter la quantité d'UCP1 dans le tissu adipeux brun par rapport à un niveau protéique standard (Petzke et al., 2005). Ces protéines sont à l'origine de la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, ce qui a pour conséquence d'augmenter la dépense énergétique totale de l'individu. La démonstration que ce mécanisme participe effectivement à une augmentation de la dépense énergétique et à une perte de poids reste à faire, d'autant que chez l'Homme, ce mécanisme n'a pas été démontré du fait de la quantité faible de tissu adipeux brun.

1.2.1.C. Le poids et la composition corporelle

Les effets des régimes hyperprotéiques sur la prise alimentaire, et dans une moindre mesure la dépense énergétique, tendent à améliorer le poids corporel et à réduire la prise de masse grasse. En effet, Pichon et al. ont montré que l'augmentation des protéines dans le régime avait pour effet de réduire la prise de poids de manière générale (Pichon et al., 2008). Il a été montré chez l'Homme et chez l'animal que cette réduction globale du poids est le résultat d'une part de la réduction de la masse grasse et d'autre part du maintien de la masse maigre (Blouet et al., 2006; Lacroix et al., 2004; Pichon et al., 2006; Skov et al., 1999).

Chez le rat, le tissu adipeux blanc est réduit lorsqu'ils sont nourris avec un régime hyperprotéique (50%) par rapport à un régime normo-protéique avec en outre une réduction de la stéatose hépatique (Lacroix et al., 2004). En plus d'une diminution de la taille du tissu adipeux, il a été montré que la taille des adipocytes était aussi diminuée par l'augmentation de la consommation protéique (Blouet et al., 2006). La diminution de la masse graisseuse peut être expliquée par une diminution de la lipogenèse induite par les régimes hyperprotéiques (Blouet et al., 2006).

Au vu de ces résultats, des études ont été menées chez des individus obèses, mais les résultats semblent encore incertains. En effet, il a été proposé qu'en restriction énergétique les régimes hyperprotéiques pouvaient être plus efficaces que des régimes normo-protéiques pour réduire la faim grâce à l'effet satiétogène des protéines, et maintenir la masse maigre (Westerterp-Plantenga, 2008). Cependant, dans ces conditions, la perte de poids engendrée par la restriction calorique était similaire avec les régimes hyperprotéiques et normo-protéiques (Chevalier et al., 2005), ce qui suggère que les régimes riches en protéines n'augmentent pas la dépense énergétique. D'autre part, le maintien de la masse maigre n'a pas été systématiquement observé (Adechian et al., 2012; Schollenberger et al., 2015). Ainsi c'est le fait que les individus en surpoids soient en restriction énergétique qui prédomine plutôt que la teneur en protéines du régime. L'intérêt de ce type de régime est cependant que sur le long-terme, les individus avec un régime

hypocalorique/hyperprotéique semblent mieux adhérer à leur régime et donc la reprise de poids observée le plus souvent est plus tardive et plus faible.

1.2.2. Les régimes hypo-protéiques

Contrairement aux régimes hyperprotéiques, il semble que l'impact des régimes hypo-protéiques est beaucoup plus important. En effet, il est nécessaire que l'apport en protéines ne soit pas inférieur à une certaine valeur, variable selon les besoins physiologiques (FAO/WHO/UNU Expert Consultation et al., 2007).

1.2.2.A. La prise alimentaire

1.2.2.A.a. Augmentation de la prise alimentaire par la diminution des protéines

Lorsque la teneur en protéines du régime est diminuée, la prise alimentaire peut être augmentée afin de maintenir un apport protéique total constant, ou au moins de réduire le déficit d'apport. Déjà en 1968, Rozin et al. montrait chez le rat que plus la quantité de protéines dans le régime était faible plus ils consommaient de ce régime pour tenter de préserver leur apport protéique (Rozin, 1968). Dans cette idée, de nombreuses études ont montré chez l'Homme et chez les rongeurs que les régimes avec une réduction modérée de protéines induisent une augmentation de la prise alimentaire (Aparecida de França et al., 2009; Gosby et al., 2011; Griffioen-Roose et al., 2011; Pezeshki and Chelikani, 2021; Swick and Gribbskov, 1983; White et al., 2000; Wu et al., 2021). Ainsi, il semble que l'organisme puisse sacrifier, au moins partiellement, la régulation énergétique pour assurer l'homéostasie protéique.

On distingue dans les études 3 niveaux d'effets, selon le degré de déficience en protéines. En premier lieu, l'augmentation de la prise alimentaire est maximisée lorsque le niveau d'apport en protéines est juste en dessous des besoins (environ 8-12% de l'énergie), où elle permet donc de restaurer avec succès l'équilibre azoté (Du et al., 2000, p. 200; Pol and den Hartog, 1966; Specter et al., 1995; White et al., 2000, 1994). Dans un deuxième temps, l'augmentation de la prise alimentaire ne semble pas permettre de palier complètement la déficience en protéine. Il a été montré chez le rat, même avec une augmentation de la prise alimentaire, que la concentration plasmatique en acides aminés était plus faible par rapport à un régime témoin normo-protéique (Aparecida de França et al., 2009).

L'un des mécanismes proposés pour expliquer l'augmentation de la prise alimentaire en réponse à des régimes faibles en protéines serait le fait que la quantité de protéines dans le régime peut conduire à une modulation du ratio tryptophane/acides aminés neutres (AAN). La synthèse de la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine, qui se fait à partir du tryptophane, est dépendante de ce ratio (Fernstrom and Wurtman, 1997). En effet, le tryptophane peut moins facilement atteindre les neurones sérotoninergiques lorsque la concentration en AAN est élevée (ratio tryptophane/AAN faible) et vice-versa, car le tryptophane et les AAN sont en concurrence pour le même transporteur au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Ainsi, ce ratio augmenté par la réduction des protéines dans le régime pourrait conduire à une forte synthèse de sérotonine, et encourager les

rats à augmenter leur prise alimentaire (Wurtman and Fernstrom, 1975). Cependant, les protéines ne sont pas les seuls à influencer le ratio tryptophane/AAN. En effet, l'ingestion de glucides conduit à l'augmentation de l'insulinémie qui entraîne une diminution des AAN, à laquelle échappe le tryptophane. Les glucides conduisent donc aussi à une augmentation du ratio tryptophane/AAN, de la sécrétion de sérotonine et donc de l'hyperphagie (Wurtman and Fernstrom, 1975). La réduction des protéines au profit des glucides entraîne alors une augmentation d'autant plus importante de ce processus. La **Figure 4** ci-dessous représente ce mécanisme. Un autre mécanisme possible est, à l'inverse des régimes hyperprotéiques, que les régimes faibles en protéines réduisent la sécrétion de CCK, ce qui conduit alors à l'hyperphagie (Morrison and Laeger, 2015).

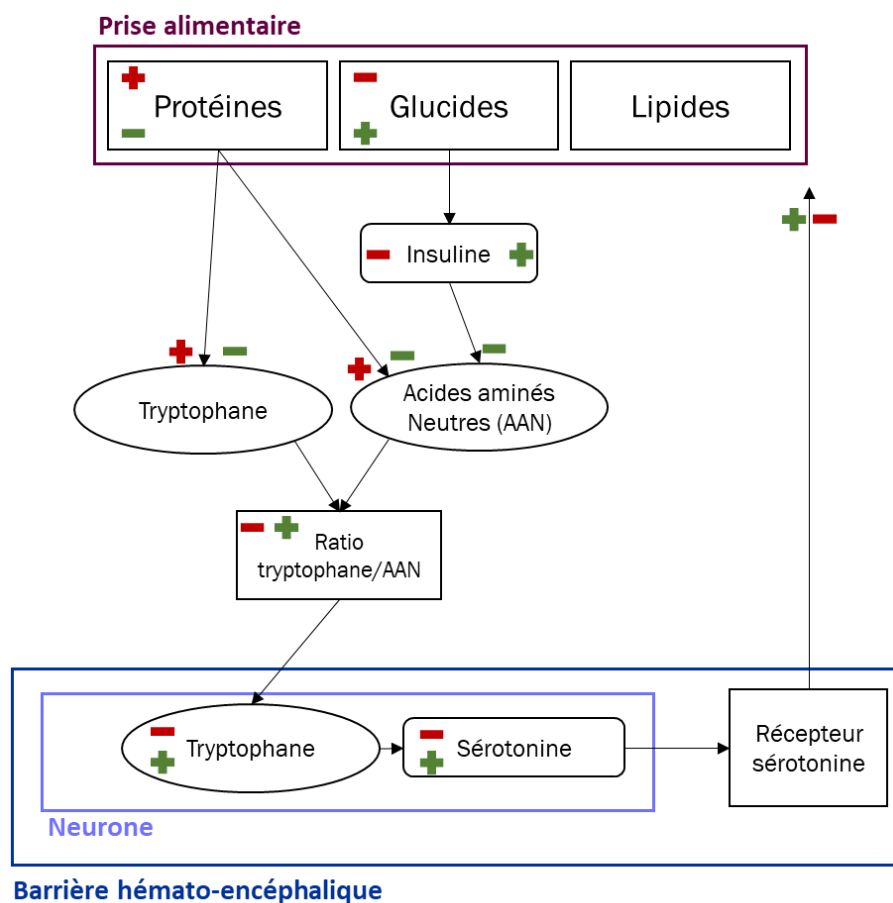


Figure 4. Mécanisme de contrôle de la prise alimentaire via le ratio tryptophane/acides aminés neutres (AAN) et la sécrétion de sérotonine.

En rouge : un niveau élevé de protéines augmente le ratio tryptophane/AAN conduisant à une réduction de la synthèse de sérotonine et une diminution de la prise alimentaire (effet satiétogène).

En vert : les glucides conduisent à une captation des AAN, et la faible teneur en protéines à une faible concentration en acides aminés dans le plasma. Le ratio tryptophane/AAN élevé permet un passage du tryptophane dans les neurones qui est alors disponible pour la synthèse de sérotonine. La prise alimentaire est alors augmentée (effet hyperphagique).

1.2.2.A.b. Rejet des régimes à déficience sévère en protéines

Ce processus de compensation présente cependant des limites, car il est possible uniquement jusqu'à un certain niveau de protéines. Lorsque le régime contient une quantité de protéines très

faible (< 5%) ne permettant pas d'adaptation, la prise alimentaire est alors réduite suite au déclenchement de mécanismes aversifs vis-à-vis du régime proposé (Du et al., 2000; Morrison and Laeger, 2015). Cette aversion est un mécanisme inné permettant à l'organisme d'éviter les régimes déficients en protéines (Gietzen, 1993; Morrison et al., 2012), et plus généralement déficients en un composant essentiel aux régulations métaboliques. Il serait mis en place dans le cortex piriforme antérieur (Leung and Rogers, 1971), et aurait pour origine la baisse des acides aminés dans le liquide cébrospinal activant des modifications de la prise alimentaire (Gietzen et al., 2007). Il a notamment été établi que la consommation d'un repas déficient en au moins un acide aminé indispensable réduit les concentrations de celui-ci dans le plasma, dans le liquide céphalo-rachidien et dans le cerveau où cette déplétion est détectée par la liaison de l'ARNt désacylé à la kinase GCN2 (general control non-depressible-2) (Hao et al., 2005), conduisant à l'activation des circuits excitateurs glutamatergiques qui entraînent la modification du comportement alimentaire (Anthony and Gietzen, 2013). La déficience en protéines ou en acides aminés est ainsi très rapidement détectée en relation avec la baisse des acides aminés dans le plasma, entraînant une diminution rapide de la prise alimentaire. Chez l'homme, un régime protéique déficient est aussi détecté conduisant à une diminution de la prise alimentaire par une suppression des signaux de faim (Nieuwenhuizen et al., 2009; Veldhorst et al., 2009).

1.2.2.A.c. Augmentation de l'appétence pour les protéines par la diminution des protéines

En parallèle de l'augmentation de la prise alimentaire, la réduction des protéines dans le régime a aussi tendance à induire une augmentation de la préférence et de l'appétit pour les protéines. Les mécanismes de contrôle de l'appétit pour les protéines sont caractérisés par divers signaux impactant les voies métaboliques périphériques et centrales de la motivation alimentaire et du choix des aliments, dont notamment les mécanismes de récompenses, dans le but d'atteindre et de maintenir un statut protéique équilibré (Tomé et al., 2020, 2019). En effet, il semble que quand le choix est possible, l'hyperphagie mise en place dans le cadre d'une réduction protéique est associée à une préférence pour les protéines ou les régimes riches en protéines (Chaumontet et al., 2018; Tomé et al., 2020). Chez l'animal et l'Homme, il a été montré qu'une déficience modérée en protéines produite par des régimes faibles en protéines ou une privation de protéines induit un appétit spécifique pour les protéines (Booth, 1974; Gibson et al., 1995).

En 2018, l'étude de Chaumontet et al. suggère que le statut protéique module le comportement alimentaire par le biais des voies centrales de la récompense notamment au niveau du noyau accumbens (NAcc), qui est une région du cerveau impliquée dans le circuit de la récompense (Fulton, 2010). Il a été mis en évidence que les rats, préalablement nourris avec un régime faible en protéines, puis ayant accès à des régimes à teneurs en protéines variables, ont une préférence pour les régimes à plus hautes teneurs en protéines (**Figure 5**). Il a aussi été montré que chez ces rats, l'activation neuronale du NAcc est significativement et positivement liée à la teneur en protéines de leur régime (Chaumontet et al., 2018), contrairement aux rats préalablement nourris avec un régime normo-protéique (14%), où ce résultat n'était pas observé.

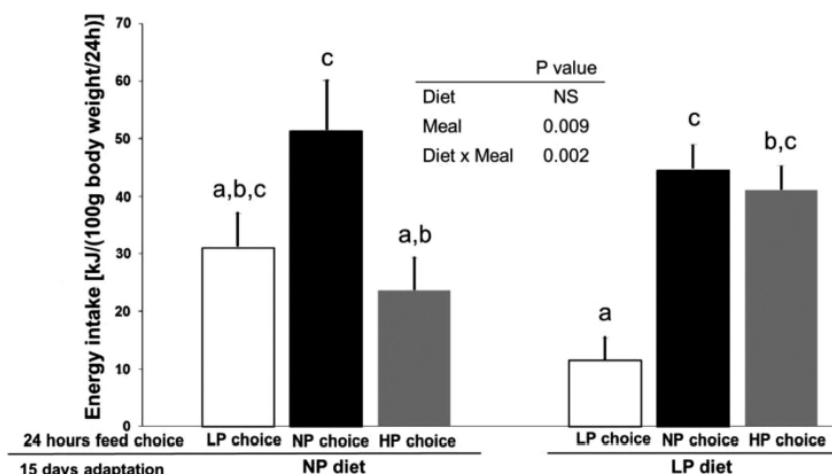


Figure 5. Choix alimentaire sur 24h entre les régimes "Low-Protein" LP, "Normo-Protein" NP et "High-Protein" HP chez des rats préalablement adaptés pendant 15 jours avec soit un régime NP soit un régime LP.

Les rats préalablement nourris avec le régime NP ont montré une préférence pour le régime NP. Ceux préalablement nourris avec le régime LP ont montré une préférence pour les régimes NP et HP. La combinaison des choix entre les repas LP, NP et HP a conduit au même apport énergétique total pour les rats préalablement adaptés au régime LP et NP.

LP = 6% de protéines par énergie; NP = 14%; HP = 50%. Les valeurs représentées sont les moyennes $\pm$ les écarts-type. Les moyennes marquées sans lettre commune sont différentes ($P < 0,05$). (Chaumontet et al., 2018)

1.2.2.B. La dépense énergétique

Contrairement aux régimes hyperprotéiques, il semble mieux établi que la consommation de régimes faibles en protéines induit une augmentation de la dépense énergétique.

Certaines études ont suggéré que l'augmentation de la dépense énergétique avec des régimes faibles en protéines est consécutive à l'augmentation de la prise alimentaire et permettrait de compenser du moins en partie l'excédent d'apport énergétique et de limiter la prise de poids (Blais et al., 2018; Chaumontet et al., 2019; Du et al., 2000; Pezeshki et al., 2016). Cependant, d'autres études suggèrent que l'augmentation de la dépense énergétique peut être observée même si la prise alimentaire est contrôlée de façon à empêcher l'hyperphagie et serait plutôt une forme d'adaptation métabolique qui induirait l'augmentation de la prise alimentaire de façon à permettre de réduire le déficit d'apport protéique (Hill et al., 2018, 2017; Laeger et al., 2016; Rothwell and Stock, 1987).

Les mécanismes qui sous-tendent l'augmentation de la dépense énergétique restent discutés. En 2016, Aparecida de França et al. ont mis en évidence une augmentation de l'UCP1 et de la température au niveau du tissu adipeux brun chez les animaux en restriction protéique (Aparecida de França et al., 2016). Cependant, en 2018, Blais et al. ont montré chez la souris que la dépense énergétique de repos était identique chez des souris nourries avec un régime à 20% et un régime à 6% de protéine, aussi bien lorsque les souris étaient logées à neutralité thermique (32 °C) que lorsqu'elles étaient logées à 22 °C (Blais et al., 2018). Ils en ont donc conclu que ni le métabolisme basal, ni le coût de la thermorégulation n'étaient augmentés par un régime pauvre en protéines. Dans la même étude, ils ont cependant clairement mis en évidence que la dépense énergétique totale était plus élevée avec un régime faible en protéines ce qui impliquait que la dépense énergétique liée à l'activité, et/ou la thermogenèse alimentaire était augmentée. Certaines études

ont en effet montré une augmentation du niveau d'activité physique chez le rat (Beaton et al., 1964) et chez la souris (Blais et al., 2018), et éventuellement du coût énergétique du mouvement (Blais et al., 2018). Cette augmentation d'activité motrice n'est cependant pas observée, et il y a au contraire une baisse importante, lorsque les rats sont restreints à la fois en protéines et en énergie (Even et al., 2003) ce qui suggère qu'elle pourrait être liée à l'augmentation de la prise alimentaire. D'autres études ont aussi montré que l'augmentation de la dépense énergétique pouvait provenir d'une augmentation de la thermogénèse alimentaire (Rothwell et al., 1983; Swick and Gribbskov, 1983; Zhao et al., 1996) mais au sein de la même équipe, il a pu être observé une augmentation de la thermogénèse chez le rat (Even et al., 2003) mais pas chez la souris (Blais et al., 2018). Il semble donc établi que la dépense énergétique totale est augmentée avec un régime pauvre en protéine, mais les mécanismes sous-jacents restent à préciser.

1.2.2.C. Le poids et la composition corporelle

Comme nous avons pu le voir précédemment, avec un régime faible en protéines, il y a un phénomène de compensation de l'augmentation de la prise alimentaire par une augmentation de la dépense énergétique. Ce processus permet de limiter mais pas de supprimer l'impact sur le poids. Il a été rapporté que les différences de composition corporelle d'animaux avec des régimes hypo-protéiques et normo-protéique étaient faibles mais bien présentes. Chez la souris, la diminution des protéines engendre généralement une augmentation du poids corporel, de l'adiposité et de quantité de gras (Blais et al., 2018; Du et al., 2000; Huang et al., 2013). Enfin, chez le jeune rat, la croissance semble être affectée par la réduction de protéines dans le régime (Hartsook et al., 1973; Hegsted and Neff, 1970). Une autre étude a cependant montré que chez le rat en croissance, un régime hypo-protéique n'induit pas de poids corporel plus faible, comme chez le rat adulte, mais une adiposité plus importante (Aparecida de França et al., 2009).

1.2.3. La signalisation de l'adéquation des apports protéiques

L'un des éléments essentiels de la survie des êtres vivants est la capacité à s'adapter aux changements de l'environnement. Dans le cas de changements nutritionnels (augmentation ou réduction d'apport de nutriments), comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents dans le cas des protéines, il peut y avoir des effets indésirables sur l'organisme et il est donc important que certains mécanismes se mettent en place pour réguler l'homéostasie (Tomé et al., 2020). Ainsi, des modifications métaboliques sont nécessaires, soit pour adapter les apports soit pour palier la déficience, et se mettent en place, coordonnées par des hormones directement ou indirectement liées à la consommation de certains nutriments. Dans le cas d'une baisse des protéines ingérées, les signaux comprennent de faibles concentrations plasmatiques d'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), de leptine et d'insuline, des concentrations plasmatiques élevées de ghréline et de Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21), des niveaux élevés de neuropeptide Y (NPY) et d'hormone de libération de la corticotrophine (CRH) et un faible niveau de pro-opiomélanocortine (POMC) dans l'hypothalamus, ainsi qu'une sensibilité accrue aux aliments riches en protéines par une activité de récompense liée aux opioïdes et à la dopamine.

Du fait des récents résultats sur l'importance de l'action de FGF21 dans les mécanismes de réponses à la déficience en protéines, nous avons choisi de nous y intéresser tout particulièrement.

FGF21 est une hormone appartenant à la famille des facteurs de croissance des fibroblastes. Chez l'Homme comme chez le rongeur, elle s'exprime dans de nombreux tissus (**Figure 6**) (Hill et al., 2019; Staiger et al., 2017), mais est principalement exprimée dans le foie (Chaumontet et al., 2019; Hill et al., 2018; Laeger et al., 2014). Il est aujourd'hui largement admis que FGF21 est nécessaire à la mise en place des réponses comportementales et métaboliques à la restriction protéique (Chaumontet et al., 2019; Gosby et al., 2016; Hill et al., 2019, 2018, 2017; Laeger et al., 2014). Les régimes à faible teneur en protéines induisent, alors que les régimes à haute teneur en protéines réduisent, la production hépatique et les concentrations plasmatiques de FGF21. Il a été montré qu'une diminution même modérée des protéines dans le régime multiplie par six les niveaux plasmatiques de FGF21 (Gosby et al., 2016).

L'effet des protéines sur FGF21 passe par la voie GCN2, qui est un acteur central de la signalisation de la restriction protéique et de la disponibilité des acides aminés. En effet, FGF21 est sous le contrôle de GCN2, lui-même lié à la quantité d'acides aminés libres (Laeger et al., 2014). Ainsi la sécrétion de FGF21 est directement liée à la concentration en acides aminés, et il a été montré que la restriction en un seul acide aminé était capable d'engendrer la sécrétion de FGF21.

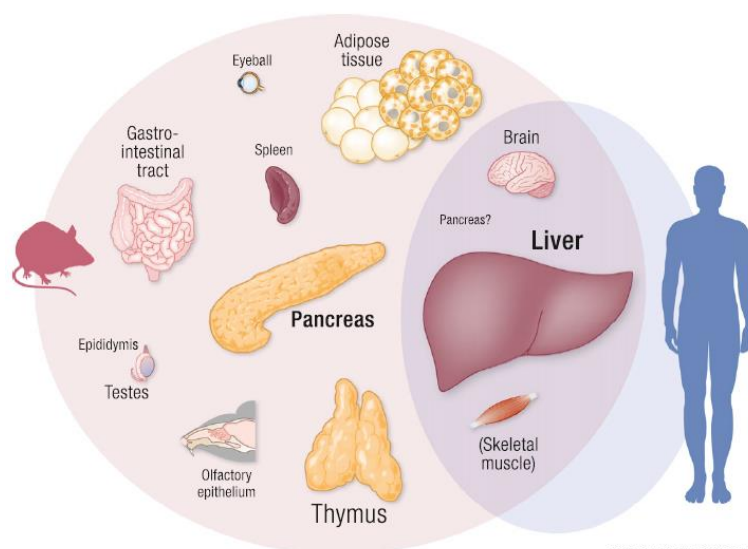


Figure 6. Comparaison des principaux sites d'expression anatomique du FGF21 chez la souris et l'Homme. Les sites d'expression les plus importants sont mis en évidence par l'utilisation de caractères gras. L'intensité de l'expression est indiquée par la taille de la police/de l'image. (Staiger et al., 2017)

FGF21 est impliquée dans le contrôle de différents processus métaboliques tels que l'oxydation des lipides (inhibition de la lipogenèse), la céto-genèse, la gluconéogenèse, l'absorption du glucose et la thermogenèse. Ces actions interviennent dans de nombreux organes et tissus tels que le muscle squelettique, le tissu adipeux, le pancréas, le système nerveux central et les os (Gimeno and Moller, 2014). En réponse à la restriction protéique, les mécanismes d'adaptation de la dépense énergétique et du comportement alimentaire, décrits précédemment, sont mis en place notamment par l'action de FGF21. En effet, l'augmentation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Laeger et al., 2014) ne s'observe pas chez les souris KO-FGF21 en restriction protéique, ce qui indique l'importance de FGF21 dans les adaptations à la déficience en protéines.

En plus de la restriction protéique, il existe d'autres facteurs pouvant induire une sécrétion de FGF21. Il a notamment été montré que l'apport en glucides avait lui aussi un lien avec FGF21 (BonDurant and Potthoff, 2018; von Holstein-Rathlou et al., 2016). Actuellement, il n'y a pas encore de consensus sur l'interaction entre les niveaux d'apport protéique et glucidique pour contrôler la réponse de FGF21 car, dans la plupart des études, les restrictions protéiques ont été faites au détriment des glucides afin de maintenir la teneur en graisses. Une seule étude a cherché à faire varier les niveaux de protéines et de glucides dans les régimes de façon non symétrique pour tenter de répondre à cette question (Solon-Biet et al., 2016). Les auteurs ont conclu que le niveau de protéines alimentaires était de loin le facteur principal affectant FGF21, mais ils ont également remarqué que les réponses les plus importantes se produisaient avec les régimes à la fois pauvres en protéines et riches en glucides, et donc que les glucides affectaient également, mais dans une moindre mesure, les taux plasmatiques de FGF21.

1.2.4. L'effet levier des protéines

1.2.4.A. L'hypothèse

L'hypothèse de l'effet levier des protéines (ou « *protein leverage hypothesis* ») proposée par Simpson et Raubenheimer (Simpson and Raubenheimer, 2005), et récemment mise à jour (Raubenheimer and Simpson, 2019), propose que le contrôle très précis de l'apport protéique a le potentiel d'induire des changements dans l'apport énergétique, et plus précisément une tendance à consommer davantage, pouvant engendrer une augmentation significative du gain de poids et de masse grasse, en réponse à des variations relativement faibles en protéines dans l'alimentation (Du et al., 2000; Sørensen et al., 2008).

Les protéines ne représentent qu'une faible partie de l'apport énergétique totale, par rapport aux glucides et aux lipides. Cependant, l'apport protéique est essentiel et ne peut pas être compensé, contrairement aux glucides et aux lipides, par une augmentation de l'apport des autres macronutriments. Selon Simpson et Raubenheimer, c'est pour cela que de petites diminutions de l'apport protéique sont capables d'engendrer des modifications importantes de la prise alimentaire et de perturber l'équilibre énergétique. La **Figure 7** illustre ce modèle. Si le niveau de consommation protéique diminue de 14 à 12,5%, avec un effet levier complet pour maintenir le même niveau de protéine, il est alors nécessaire d'augmenter la consommation énergétique totale de 14%.

Ce mécanisme permet de préserver l'apport protéique avec des régimes de teneur protéique légèrement plus faible que le besoin. Cette augmentation de l'apport énergétique dans le but de préserver l'apport protéique engendre des perturbations du métabolisme énergétique. Si aucun mécanisme de compensation n'est mis en place (augmentation de la dépense énergétique par exemple par l'activité physique), il y a alors obligatoirement une augmentation du poids et à long terme une augmentation du risque de surpoids et d'obésité.

- Niveau d'ingestion protéino-énergétique optimal
- ⊗ Préservation du niveau d'ingestion protéique optimal (Effet levier complet)
- ⊗ Préservation du niveau d'ingestion énergétique optimal (Effet levier nul)

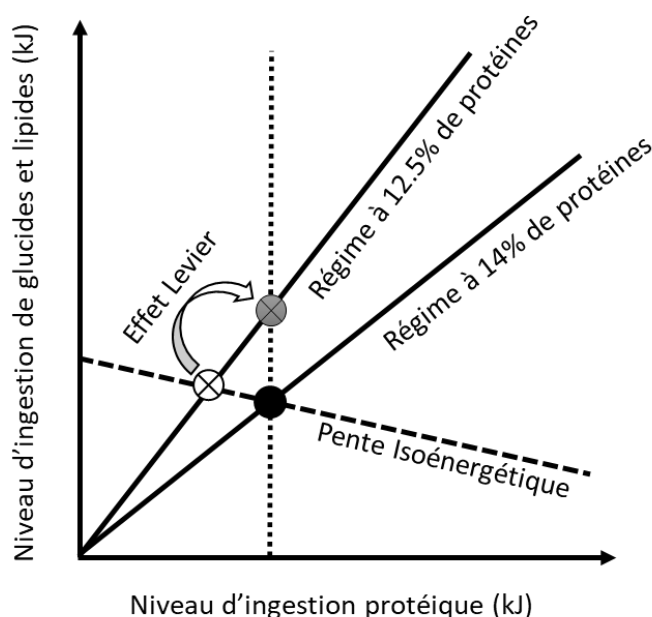


Figure 7. Représentation du concept de "Protein Leverage" dérivé du modèle de Simpson et Raubenheimer.

La figure représente le niveau d'ingestion des protéines vs. le niveau d'ingestion des glucides-lipides selon la teneur en protéines du régime, soit dans cet exemple 14% vs. 12,5% (nb : les échelles ne sont pas respectées pour plus de visibilité du mécanisme). (Gehring et al., 2020)

Si on considère comme optimal chez l'Homme un niveau d'apport protéique de 14% dans l'alimentation, les niveaux d'ingestion protéique, glucidiques et lipidiques qui s'établissent sur ce régime sont optimaux (point noir). Si le niveau d'ingestion protéique est défendu aux dépens du niveau d'ingestion des glucides-lipides, la baisse de la teneur en protéines de l'alimentation à 12,5% va obliger à consommer davantage de glucides-lipides (~ +14%) pour maintenir le niveau d'apport protéique optimal (évolution du point noir vers le point gris). Si, au contraire, c'est la régulation énergétique qui prédomine, la prise de glucides-lipides et de protéines va glisser le long de la pente iso-énergétique, la prise alimentaire totale va rester constante et le niveau d'ingestion protéique va baisser en proportion de la baisse de la teneur en protéines dans l'alimentation (évolution du point noir au point blanc).

1.2.4.B. Protéine et obésité

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité est considérée comme une maladie depuis 1997. Elle est décrite comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle conduisant à un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m². A l'échelle mondiale, l'OMS rapporte que la prévalence d'obésité a quasiment triplé depuis 1975. En 2016, 1,9 milliards d'adultes étaient en surpoids (39%) et 650 millions étaient obèses (13%). La même année, 38 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient considérés en surpoids ou obèses. Les mécanismes qui conduisent à l'obésité sont complexes. De façon simplifiée, la prise de poids conduisant à l'obésité provient d'un déséquilibre du bilan énergétique du fait d'un apport énergétique trop important (consommation calorique excessive), et/ou d'une dépense énergétique trop faible (sédentarité). Au niveau mondial, il y a en effet une augmentation de la consommation d'aliments très caloriques riches en lipides d'une part, et d'autres part une augmentation du manque d'activité physique en raison de l'urbanisation, de l'évolution des modes de travail et de transport. L'obésité a des impacts délétères sur la santé et la mortalité. Un IMC élevé est un facteur

de risque de nombreuses maladies : maladie cardiovasculaire (cardiopathies et AVC), diabète de type 2, troubles musculosquelettiques (arthrose) et certains cancers (endomètre, sein, ovaires, prostate, foie, vésicule biliaire, rein et colon). On parle alors de dysfonction métabolique ou syndrome métabolique.

Les glucides et les lipides ont largement été mis en cause dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité, notamment du fait que la consommation, que ce soit en termes de quantité ou de qualité, de ces deux macronutriments a été très impactée par les transitions alimentaires de la fin du XXe siècle. L'augmentation de la consommation des aliments ultra-transformés à forte densité énergétique riches en sucres et lipides a eu lieu en même temps que l'augmentation de la prévalence de surpoids et d'obésité.

Même si le fait que les taux circulants d'acides aminés impactent la prise alimentaire était déjà montré, il faut attendre la toute fin du XXe siècle pour que le lien entre protéines et prise alimentaire commence à être étudié. En 1981, Emmans fut l'un des premiers à proposer que plutôt que de manger pour obtenir de l'énergie, les individus mangent pour optimiser l'apport du nutriment limitant, c'est-à-dire les protéines (Emmans, 1981). Quelques années plus tard, Webster défendait alors l'idée que les mécanismes contrôlant l'apport en protéines pourraient devenir prédominants sur ceux contrôlant l'apport énergétique (Webster, 1993). Simpson et Raubenheimer, selon leur hypothèse de l'effet levier (Simpson and Raubenheimer, 2005), ont montré qu'il y a une corrélation entre la diminution de la consommation de protéines entre 1970 et 2000 et la prévalence d'obésité chez des adultes dans 13 pays développés (**Figure 8**).

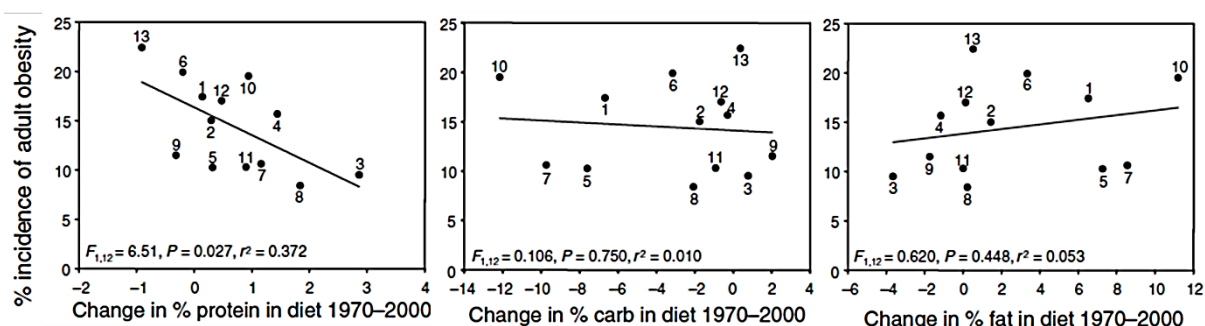


Figure 8. Evolution du pourcentage d'énergie sous forme de macronutriments par rapport à la prévalence d'obésité chez les adultes au début des années 1990.

Les représentations comprennent les régimes alimentaires de 13 pays développés sur la période 1970-2000. Les données alimentaires proviennent de la base de données FAOSTAT et représentent l'apport en nutriments plutôt que la consommation. 1 Australie; 2 Canada; 3 Danemark; 4 Finlande; 5 France; 6 Allemagne; 7 Italie; 8 Pays-Bas; 9 Nouvelle-Zélande; 10 Espagne; 11 Suède; 12 Royaume-Uni; 13 États-Unis. (Simpson and Raubenheimer, 2005)

1.2.4.C. Controverse autour de l'hypothèse

Il n'y a pas aujourd'hui de preuve formelle de l'hypothèse de l'effet levier, car aucune étude n'a montré directement le lien entre augmentation de la prévalence de l'obésité et diminution de la consommation protéique. Cependant, certaines études récentes présentent des résultats en accord avec cette hypothèse (Lieberman et al., 2020; Simpson and Raubenheimer, 2020). Chez l'Homme, certains résultats suggèrent un effet levier des protéines (Gosby et al., 2011; Hall, 2019; Raubenheimer and Simpson, 2019; Saner et al., 2020; Simpson et al., 2003; Sørensen et al., 2008), mais l'augmentation observée de l'apport énergétique est plus faible que prévu (Martens et al., 2014, 2013) car limitée par les mécanismes qui régulent l'apport énergétique.

En effet, certaines études ont montré que la surconsommation énergétique développée dans le cadre de l'effet levier pouvait être compensée par une augmentation de la dépense énergétique, ce qui réduit l'accumulation de graisse. Ces résultats ont été montrés chez le rat (Chaumontet et al., 2019; Du et al., 2000; White et al., 1994), chez la souris (Blais et al., 2018) et chez l'Homme (Vinales et al., 2019). Cependant, l'augmentation de la dépense énergétique avec des régimes hypo-protéinés n'est pas encore totalement établie, comme montré précédemment. Certaines hypothèses suggèrent que cette réponse pourrait être mise en place après l'augmentation de la consommation protéique ou à l'inverse pourrait être le précurseur de cette augmentation. En effet, la dépense énergétique plus élevée induite par les régimes faibles en protéines peut être observée en l'absence d'hyperphagie (Hill et al., 2018, 2017; Rothwell and Stock, 1987). Les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la dépense énergétique sont eux aussi incertains et pourraient être une augmentation de la thermogénèse induite par le régime, de l'activité thermogénique dans le tissu adipeux et les muscles, et/ou de l'activité spontanée (Aparecida de França et al., 2014, 2009; Blais et al., 2018; Chartoumpekis et al., 2011; Fisher et al., 2012; Pezeshki et al., 2016).

Comme cela a été montré en 2019 dans une étude sur la prévalence de l'obésité aux USA depuis 1970, l'effet levier des protéines seul ne peut expliquer au maximum que 2/3 du gain de poids (Hall, 2019). Ainsi, d'autres paramètres de l'alimentation sont impliqués dans l'augmentation de l'obésité et notamment la teneur en sucres et en matières grasses, la palatabilité, la densité énergétique, la teneur en vitamines et minéraux ainsi que le rapport n-6/n-3 dans les graisses.

1.3. Modèles de choix alimentaires dans l'étude de la consommation protéique

Les modèles de choix alimentaire reposent sur le principe de laisser les animaux consommer les nutriments séparément et donc de constituer librement leur régime alimentaire. Ces modèles ont été très utilisés au début du XXe siècle pour étudier les besoins en macronutriments, vitamines et minéraux chez les animaux d'élevage puis chez les animaux de laboratoire (Collier et al., 1969; Kanarek, 1985; Richter et al., 1938; Shor-Posner et al., 1991). Ces études ont conduit au concept que l'apport en protéines est contrôlé de manière plus précise que l'apport en glucides et en lipides (Rozin, 1968).

Pour une revue complète des modèles de choix alimentaire voir la revue publiée en 2020 dans le cadre de cette thèse (Even et al., 2021).

1.3.1. Les modèles de choix : capacité à sélectionner et contrôler l'apport protéique

Les animaux apprennent à associer à l'aspect, au goût et à l'odeur d'un aliment les effets qu'il génère dans l'organisme selon sa composition nutritionnelle (Anderson, 1979; Booth, 1974). Dans l'idée que l'organisme a besoin de s'adapter constamment, cet apprentissage se fait souvent très rapidement, afin que suite à un changement de la qualité du ou des aliment(s) disponible(s), les consommations soient rapidement modifiées pour être en adéquation avec les besoins (Deutsch et al., 1989; Steinruck, 1994; Yo et al., 1998). Cette capacité couplée au fait que les protéines nécessitent un contrôle précis permet aux animaux de détecter en quelques heures seulement un changement même faible de la qualité et de la quantité des protéines de leur alimentation (Harper et al., 1970). Cette rapidité d'action a notamment été mise en évidence chez le rat (Li and Anderson, 1982).

Reposant sur cette capacité, les modèles de choix, aussi appelé auto-sélection alimentaire ou « *dietary self-selection* » (DSS), ont été très utilisés dans le cas de la consommation des protéines. Ils consistent à laisser les animaux choisir entre plusieurs régimes ayant une composition variable. Ainsi, il est possible de faire varier la teneur en protéines, et de proposer un choix entre un régime avec une faible teneur en protéines ou même sans protéine, et un autre avec une teneur élevée ou purement protéique. Enfin il est aussi possible de proposer séparément les 3 macronutriments purs (« *macronutrient self-selection* » (MSS)) et de permettre aux animaux de sélectionner leurs apports de façon précise. Toutefois, il faut noter que plus il y a de régimes proposés au choix, plus l'analyse et l'interprétation deviennent complexes.

L'un des problèmes récurrents dans l'utilisation de ces modèles est le fait que les aliments n'ont pas tous la même appétence. Ce problème est d'autant plus important avec les protéines, du fait que la protéine préférentiellement utilisée en laboratoire est la caséine de lait, puisqu'elle est recommandée dans les régimes standards définis pour les rongeurs de laboratoire (Reeves et al., 1993). Cependant, cette protéine donnée pure a une faible appétence, et pendant longtemps a souffert de sa méthode d'isolement par précipitation acide. Ainsi les résultats des premières études étaient fortement impactés par cette faible appétence et ont pu remettre en cause l'hypothèse d'un contrôle précis de la consommation protéique. Ce problème a été largement

résolu dans les années 1980, d'une part du fait de l'amélioration des méthodes d'isolement de la caséine, mais aussi en introduisant dans les protocoles des phases d'adaptation à l'ingestion de caséine pure. Dans une étude de Booth par exemple, le régime protéiné n'était composé que de caséinate de calcium à la place de la caséine brute pour améliorer l'appétence et était incorporé dans des gels d'agar pour masquer les différences gustatives (Booth, 1974). Dans les études réalisées au cours de cette thèse, nous avons utilisé de la protéine totale de lait, mieux équilibrée que la caséine et conservant des propriétés gustatives plus satisfaisantes. La protéine totale de lait a une composition en acide aminés plus équilibrée que la caséine, et surtout est nettement plus palatable.

1.3.2. Le choix protéique : un niveau élevé et défendu

En conditions de choix, où la présentation séparée des macronutriments permet de contrôler l'ingestion protéique indépendamment de l'ingestion énergétique, les rats consomment des niveaux beaucoup plus élevés de protéines que les niveaux considérés comme nécessaires et suffisant sur la base du bilan azoté. Ce niveau d'ingestion protéique spontanée élevé est aussi régulé en fonction de la qualité de la protéine, de la situation environnementale et physiologique (Leibowitz et al., 1991; Makarios-Lahham et al., 2004; Musten et al., 1974; Pol and den Hartog, 1966), ce qui suggère que contrairement aux hypothèses de certains auteurs, il n'est pas le résultat d'une dérive liée à une non-régulation. En effet, il a été suggéré que la sélection d'un apport élevé en protéines est un signe d'absence de contrôle, l'apport protéique étant simplement maintenu au-dessus des niveaux requis pour assurer l'équilibre azoté et en dessous des niveaux pouvant engendrer des adaptations métaboliques coûteuses et éventuellement délétères.

1.3.2.A. Effet de la dilution des protéines

Le niveau de consommation spontanée est une valeur contrôlée par l'organisme. Ainsi même lorsque des modifications de concentration de la source protéique surviennent, des ajustements de la prise alimentaire permettent de préserver le ratio protéines/énergie (PE) précédemment établi. La principale modification étudiée a été la dilution des protéines par des éléments non nutritifs comme l'eau, l'agar-agar ou encore la cellulose (Booth, 1974; Musten et al., 1974; Rozin, 1968). L'étude de Rozin a été l'une des pionnières dans les démonstrations de la défense du ratio PE. Les rats de l'étude ont été soumis à des choix où les macronutriments étaient dilués avec de l'eau. Les consommations alimentaires ont alors augmenté en adéquation avec la dilution des protéines pour maintenir le ratio PE. Cette défense du niveau protéique a eu lieu de façon précise, alors que dans la même étude, les auteurs ont observé que la dilution des glucides n'a pas été compensée, montrant que l'apport protéique est contrôlé de façon plus précise que l'apport glucidique (Rozin, 1968). Il s'agit de l'une des premières démonstrations du fait que l'apport en protéines est contrôlé de manière plus précise que l'apport en glucides, et selon Rozin, « *there is a real minimum protein requirement, while there is, under normal circumstances, no real necessity to consume carbohydrates (il existe un réel besoin minimum en protéines, alors qu'il n'y a, dans des circonstances normales, aucune nécessité réelle de consommer des glucides)* ». Les résultats de la dilution des lipides étaient quant à eux extrêmement variables et difficilement exploitable, du fait que tous les rats sauf un, mangeaient très peu de lipides, de sorte que de petites variations

absolues de la quantité consommée engendraient d'énormes changements dans les mesures d'apport.

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente sur les effets des variations du niveau protéique sur la prise alimentaire, les effets de la diminution ou dilution des protéines sont beaucoup plus forts que ceux de l'augmentation ou la concentration des protéines. En 1974, une étude de Booth a montré que les rats ont plus défendu le niveau d'apport en protéines choisi contre une diminution de la concentration en protéines alimentaires que contre une augmentation de la concentration (Booth, 1974). Des rats adultes ont été préalablement soumis à un choix entre un régime protéique (10% de protéines par énergie) et un régime sans protéine puis soumis au même choix soit avec un régime faible en protéines (5%) soit avec un régime riche en protéines (20%). En quelques jours (2-6 jours), la consommation des régimes protéiques a été modifiée, diminuée avec le régime à 20% et augmentée avec le régime à 5%, de sorte que l'apport en protéines soit égal à la même quantité qu'avec le régime à 10%. Cependant, entre 6 et 12 jours, une majorité des rats soumis au choix avec le régime à 20% de protéines avaient recommencé à consommer le régime protéique en quantité égale à leur choix initiale avec le régime à 10%. Ils ont ainsi augmenté leur niveau de consommation de protéines.

Enfin, des études plus récentes ont montré qu'une adaptation complète ne se produit pas forcément (Kratz and Levitsky, 1979a; Romsos and Ferguson, 1982). Les résultats montrent que dans le cas d'une dilution des protéines, le ratio PE s'établit à une valeur plus faible que celui précédemment observé sans dilution. Cependant, il reste largement assez élevé pour ne pas affecter la croissance. Ces différentes études montrent que l'apport en protéines est finement ajusté en fonction de la capacité des protéines alimentaires à soutenir la croissance. Dans l'étude de Kratz et Levitsky, les rats sélectionnaient initialement un ratio PE très élevé (37%), et après dilution de la protéine, il n'était plus que de 25%. Bien que le ratio PE n'était pas complètement corrigé, ils maintenaient toujours un ratio élevé et la croissance était ainsi préservée (Kratz and Levitsky, 1979a). Romsos et Ferguson ont montré que les souris ob/ob maigres et obèses sélectionnaient un ratio PE de 20% puis de 10% après dilution avec de la cellulose (Romsos and Ferguson, 1982). Les souris n'ont donc pas ajusté leur apport en protéines, mais l'apport énergétique et la prise de poids ont été préservés, et 10% semble toujours suffisant pour assurer l'équilibre azoté (Chaumontet et al., 2019). Il est notable que les souris sélectionnent en général des ratios PE plus faibles que les rats (Smith et al., 2000), probablement en raison de leur taux métabolique spécifique élevé, qui entraîne l'ingestion de plus grandes quantités de nourriture par rapport à leur poids corporel.

Ces résultats indiquent que lorsque la densité de la source de protéines est diluée, il y a une rapide augmentation de la quantité ingérée pour éviter de réduire l'apport protéique et préserver la croissance. La compensation est cependant rarement complète, mais elle se fait toujours de sorte à assurer une croissance normale. Cela laisse penser que le ratio PE sélectionné est alors globalement beaucoup plus élevé que celui requis pour une croissance optimale, et nous pouvons alors nous questionner sur la nécessité d'un apport protéique aussi élevé.

1.3.2.B. Effet de la qualité des protéines

Dans cette même idée, l'utilisation de protéines d'origine végétale, déficientes en certains acides aminés, engendre aussi des modifications de ratio PE. En conditions de libre choix, les rats

choisissent, en moyenne, un ratio PE de 25-30% avec des protéines de bonne qualité et de 45-50% avec des protéines de moins bonne qualité. En effet, l'étude de Musten et al. a montré que le ratio PE passait d'en moyenne 30% avec de la caséine à environ 40% avec de la protéine de gluten de blé (Musten et al., 1974). D'autres études ont aussi mis en avant le fait que les animaux ont tendance à augmenter le ratio PE avec les protéines d'origine végétale pour maintenir un niveau d'apport en acides aminés proche de celui d'une protéine mieux équilibrée d'origine animale (Cieslak and Benevenga, 1984; Henry and Rerat, 1963; Hrupka et al., 1999; Kishi et al., 1982; Pol and den Hartog, 1966; Tanphaichitr et al., 1976).

1.3.3. Les facteurs de variation du choix protéique

Ces consommations élevées de protéines sous condition de libre choix semblent aussi varier selon différents paramètres extérieurs aux protéines.

1.3.3.A. Effets de l'état physiologique

Le besoin en protéines n'est pas le même selon l'état physiologique de l'individu. Assez logiquement le choix protéique varie alors lui aussi selon les mêmes paramètres.

1.3.3.A.a. Gestation et la lactation

Il a été montré que les rats augmentaient leur consommation spontanée de protéines au cours de la gestation et la lactation (Cohen and Woodside, 1989; A. Leshner et al., 1971; Richter et al., 1938). De plus, en conditions de choix, les rats ayant la possibilité de consommer des protéines indépendamment de l'énergie, il a été rapporté dans l'étude de Leshner et al. que l'augmentation du ratio PE chez les rats pendant la lactation permettait de réduire l'augmentation d'énergie ingérée observée chez les rats nourris avec un régime unique ne contenant que 15% de protéines, ce qui suggérerait que l'hyperphagie était liée à la recherche de protéines (A. Leshner et al., 1971). En 1989, l'étude de Cohen and Woodside a permis de renforcer ce résultat. En effet, ils ont mis en évidence que durant la lactation les rats qui n'étaient pas en conditions de choix augmentaient leur consommation énergétique dans le but d'obtenir une consommation protéique identique à celle des rats en lactation. Ainsi, les conditions de choix permettent d'ajuster la consommation protéique en accord avec la hausse du besoin dû à la lactation sans impacter l'apport énergétique.

1.3.3.A.b. Age

L'âge a aussi un impact sur le besoin en protéines, la préférence pour les protéines tends alors à augmenter et être préservée à l'âge adulte (Jean et al., 2002; Leibowitz et al., 1991; McArthur and Blundell, 1982). Une étude de Ashley a montré que le ratio PE avait tendance à augmenter après le sevrage (Ashley and Anderson, 1975). Il semble que la régulation de la consommation protéique est faible chez le jeune rat et n'apparaît vraiment qu'au sevrage. En effet, la régulation n'apparaîtrait pas avant quatre semaines (Blake and Henning, 1986), et la même étude indique

que puisque la régulation repose sur la capacité d'apprentissage, elle est améliorée avec le temps. Chez le rat âgé ensuite, on constate que la consommation spontanée diminue en parallèle de la perte de masse maigre (Jean et al., 2002; Leibowitz et al., 1991). Cette effet peut notamment être le résultat de la dégradation des mécanismes de régulation de la prise alimentaire qui se développe au cours du vieillissement (Boghossian et al., 2000; Boghossian and Alliot, 2000).

1.3.3.A.c. *Activité physique*

Les modèles couplant conditions de choix et exercice physique n'aboutissent pas à des résultats clairs. En effet, les acides aminés sont très peu utilisés comme substrats énergétiques au cours de l'effort musculaire. Ainsi, les rats soumis à une activité physique, tendent à augmenter leur prise alimentaire vers l'ingestion de glucides et de lipides (Brooks and Mercier, 1994). Cependant dans certains études, les résultats ont permis de confirmer une augmentation de la consommation de protéines lors de l'activité physique (Andik et al., 1954; Even et al., 1998; Larue-Achagiotis et al., 1994; Parizkova and Stankova, 1964). L'hypothèse de cet effet est le fait que le besoin protéique peut être modifié par les réponses métaboliques suite à l'exercice plutôt qu'à l'exercice lui-même (Hood and Terjung, 1990; Tagliaferro et al., 1990; Weltman et al., 1985).

1.3.3.A.d. *Surpoids et obésité*

Au regard du fait que dans des modèles d'obésité, les animaux ont tendance à avoir une consommation énergétique plus forte, des auteurs ont supposé que cela reflétait une volonté de rechercher plus de protéines (Bray et al., 1973; Pullar and Webster, 1974; Radcliffe and Webster, 1978, 1976) car les rats obèses auraient une capacité réduite à utiliser les acides aminés dans la synthèse protéique et donc qu'ils auraient un besoin en protéines plus élevé. Il semblerait donc que le ratio PE choisi par les animaux obèses devrait être plus élevé que les animaux sains.

Des études ont remis en question cette hypothèse et ont montré que les souris obèses en choix continuaient à avoir un apport énergétique élevé (Chee et al., 1981; Mayer et al., 1951). Il semble alors que l'hyperphagie montrée chez les rongeurs obèses n'a pas pour but d'atteindre un certain niveau protéique mais que c'est bien l'apport énergétique qui est dérégulé. Ce résultat a aussi été confirmé avec des modèles d'obésité chez le rat. Dans l'étude d'Anderson et al., utilisant deux modèles d'obésité (soit rat Zucker, soit lésion de l'hypothalamus), l'hyperphagie est aussi maintenue en conditions de choix (Harvey Anderson et al., 1979). Les rats de cette étude ont établi un ratio PE plus faible que les rats non-obèses. Cependant, la consommation énergétique totale étant plus élevée chez les rats obèses, ils ingéraient une quantité de protéines équivalente en absolue à celle des rats non obèses. L'étude de Castongay et al. quelques années après a confirmé ces résultats en utilisant aussi des rats Zucker (Castongay et al., 1982).

Enfin, nous pouvons noter que l'étude de Chee et al. a aussi rapporté que chez les souris obèses et chez les souris saines la rétention d'azote étaient similaires (Chee et al., 1981), ce qui remet en question l'idée que l'hyperphagie observée dans les modèles d'obésité chez les rongeurs est liée à une capacité réduite des rongeurs à synthétiser des protéines.

1.3.3.B. Effets de l'environnement

Les derniers paramètres influençant le choix protéique concernent l'environnement : la température ou le moment de la journée.

1.3.3.B.a. Température

La diminution de la température ambiante a tendance à modifier le choix alimentaire vers la consommation des glucides et des lipides, car ce sont eux qui sont oxydés préférentiellement pour maintenir la température corporelle (Donhoffer and Vonotzky, 1947; A. I. Leshner et al., 1971; Musten et al., 1974). En effet, le froid induit une augmentation de la dépense énergétique, en lien avec l'augmentation de la thermogénèse, nécessitant l'oxydation des glucides et des lipides, mais pas des protéines (Andik et al., 1963). Les glucides semblent en particulier être préféré pour la thermogénèse (Donhoffer and Vonotzky, 1947; A. I. Leshner et al., 1971). Les animaux logés en ambiance froide sélectionnent ainsi des ratios PE inférieurs à ceux observés à des températures plus élevées.

1.3.3.B.b. Rythme circadien

En plus de pouvoir sélectionner un niveau adéquat de protéines indépendamment de l'apport énergétique, les modèles d'auto-sélection alimentaire ont aussi l'avantage de permettre de consommer les macronutriments au moment où ils sont nécessaires. En effet, dans plusieurs études, l'analyse de la structure des repas a montré qu'en plus d'un ajustement global de l'apport alimentaire sur 24 heures, il existait également un ajustement circadien de l'apport en macronutriments. Ainsi, l'apport en macronutriments ne se produit pas de façon aléatoire tout au long de la journée, mais présente des schémas spécifiques mettant en évidence un contrôle séparé à court terme de l'apport en protéines et en énergie.

Deux aspects sont alors à distinguer. D'une part, il y a le fait que les macronutriments ne sont pas consommés de la même manière durant le jour et la nuit. Même si aucun schéma clair ne se distingue, il ressort que les glucides sont préférés en période nocturne et les protéines en période diurne (Azzout-Marniche et al., 2016; Johnson et al., 1979; Larue-Achagiotis et al., 1992; Makarios-Lahham et al., 2004; Miller et al., 1994; Rieth and Larue-Achagiotis, 1997; Tempel et al., 1989). D'autres part, les animaux en choix ont la possibilité de mélanger l'apport protéique et l'apport de glucides et de lipides au cours d'un même repas, ou en faisant des repas uniquement composés de l'un ou l'autre des macronutriments. Il a alors été montré que les rats séparent plus facilement l'ingestion de protéines et de glucides que celle de protéines et de lipides (Azzout-Marniche et al., 2016; Jean et al., 2002; Konkle et al., 2003; Makarios-Lahham et al., 2004; Miller et al., 1994). Cette stratégie de séparation des apports en protéines et en glucides pourrait avoir comme objectif d'améliorer la réponse métabolique à l'ingestion d'un repas. En effet, les protéines consommées avant un repas riche en glucides réduisent la prise alimentaire et induisent une diminution des concentrations de glucose et d'insuline dans le sang. Ces modifications dans le temps auraient donc pour objectif d'améliorer le métabolisme en modifiant l'utilisation des nutriments.

1.3.4. Intérêt métabolique du niveau élevé de consommation spontanée de protéines

Le besoin en protéines est défini comme la quantité requise pour assurer l'homéostasie protéique et donc d'assurer le renouvellement des protéines corporels. Cependant, comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes la consommation spontanée de protéines tend à être plus élevée que ce besoin. Ce surplus de consommation protéique et principalement l'excès d'acides aminés est oxydé et contribue au métabolisme énergétique au même titre que les glucides et les lipides. Cette contribution semble permettre d'améliorer l'équilibre énergétique. Ainsi, il a été montré que le choix protéique s'adaptait à la consommation des autres macronutriments. Le ratio PE choisi aurait alors comme bénéfice de réduire la dépendance de l'organisme vis-à-vis du métabolisme glucidique par une meilleure régulation de l'insulinémie et la glycémie, ainsi qu'une réduction de la lipogenèse conduisant à un gain de poids et d'adiposité plus faible. Plusieurs auteurs ont alors suggéré que les rats en conditions d'auto-sélection alimentaire seraient en meilleure santé que les rats nourris avec un régime standard (Calet et al., 1961; Piquard et al., 1977; Richter et al., 1938).

1.3.4.A. Le choix protéique en fonction des autres macronutriments

L'impact de la variation des autres macronutriments sur la sélection des protéines a très tôt été mis en évidence dans les expériences de libre choix. En 1938, Richter et al. montrait déjà que le ratio PE était généralement plus faible lorsque l'apport en lipides était élevé (Richter et al., 1938). Cela a été confirmé par d'autres études notamment celles de Chee et al. et celle de Romsos et al., respectivement en 1981 et 1982, qui ont observé que lorsque la teneur en lipides de la partie du choix sans protéine était augmentée, le ratio PE était diminué chez des souris, passant de 30-35% à 15-20% (Chee et al., 1981; Romsos et al., 1982). Des études plus récentes, chez le rat en conditions de choix avec un régime protéique et un régime sans protéine riche en glucides ou riche en lipides, ont montré que le ratio PE diminuait lorsque les lipides augmentaient et inversement pour les glucides (Azzout-Marniche et al., 2016; Makarios-Lahham et al., 2004).

Le saccharose semble aussi impacter la consommation protéique. En effet sa forte palatabilité attire beaucoup plus les animaux que les protéines. En 1979, une étude de Kratz et Levitsky a montré que quand du saccharose était proposé dans le choix, les rats le consommaient tout de suite en quantité importante et le ratio PE diminuait de 37 à 28%. Cependant, cet effet est transitoire puisque le ratio PE est rapidement restauré à sa valeur initiale (Kratz and Levitsky, 1979b). Dans cette même étude, des rats ont été nourris avec un régime unique contenant aussi le saccharose, et ont eu une consommation énergétique élevée pour maintenir le niveau d'apport protéique.

En conditions de choix, les rats ont donc la capacité de contrôler la consommation protéique par rapport aux apports en glucides et aux lipides, et contrôlent alors leurs effets potentiels sur leur organisme.

1.3.4.B. Impact du choix protéique sur l'adiposité

En permettant aux animaux de séparer la consommation des protéines et de l'énergie, les régimes de choix induisent un gain de poids et une adiposité plus faibles que les régimes uniques.

Les études de Larue-Achagiotis et al. en 1992 ont tout d'abord montré que le gain de poids corporel était plus faible chez les rats en auto-sélection alimentaire (Larue-Achagiotis et al., 1992). Leur explication reposait sur le fait que l'auto-sélection engendre un ajustement de l'apport en macronutriments en fonction des besoins au cours du cycle jour-nuit. Ainsi, la réduction de gain de poids n'était pas attribuée à un ratio PE plus élevé (21% en choix vs. 17% avec régime unique) mais à l'ordre de consommation des macronutriments. Cependant, 5 ans après, ce même groupe n'a plus observé de différence de gain de poids mais uniquement des différences de composition corporelle, puisque les rats en choix avaient moins de masse grasse (Rieth and Larue-Achagiotis, 1997).

Plus récemment, il a été rapporté en 2004 et 2016 que les rats en choix avaient un apport énergétique et un gain de poids corporel inférieurs à ceux de rats témoins (Azzout-Marniche et al., 2016; Makarios-Lahham et al., 2004). Ces résultats se retrouvaient que la teneur en lipides du régime sans protéine soit faible ou élevée. La diminution du poids était notamment due à une masse grasse plus faible. Ce résultat avait déjà été montré dans des études plus anciennes qui montraient que c'était la graisse viscérale qui était réduite. Il s'agit alors d'une conséquence positive des conditions de choix alimentaire puisque la graisse viscérale est celle qui induit le plus de maladies métaboliques (DiGirolamo et al., 1998; Flatt et al., 1985).

1.3.4.C. Impact du choix protéique sur le métabolisme glucidique

Comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes, le ratio PE sélectionné dans les différentes études était généralement élevé et présentait une certaine variabilité selon les conditions expérimentales (régimes, état physiologique, environnement). Dans la plupart des études, il est apparu que l'évolution du ratio PE en fonction de la teneur en glucides du régime sans protéine permettait de maintenir un ratio protéines/glucides (PG) relativement stable. Certains auteurs ont donc émis l'hypothèse que la modulation du ratio PE selon les régimes aurait pour but de maintenir un ratio PG « optimal » qui serait régulé afin d'optimiser le métabolisme énergétique. Cette hypothèse reflète le lien entre la consommation protéique et glucidique.

Le ratio PG semble en effet être un paramètre plus stable que le ratio PE. Comme nous avons déjà pu le voir le ratio PE varie selon que le régime sans protéine proposé est riche en lipides ou en glucides. Le ratio PG est quant à lui constant dans ces deux conditions. Par exemple dans l'étude de Miller et al., les rats en choix avaient un PE ratio plus faible avec un régime riche en lipides par rapport à ceux avec un régime riche en glucides. Cependant, ils ont maintenu un ratio PG de 77% (Miller et al., 1994). On retrouve ce type de résultat dans d'autres études (Azzout-Marniche et al., 2016; Makarios-Lahham et al., 2004) avec des ratios PE de 26% (régimes avec 50% de glucides et 50% de lipides) ou 40% (88% de glucides et seulement 12% de lipides), conduisant à un ratio PG similaire d'environ 70%.

En 1984, Theall et al. ont étudié spécifiquement la régulation du ratio PG chez des rats en conditions de choix (Theall et al., 1984). Les auteurs ont montré que les rats en choix, ayant accès

à des régimes isocaloriques avec des ratios PG très variables (7-360%), ajustaient leur niveau de consommation protéique de façon à maintenir un ratio PG ingéré dans un intervalle beaucoup plus étroit (30-40%) que celui autorisé par les régimes. D'après certains auteurs, la régulation du ratio PG permettrait de maintenir constants les taux de sérotonine dans le cerveau (Fernstrom and Wurtman, 1997). Il a donc été conclu que le ratio PG est régulé afin de limiter les changements dans les taux de sérotonine dans le cerveau (Theall et al., 1984). En effet, l'apport glucidique tend à augmenter les niveaux de sérotonine cérébrale en modifiant le profil des acides aminés plasmatiques, tandis que les protéines bloquent cette augmentation (Wurtman and Fernstrom, 1975). Ce mécanisme est détaillé ci-dessus dans la **Figure 6**. Cependant, cette hypothèse n'a jamais pu être totalement validée puisqu'aucune corrélation significative entre les ratios PG et la sérotonine cérébrale ou l'acide 5-hydroxyindoleacétique, métabolite urinaire de la sérotonine, n'a pu être montrée (Ashley et al., 1979; Peters and Harper, 1987; Thibault et al., 1999).

Ainsi, l'ajustement du ratio PE en fonction de la quantité de glucides dans le régime aurait pour but de maintenir un ratio PG stable et élevé (50-70%), et pourrait avoir pour objectif de réduire l'impact négatif d'une consommation de glucides excessive sur la sécrétion d'insuline et la régulation de la glycémie. Par exemple, dans l'étude de Larue-Achagiotis et al., les rats en conditions de choix présentaient des taux plasmatiques d'insuline plus faibles que ceux nourris avec un régime standard (Larue-Achagiotis et al., 1992). Devkota et Layman ont également montré que les rats nourris avec un régime dont le ratio PG était très élevé présentaient une réponse insulinaire améliorée et réduite (Devkota and Layman, 2011). Ainsi lorsque la teneur en glucide du régime est élevée et pourrait perturber la régulation de la glycémie, les animaux en conditions de libre choix augmentent leur consommation de protéines (Blouet et al., 2006; Farnsworth et al., 2003; Gannon and Nuttall, 2006).

Chapitre 2 : Travaux personnels

2.1. Justifications des travaux de thèse

Les questions autour des niveaux de consommation protéique sont aujourd'hui nombreuses et font l'objet de beaucoup d'études. Le contrôle de l'ingestion des protéines est un élément majeur dans les mécanismes de survie des espèces, y compris de l'espèce humaine. C'est une question particulièrement importante dans le contexte des transitions nutritionnelles, visant notamment à réduire la consommation de protéines, et des questions relatives à la couverture des besoins nutritionnels. Les conséquences possibles des changements d'alimentation sur le comportement alimentaire et la composition corporelle nécessitent d'être étudiées.

Cette thèse avait pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'ingestion des protéines, et leurs relations avec le contrôle de l'ingestion énergétique. Ces travaux portant sur l'influence de la teneur en protéines des régimes sur la prise alimentaire et les choix alimentaires avaient pour objectif de mettre en évidence le rôle d'un contrôle du métabolisme protéique, mais aussi des voies du métabolisme énergétique dans ces processus. Les conséquences possibles des variations de la teneur en protéines des régimes sur la régulation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et de la composition corporelle ont aussi été explorées.

Deux axes sont à distinguer dans ce projet :

1) L'utilisation de différents modèles d'auto-sélection alimentaire dans le but de déterminer s'il existe un niveau d'apport protéique « cible » auquel les individus tendent à s'adapter, et s'il varie en fonction de la qualité et de la quantité des macronutriments énergétiques proposés. Cela permettra en outre de vérifier si le contrôle de l'ingéré spontané protéique s'ajuste pour assurer le besoin protéique et en acides aminés et/ou permet d'assurer le besoin énergétique en limitant la prise de masse grasse et les dysfonctions liées à la dépendance de l'organisme vis-à-vis du glucose.

2) L'utilisation de régimes à teneur variables en protéines (3 à 50%), et variant selon la teneur en glucides et en lipides, dans le but d'évaluer leurs effets sur la prise alimentaire, la dépense énergétique et la composition corporelle. Cela permettra d'une part de savoir si l'augmentation de la prise alimentaire induite par les régimes faibles en protéines débute dès que l'apport est inférieur à ce niveau « cible » ou dès qu'il est inférieur au niveau requis pour assurer l'équilibre azoté. D'autre part, cela permettra, dans le cadre de l'hypothèse de l'effet levier des protéines, de quantifier le niveau d'hyperphagie pouvant être induit par un apport protéique insuffisant, et dans quelle mesure cette hyperphagie se traduit par un effet sur l'adiposité ou est compensée en tout ou partie par une augmentation simultanée de la dépense énergétique.

Le projet de recherche était basé sur des études métaboliques et comportementales chez le rat. L'utilisation de modèles animaux est imposée dans ce contexte par les questions éthiques qui pourraient se poser chez l'Homme soumis à des régimes mal équilibrés en protéines pour des durées d'expérimentation relativement longues, mais requises pour estimer les conséquences de ces régimes à moyen-terme. Le rat s'imposait dans ce projet compte tenu de son métabolisme énergétique plus proche de l'Homme relativement à la souris.

2.2. Méthodologie

2.2.1. Informations générales

Afin de répondre à ces objectifs, cinq expérimentations animales ont été menées dans le cadre de cette thèse. Les expériences ont été faites conformément à la directive du Conseil des Communautés européennes du 24 novembre 1986 (86/609 CEE) concernant le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le Comité d'éthique français (APAFIS#16996). Elles ont été réalisées avec 244 rats mâles de la souche Wistar âgés de 7 semaines (soit environ de 215-240g). La taille des groupes était basée sur la variabilité des paramètres mesurés selon les études précédemment menées dans le laboratoire. Lorsque le nombre de rats était trop important par rapport aux possibilités de logement de l'animalerie, ils n'étaient pas livrés en une seule fois, mais par petits groupes de 8-10 rats chaque semaine, et affectés de manière aléatoire aux régimes expérimentaux. Cela permettait aussi d'échelonner les différentes mesures (calorimétrie indirecte, prise de sang, cage métabolique, ...).

A l'arrivée des rats et avant chaque expérience, une phase d'adaptation était mise en place permettant aux animaux en cages collectives (cinq/cage) de s'habituer aux conditions du laboratoire (température $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, humidité 60%, période lumineuse de 8h à 20h). Ils étaient alors nourris avec un régime standard pour les rats adultes.

Dans l'ensemble des expériences, les régimes alimentaires étaient présentés sous forme de boulettes. Elles étaient préparées deux fois par semaine à partir de poudres sèches mélangées avec une quantité d'eau nécessaire pour obtenir une pâte homogène, puis façonnées. Les boulettes ont ensuite été laissées à sécher à température ambiante pendant trois jours avant d'être données aux rats. Les poudres utilisées étaient fabriquées par l'unité Sciences de l'Animal et de l'Aliment de Jouy-en-Josas - Equipe Régimes à Façon (Jouy-en-Josas, France). Les protéines étaient des protéines totales de lait LR 85F (Armor Protein, Nantes, France), les glucides de l'amidon de maïs (Roquette, Lestrem, France) et du saccharose (Eurosucré, Paris, France), et les lipides de l'huile de soja (Baillly SA, Aulnay-sous-bois, France). Tous les régimes ont été complétés par des minéraux et des vitamines conformément aux exigences de l'AIN-93 (Reeves et al., 1993). Les boulettes ainsi que l'eau étaient toujours données ad libitum.

Le poids corporel (g) a été mesuré deux fois par semaine tout au long des expériences, ainsi que les consommations alimentaires (g/j) par pesée des boulettes. Les consommations étaient ensuite converties en kJ/j en fonction du contenu énergétique des régimes, et après correction de la teneur en eau. La teneur en eau au moment de la pesée a été calculée sur la base de la courbe d'évaporation déterminée sur des boulettes témoins.

2.2.2. Techniques utilisées

2.2.2.A. Dépense énergétique

La dépense énergétique totale est la somme de quatre éléments :

- Le métabolisme de base (60-75% de la dépense énergétique totale) correspondant à la dépense énergétique minimale assurant le fonctionnement de l'organisme dans des conditions standardisées (énergie dépensée après une nuit de 12-14h à jeun (poste-absorptif) au repos, sans mouvement, allongé, éveillé et à thermoneutralité). Ces conditions de mesures contraignantes font que généralement c'est la dépense énergétique de repos qui est préférée. Elle correspond uniquement à l'énergie nécessaire pour faire circuler le sang, la respiration et les fonctions gastro-intestinale et rénale, et donc à toutes les dépenses énergétiques non-influencées par l'activité physique et l'alimentation.
- La dépense énergétique d'activité (25-35% de la dépense énergétique totale, variant selon la nature, la durée et l'intensité de l'exercice) correspondant à l'énergie nécessaire à toutes les activités de la vie quotidienne, sportives ou non.
- L'effet thermique des aliments ou thermogénèse postprandiale ($\approx 10\%$ de la dépense énergétique totale) correspondant à l'énergie nécessaire pour digérer, métaboliser et stocker l'énergie contenue dans les aliments.
- La thermorégulation correspondant à l'énergie dépensée pour maintenir la température corporelle. Elle a un coût non négligeable chez les mammifères, mais n'affecte que très peu la dépense énergétique totale de l'Homme, car il est généralement en zone de confort thermique ou thermoneutralité.

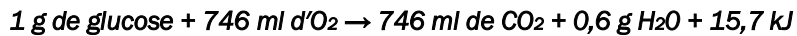
2.2.2.A.a. Technique de mesure : calorimétrie indirecte

La balance énergétique est déterminée selon les lois de thermodynamique. Le premier principe de thermodynamique propose en effet que l'énergie se conserve et qu'ainsi les événements ne peuvent être que des transformations de certaines formes d'énergie en d'autres formes d'énergie. L'énergie ne peut donc pas être produite ex nihilo. Ce principe proche de celui promu par Lavoisier (« *Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme* »), explique que l'énergie est en quantité invariable dans la nature et que les organismes sont donc incapables d'en produire. L'énergie doit donc être puisée dans le milieu extérieur à partir de l'alimentation et est restituée au milieu extérieur en quantité équivalente : soit sous une forme chimique soit sous une forme thermique.

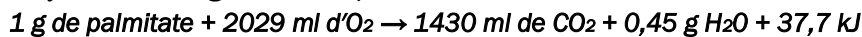
La calorimétrie est une technique de mesure de la dépense énergétique, qui existe sous forme « directe » et « indirecte ». La calorimétrie directe mesure la dépense énergétique par mesure directe de la production de chaleur faite par l'organisme. La méthode de calorimétrie indirecte mesure l'énergie sous forme chimique et utilise le fait que la dépense énergétique est intimement liée au métabolisme oxydatif des nutriments (lipides, protéines et glucides). Elle utilise donc la mesure de la consommation d'oxygène comme une mesure « indirecte » de la dépense énergétique (Even and Nadkarni, 2012).

La dépense énergétique par litre d'oxygène consommé dépend du substrat utilisé, puisqu'elle est de 5,01 kcal (20,96 kJ) pour le glucose, 4,66 kcal (19,5 kJ) pour les lipides et 4,34 kcal (18,16 kJ) pour les protéines. Afin de l'évaluer, il est nécessaire de connaître la contribution de chacun des nutriments à l'oxydation totale. La mesure simultanée de l'oxygène consommé et du dioxyde de carbone expiré permet de réaliser ce calcul.

L'équation de l'oxydation d'un gramme de glucose :



L'équation de l'oxydation d'un gramme de palmitate :



L'équation de l'oxydation d'un gramme de protéine :



Le quotient respiratoire (QR), défini comme le ratio entre le CO₂ expiré (VCO₂) et l'O₂ consommé (VO₂) par l'individu, est respectivement de 1,0 pour le glucose, de 0,8 pour les protéines et de 0,7 pour les lipides, car le ratio entre le nombre d'atomes de carbone et d'oxygène est plus élevé dans les protéines et les lipides par rapport aux glucides. Il est donc nécessaire d'apporter plus d'oxygène pour oxyder les lipides et les protéines. Il existe alors des équations permettant d'évaluer précisément la dépense énergétique totale en prenant en compte le QR. L'équation de Weir est la plus utilisée (Weir, 1949) : **Dépense énergétique totale = 16,3 VO₂ + 4,57 VCO₂**

Afin de déterminer l'oxydation des macronutriments, les quantités de substrats oxydés et d'énergie sont obtenues à partir des équations suivantes, comportant trois inconnus :

$$\text{VO}_2 = 0,746 \text{ g Glucides} + 2,019 \text{ g Lipides} + 0,966 \text{ g Protéines}$$

$$\text{VCO}_2 = 0,746 \text{ g Glucides} + 1,427 \text{ g Lipides} + 0,774 \text{ g Protéines}$$

L'oxydation des protéines (Pox) ne peut pas être directement estimée à partir des échanges gazeux. Il y a alors deux solutions : soit il est nécessaire de collecter les urines durant 24h pour mesurer l'urée excrétée qui est fonction de l'oxydation des protéines tel que : **Pox (kJ/d) = urée (g) × 6,25 × 16,75**; soit en calculant Pox à partir de l'apport protéique et de l'évolution de la composition corporelle, supposant que les protéines représentent 25% de la masse maigre, tel que : **Pox (kJ/d) = protéines ingérées (kJ/d) - protéines fixées dans le corps (kJ/d)**. Dans les expériences menées durant cette thèse, les dosages d'urée ont abouti à des valeurs aberrantes et très variables, c'est donc la seconde méthode qui a été privilégiée.

Une fois l'oxydation protéique déterminée, il est alors possible de calculer l'oxydation des glucides (Gox) et des lipides (Lox) grâce à des équations dérivées des réactions d'oxydation d'un gramme de glucose, de palmitate et de protéine ci-dessus.

$$\text{Gox} = (4,55 \times \text{VO}_2) - (3,21 \times \text{VCO}_2) = 4,57 \times \text{VCO}_2 - 3,23 \times \text{VO}_2 - 2,6 \times \text{Azote excrété}$$

$$\text{Lox} = (1,67 \times \text{VO}_2) - (1,67 \times \text{VCO}_2) = 1,69 \times \text{VO}_2 - 1,69 \times \text{VCO}_2 - 2,06 \times \text{Azote excrété}$$

Ainsi pour pouvoir estimer la dépense énergétique totale ainsi que l'oxydation des macronutriments, la collecte des échanges gazeux est réalisée dans des cages de calorimétrie. Il s'agit de cages hermétiques et ventilées permettant de mesurer la composition de l'air entrant et sortant de la cage, et de déterminer VO₂ consommé et VCO₂ expiré. Les cages reposent sur des capteurs de force produisant un signal électrique proportionnel à l'intensité de l'activité locomotrice du rat, et sont maintenues à une température assurant la thermoneutralité. En s'affranchissant ainsi de la dépense énergétique liée à la thermorégulation, il est possible de

déterminer séparément les dépenses liées au métabolisme de repos, à l'activité motrice et à l'effet thermique des régimes :

$$\begin{aligned} \text{Dépense énergétique d'activité} &= \text{activité motrice} \times \text{coût de l'activité} \\ \text{Dépense énergétique de repos} &= \text{dépense énergétique totale} - \text{dépense énergétique d'activité} \end{aligned}$$

2.2.2.A.b. Technique de mesure : utilisation de la composition corporelle et de la prise alimentaire

La dépense énergétique totale peut aussi être déterminée à partir de la composition corporelle et de la prise alimentaire. Cependant, cette méthode ne permet pas de distinguer les différents composants de la dépense énergétique. Elle est alors calculée comme étant : **Dépense énergétique (kJ/d) = apport énergétique (kJ/d) – énergie retenue dans le corps (kJ/d).**

L'énergie retenue dans le corps est calculée à partir du gain de masse grasse et de masse maigre (Hall, 2008), en supposant que : **Masse grasse = 32,2 kJ/g** et **Masse maigre = 7,6 kJ/g**. Ce calcul est possible en supposant qu'aucune quantité significative d'énergie autre que l'azote déjà pris en compte dans l'énergie métabolisable des protéines n'est perdue dans l'urine, et que 10-15% de l'énergie est perdue dans les fèces (Elvert et al., 2013; Le Bellego et al., 2001). Cette méthode surestime donc la dépense énergétique de 10-15%, mais de manière similaire avec tous les régimes.

2.2.2.B. Composition corporelle

À la fin des études, les rats ont été mis à mort par anesthésie à l'isoflurane puis par prélèvement de sang dans la veine cave jusqu'à l'arrêt cardiaque. Une décapitation a été faite immédiatement pour assurer la mort. La composition corporelle a été mesurée par dissection et pesée des principaux tissus et organes qui composent l'animal. La masse grasse a été déterminée tel que la somme de l'ensemble des morceaux de graisse collectés (viscérale, sous-cutanée, rétropéritonéale et épидидymaire). L'adiposité a été calculée comme la masse grasse totale divisée par le poids corporel, et la masse maigre comme le poids corporel moins la masse grasse.

La masse métabolique active (MMA) a été calculée telle que : **MMA (g) = masse maigre (g) + 0,20 x masse grasse**. Elle a notamment été utilisée pour normaliser l'apport et la dépense énergétique (Arch et al., 2006). Dans le laboratoire, il a été confirmé la validité de ce mode d'ajustement, en montrant qu'il effaçait les effets de la différence de composition corporelle sur la dépense énergétique (Chaumontet et al., 2019), et qu'il était également le meilleur moyen de réduire la variabilité de la dépense énergétique au sein des groupes (Azzout-Marniche et al., 2014; François et al., 2017; Nadkarni et al., 2013).

Dans certains cas, la composition corporelle initiale des rats a aussi été estimée par IRM à la plateforme d'imagerie pour petits animaux de l'Université Paris-Descartes (Paris, France).

2.2.2.C. Comportement alimentaire

Sous auto-sélection alimentaire, la prise alimentaire de routine mesurée deux fois par semaine permettait de mesurer les quantités ingérées sur une longue période, et de définir les ratios PE et PG choisis. En complément, des mesures de séquences alimentaires au cours d'un cycle d'enregistrement de 24 heures ont été faites. Les rats étaient logés individuellement pendant 48h (moyennées sur 24h) dans des cages équipées de gamelles reposant sur des capteurs de force. Les capteurs étaient connectés à une unité d'acquisition de données branchée sur un ordinateur programmé pour enregistrer des données toutes les 10s. La quantité de nourriture ingérée était ainsi mesurée en continu et convertie en kJ en fonction du contenu énergétique des régimes.

Deux types de repas ont été définis comme suit :

- Les "repas uniques" au cours desquels les rats ont ingéré un seul des régimes proposés,
- Les "repas mixtes" au cours desquels les rats ont ingéré l'ensemble des régimes proposés au cours d'un même repas. Un repas est défini comme étant l'ensemble des ingestions séparées par un intervalle de moins de 10 minutes (Castonguay et al., 1986).

La séquence alimentaire a ensuite été analysée pour rendre compte de l'apport énergétique de chaque régime, du nombre de repas simples et mixtes, et de la séquence d'ingestion des différents régimes dans les repas mixtes.

2.2.2.D. Dosages biochimiques

Les prises de sang, environ 500 µL, ont été faites à la queue des rats vigils le matin (début de la période lumineuse). Le sang a été collecté avec une aiguille préalablement trempée dans de l'EDTA. Le glucose était directement mesuré sur une goutte de sang avec un analyseur automatique (Life-Scan, One Touch Vita). Le sang était ensuite centrifugé (5000 g, 15 min 4 °C) et placé à -20 °C. Les concentrations plasmatiques en insuline, FGF21 et IGF-1 ont été analysées en utilisant des dosage immuno-enzymatiques (ELISA) avec des kits commerciaux (ALPCO Rat insulins 80-INSRT-E01/ Mercodia Rat Insulin ELISA 10-1250-10/BioVendor Mouse-Rat FGF-21 ELISA RD291108200R/ALPCO Mouse-Rat IGF-1 ELISA 22-IG1MS-E01). A l'aide d'un automate Olympus AU400, les concentrations plasmatiques en acides gras non estérifiés, albumine, cholestérol, cholestérol HDL, glycérol et triglycérides ont été mesurées à la plateforme technique de l'hôpital Bichat à Paris (CEFI Bichat-Paris). Ces analyses de nutriments, d'hormones et de métabolites avaient pour but de caractériser les profils métaboliques spécifiques des différents régimes, comme biomarqueurs de statut nutritionnel.

Enfin, la concentration en triglycérides hépatiques a été déterminée. Pour cela, les morceaux de foie collectés durant la dissection (environ 80-100 mg), et préalablement congelés à -80 °C, ont été homogénéisés dans 1 mL de buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, and 0,1% Triton X-100) (Arakawa et al., 2011). La concentration a été déterminée en utilisant un kit de dosage commercial (Randox).

2.2.2.E. Métabolisme glucidique

2.2.2.A.c. Sensibilité à l'insuline

Afin de déterminer la résistance à l'insuline, nous avons utilisé l'indice HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance). Cet indice, décrit pour la première fois par Matthews et al. en 1985 est calculé tel que: $HOMA-IR = (insuline\ plasmatique\ (mU/L) \times glucose\ plasmatique\ (mg/dL)) / 405$ (Matthews et al., 1985). Il a été calculé avec les valeurs de glycémie et d'insulinémie mesurées sur les prises de sang décrites précédemment. Plus l'indice HOMA-IR est élevé, signifiant que la glycémie et l'insulinémie à jeun sont élevées, plus il y a résistance à l'insuline.

2.2.2.A.d. Tolérance au glucose

Les tests de tolérance au repas mesurent les conséquences des régimes sur l'évolution de l'insulinémie et de la glycémie. Les rats ont été préalablement mis à jeun pendant 16 heures durant la nuit, et les tests démarraient en fin de matinée. Une première prise de sang était faite à jeûn (T0') 30 minutes avant l'ingestion du repas test calibré en fonction des expériences. Une inspection visuelle permettait de vérifier que le repas a été ingéré. Des échantillons de sang ont ensuite été prélevés à T60', T120', T180', T240' et T360'. Les prises de sang, ainsi que les dosages plasmatiques d'insuline et de glucose sont décrites dans la partie « Dosages biochimiques ».

2.2.2.F. Biologie moléculaire

Dans le foie, le tissu adipeux brun, l'hypothalamus et le noyau accumbens (NAcc), collectés durant la dissection et conservés à -80°C, l'expression de certains gènes a été déterminée par PCR en temps réel. Pour cela les ARNs ont été extraits des tissus en utilisant du Trizol (Invitrogen), et chaque concentration a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoDrop). Après les avoir dilués, une rétrotranscription était effectuée sur 0,4 µg d'ARN. Enfin, la qPCR était réalisée sur un appareil Step One (Applied Biosystems) en utilisant du Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). L'expression du gène était calculée comme $2^{-\Delta CT}$ relativement au gène de ménage choisi pour chaque tissu.

2.2.3. Protocoles

Les objectifs et les protocoles des cinq expériences menées sont détaillés ci-dessous.

Expérience 1 : Choix protéique selon différentes teneurs en glucides et lipides

L'objectif de l'expérience 1 était d'identifier si le niveau de protéines sélectionné par des rats dans un modèle d'auto-sélection alimentaire (DSS) était impacté par les teneurs en glucides et lipides, et de fournir un profil métabolique de ces rats sous DSS. Nous avons pu voir dans l'introduction bibliographique, qu'il y avait un lien important entre l'hormone FGF21 et la consommation protéique, nous avons donc aussi exploré dans cette expérience l'évolution de la concentration plasmatique de FGF21 sous DSS.

Les rats de l'étude ont été soumis à un choix entre un régime purement protéique (noté 100P), et un régime sans protéine, où les glucides et les lipides étaient mélangés de telle sorte que les glucides représentaient 30, 45, 60 ou 75% de l'énergie. En parallèle un groupe témoin a reçu un régime composite standard. Ce régime standard a été conçu conformément aux exigences de l'AIN-93 (Reeves et al., 1993). Ainsi, en termes d'énergie, les protéines s'élevaient à 15%, les lipides à 10% et les glucides à 75%.

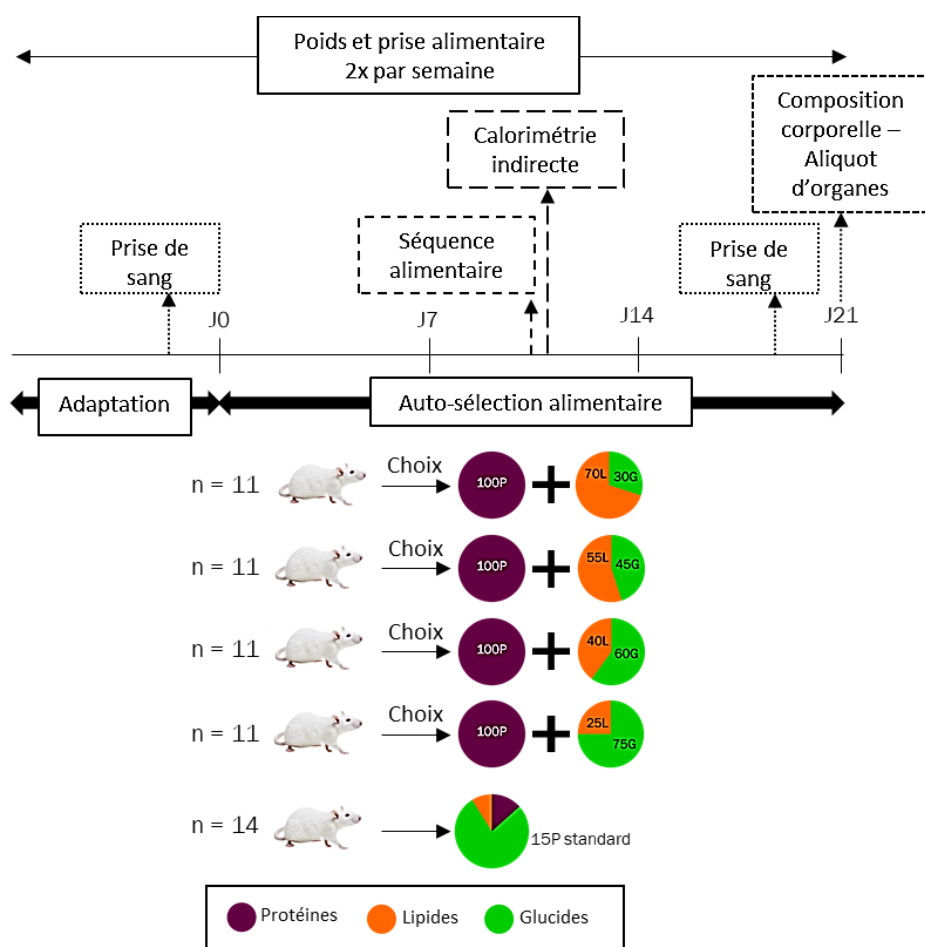


Figure 9. Protocole expérience 1 : Choix protéique selon différentes teneurs en glucides et lipides

Expérience 2 : Choix protéique selon différentes teneurs en protéines, glucides et lipides

L'objectif de l'expérience 2 était de vérifier si les niveaux de protéines sélectionnés par les rats de l'expérience 1 étaient défendus lorsque le modèle de DSS incorporé des régimes composites avec différentes teneurs en protéines, cela dans le but de confirmer une régulation forte de la consommation protéique. L'hypothèse était que, si ces niveaux étaient bien défendus, l'augmentation ou la diminution d'apport protéique induite par l'ingestion d'un troisième régime composite serait corrigée par des ajustements des choix alimentaires.

Quatre groupes de rats ont eu accès à un régime 100P, un régime sans protéine avec 60% de glucides et à un régime composite dans lequel le ratio glucides/(glucides+lipides), appelé aussi ratio glucides/énergie non protéique, était fixé à 60% et les protéines fournissaient 15, 30, 40 ou 50% de l'énergie (notés 15P, 30P, 40P ou 50P).

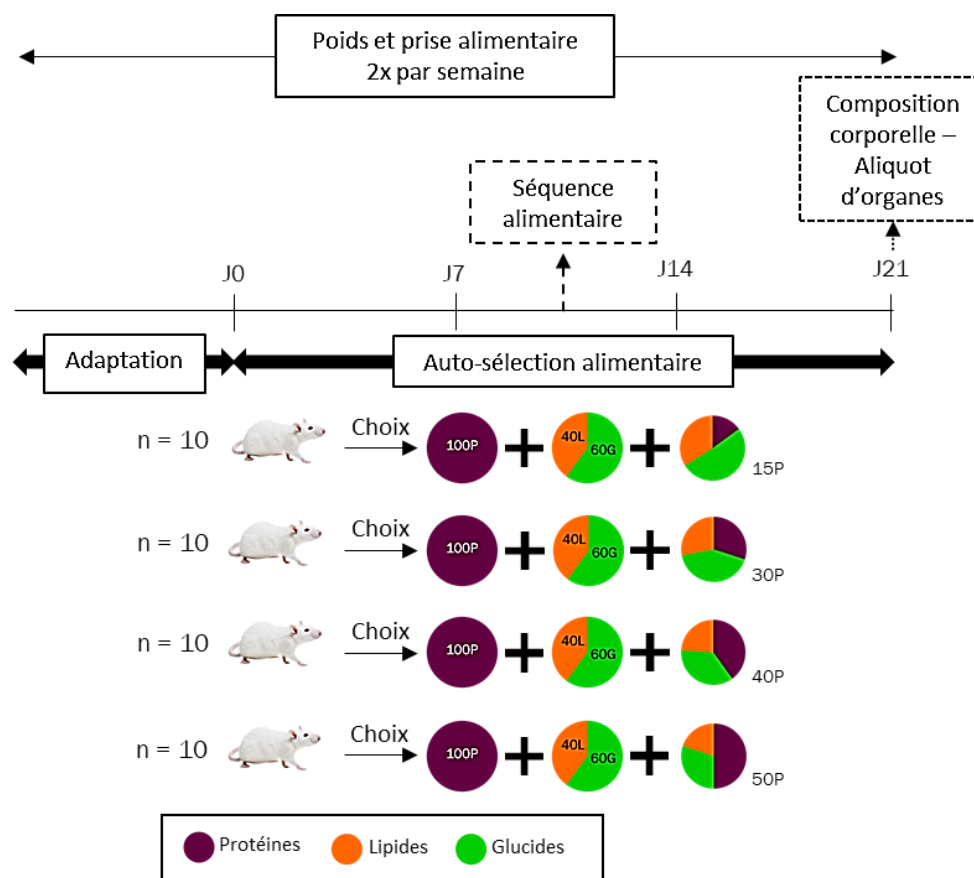


Figure 10. Protocole expérience 2 : Choix protéique selon différentes teneurs en protéines, glucides et lipides

Expérience 3 : Impact de la teneur en protéines sur le métabolisme énergétique

L'objectif de l'expérience 3 était d'étudier les effets de variations de teneurs en protéines (3% à 50%) couplées à des variations de teneurs en glucides et lipides, sur la prise alimentaire, la composition corporelle et la dépense énergétique. La question de savoir si FGF21 est régulé uniquement par les protéines ou si les glucides jouent aussi un rôle faisant toujours l'objet de débats, cette expérience avait aussi pour but de quantifier les rôles respectifs des glucides et des protéines dans la régulation à long terme du FGF21.

Plusieurs régimes alimentaires composites ont été utilisés, dans lesquels le ratio protéines/énergie (PE) était égal à 3, 5, 8, 15, 30, 40 ou 50%, et le ratio glucides/(glucides+lipides), appelé aussi ratio glucides/énergie non protéique, était égal à 30, 45, 60 ou 75%. L'ensemble des combinaisons possibles entre le ratio PE et le ratio glucides/(glucides+lipides) n'a pas été testé dans cette expérience, de par le temps et le trop grand nombre d'animaux nécessaires. Le tableau ci-dessous récapitule les combinaisons qui ont été testées et le nombre de rats utilisés pour chaque régime.

Tableau 1. Bilan des quatorze régimes composites utilisés dans l'expérience 3.

Les régimes sont définis selon leur combinaison entre le ratio protéines/énergie (PE) et le ratio glucides/(glucides+lipides).

		Ratio protéines/énergie (PE)						
		3%	5%	8%	15%	30%	40%	50%
Ratio glucides/(glucides +lipides)	30%	✗	6 rats	✗	6 rats	6 rats	✗	✗
	45%	6 rats	✗	6 rats	✗	6 rats	✗	✗
	60%	✗	6 rats	✗	6 rats	5 rats	6 rats	6 rats
	75%	6 rats	✗	6 rats	5 rats	✗	✗	✗

Nous avons choisi d'établir une valeur fixe du ratio glucides/(glucides+lipides) plutôt qu'une valeur fixe du ratio glucides/énergie dans les régimes, afin de mieux contrôler les effets de la teneur en lipides et glucides du régime, qui est connue pour affecter l'apport énergétique.

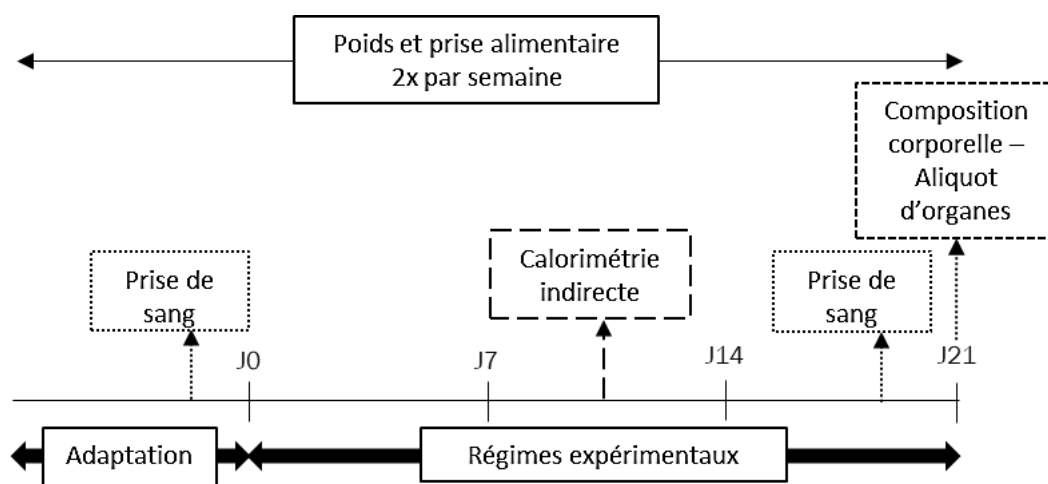


Figure 11. Protocole expérience 3 : Impact de la teneur en protéines sur le métabolisme énergétique

Expérience 3 complémentaire : Distinction des composantes de la dépense énergétique totale chez des rats nourris avec des régimes à faible teneur en protéines

En complément de l'expérience 3, nous avons cherché à distinguer les effets des régimes faibles en protéines étudiés sur les quatre composantes de la dépense énergétique totale (métabolisme de repos, dépense énergétique d'activité, thermorégulation, thermogénèse postprandiale). En effet, comme nous avons déjà pu le voir et comme va le confirmer l'expérience 3, ces régimes augmentent la dépense énergétique totale chez les rats sous régimes faibles en protéines. L'objectif de ce complément était donc de savoir quelle(s) composante(s) étaient impactée(s).

Pour cela, la mesure directe du coût de la thermorégulation et de la thermogénèse postprandiale a été faite par calorimétrie indirecte chez dix rats nourris avec soit un régime faible en protéines (5% de l'énergie), soit un régime normo-protéique (15% de l'énergie), et soumis à différentes températures.

Expérience 4 : Taux plasmatiques de FGF21 sous auto-sélection alimentaire

L'objectif de l'expérience 4 était de déterminer si les concentrations de FGF21 mesurées chez des rats témoins nourris avec un régime standard contenant 15% de protéines (noté 15P) étaient relatives à la consommation spontanée de protéines dans des conditions d'auto-sélection alimentaire. Cette expérience était en complément d'un des objectifs de l'expérience 1 (**Page 50**) visant à explorer l'évolution de la concentration plasmatique de FGF21 sous DSS.

Deux groupes de rats ont été utilisés : un groupe témoin nourris en continu avec un régime 15P pendant cinq semaines, et un groupe test nourris avec le régime 15P pendant deux semaines (phase 1) et ensuite autorisé à choisir entre un régime 100P et un régime sans protéine avec 60% de glucides pendant trois semaines (phase 2).

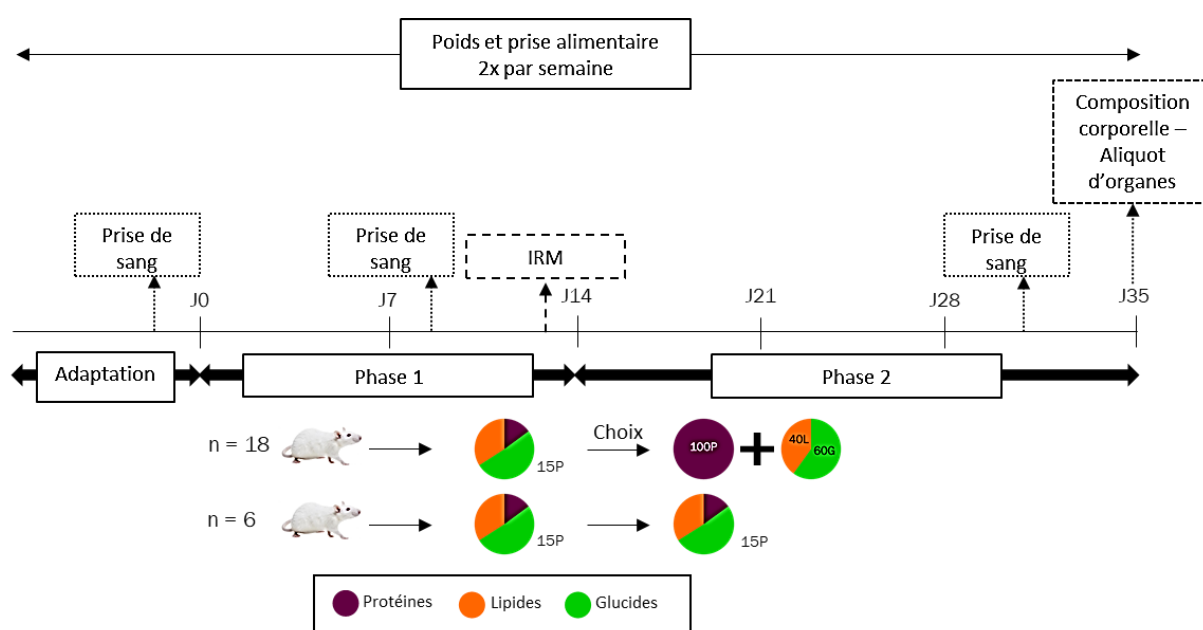


Figure 12. Protocole expérience 4 : Taux plasmatiques de FGF21 sous auto-sélection alimentaire

Expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique

L'objectif de l'expérience 5 était d'identifier si la sélection de protéines sous DSS était modifiée par l'indice glycémique des régimes sans protéine proposés. Afin de mieux comprendre l'intérêt de la consommation élevée de protéines sous DSS, nous avons exploré les effets sur la glycémie, l'insulinémie et l'oxydation du glucose et des lipides induites par l'ingestion d'un régime à 15% de protéines (niveau équivalent au besoin protéique) et d'un régime à 30% de protéines (niveau sélectionné en moyenne sous DSS).

Trois groupes de rats ont été utilisé :

- Un premier groupe a été soumis pendant 1 semaine (phase 1) à un choix entre un régime 100P et un régime sans protéine standard (CF-St) composé de 85% de glucides et de 15% de lipides, basé sur les recommandations AIN-93 (Reeves et al., 1993). Dans la phase 2, d'une durée de 3 semaines, les rats ont eu le choix entre un régime 100P et un régime sans protéine différent selon chaque groupe, dont : le régime CF-St; un régime basé sur la composition du régime CF-St, où une partie de l'amidon est remplacée par du saccharose (CF-Sacc); un régime également basé sur le régime CF-St avec une supplémentation en inuline (CF-I) (l'inuline appartient à une classe de glucides appelés fructanes, dont l'administration fait baisser la glycémie (Kaur and Gupta, 2002)); un mélange riche en graisses contenant 45% de glucides et 55% de graisses (CF-HF).

Deux tests de tolérance au repas ont été réalisés : 1. ingestion d'un seul repas sans protéine de 31,5 kJ (CF-St, CF-Sacc, CF-I ou CF-HF); 2. ingestion des mêmes repas sans protéine précédée 15 minutes avant par l'ingestion d'un repas 100P de 13,5 kJ. Ainsi, 30% de l'énergie était fournie par le repas protéiné. L'établissement de ce ratio PE de 30% a été défini en accord la littérature.

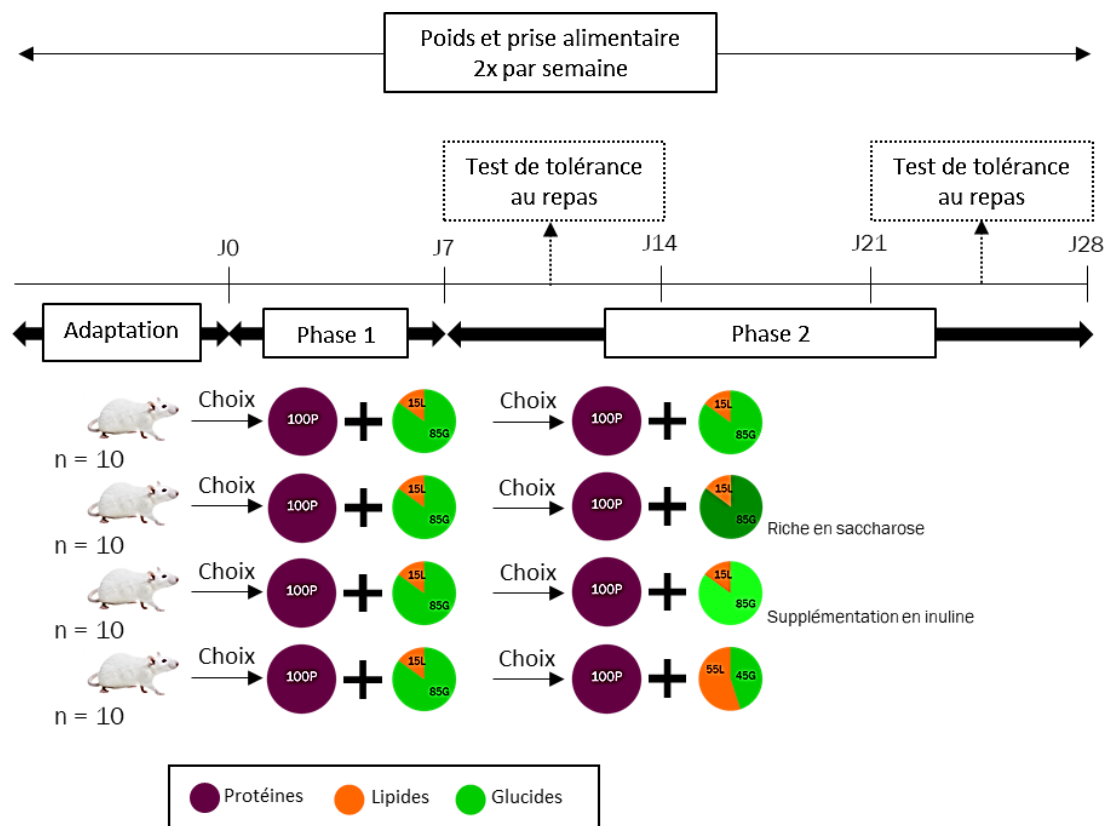


Figure 13. Protocole expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique (groupe 1)

- Un second groupe a été nourris pendant 2 semaines avec un des 8 régimes composites, composé de 15% de protéines (niveau équivalent au besoin) ou 30% de protéines (niveau de choix), et l'un des quatre mélanges sans protéine (CF-St, CF-Sacc, CF-I ou CF-HF).

Un test de tolérance au repas a été réalisé avec un repas composite calibré à 45 kJ, identique à la somme des repas 100P et sans protéine donnés dans le premier groupe. L'effet thermique des différents régimes composites a été mesuré avec un repas calibré identique par calorimétrie indirecte.

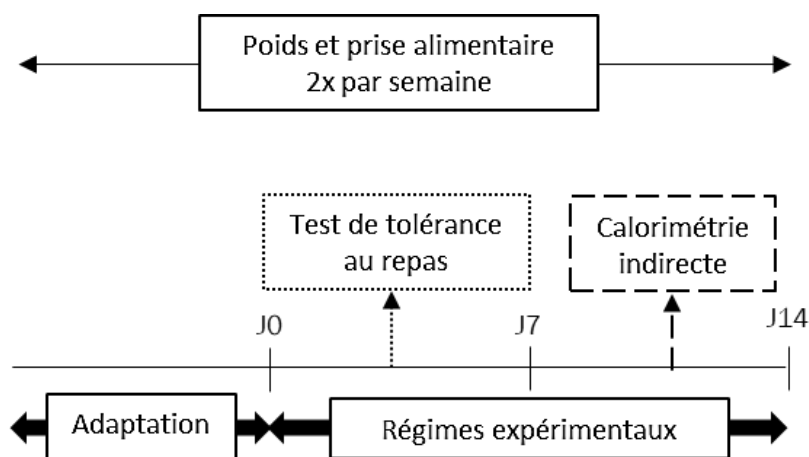


Figure 14. Protocole expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique (groupe 2)

- Un troisième groupe a été soumis pendant 2 semaines à un choix entre le régime 100P et l'un des quatre régimes sans protéine (CF-St, CF-Sacc, CF-I ou CF-HF) selon leur groupe.

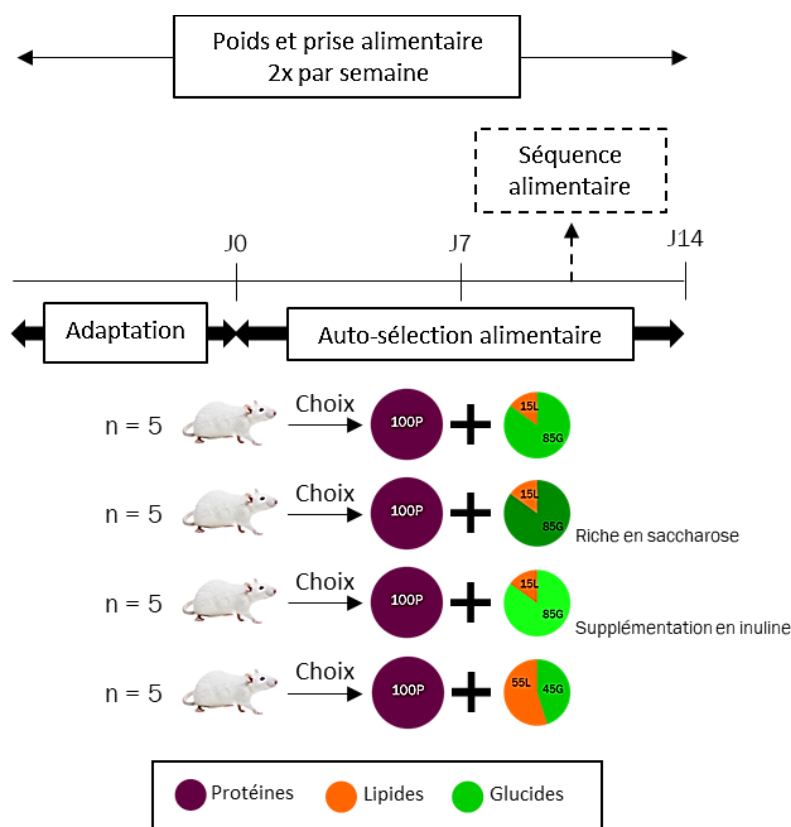


Figure 15. Protocole expérience 5 : Choix protéique selon l'indice glycémique (groupe 3)

Bilan

Les résultats de ces cinq expériences ont abouti à l'écriture de 5 articles. L'utilisation des expériences dans chaque article est résumée dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Bilan de l'utilisation des expériences dans les articles.

	Article 1	Article 2	Article 3	Article 4
Expérience 1 Choix protéique selon différentes teneurs en glucides et lipides	X			
Expérience 2 Choix protéique selon différentes teneurs en protéines, glucides et lipides	X			
Expérience 3 Impact de la teneur en protéines sur le métabolisme énergétique	X	X	X	
Expérience 4 Taux plasmatiques de FGF21 sous d'auto-sélection alimentaire			X	
Expérience 5 Choix protéique selon l'indice glycémique				X

2.3. Articles

2.3.1. Etude 1 - *Plutôt qu'un ratio protéines/énergie constant, les rats sélectionnent un ratio protéines/glucides constant et présentent des faibles concentrations plasmatiques de FGF21 en condition de choix alimentaire*

Contexte et objectifs de l'étude

En condition d'auto-sélection alimentaire (« *dietary self-selection* » DSS), les rats ingèrent 25 à 30% de l'énergie sous forme de protéines, bien plus que ce qui est nécessaire pour préserver l'équilibre azoté (~15% de l'énergie). Ce niveau d'apport protéique élevé est défendu quand les protéines sont diluées ou ont une qualité plus faible. De plus, il s'ajuste selon des paramètres environnementaux, physiologiques ou nutritionnels, de sorte qu'il semble plus faible avec des régimes riches en graisses et inversement. Certains auteurs ont alors suggéré que plutôt que le ratio protéines/énergie (PE), c'est le ratio protéines/glucides (PG) qui est le paramètre contrôlé, généralement à une valeur comprise entre 60-80%. Les ratios PE et PG élevés semblent s'expliquer par des avantages métaboliques liés à la réduction de la dépendance aux glucides et aux pathologies associées. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent ces choix restent largement incompris.

L'objectif de cette étude était de tester l'hypothèse selon laquelle, dans un modèle de DSS, les rats sélectionnent un ratio PE pour maintenir constant le ratio PG, et que FGF21 est impliqué dans cette réponse. En effet, FGF21 s'est révélé être une hormone importante signalant le niveau d'apport en protéines, puisqu'elle augmente de façon exponentielle lorsque l'apport diminue en dessous des niveaux nécessaires pour préserver l'équilibre azoté (10-15%). À notre connaissance, les niveaux plasmatiques de FGF21 chez les rats sous DSS n'ont pas encore été mesurés.

Méthodes

Des rats Wistar mâles adultes ont été utilisés pour :

- Déterminer si le ratio PE était influencé par des changements dans la teneur en glucides et lipides, dans un modèle de DSS avec un régime purement protéique et un régime sans protéine, et fournir un profil métabolique de ces rats (**Expérience 1 - Page 50**) ;
- Tester si le ratio PE était défendu lorsque le modèle de DSS induit des changements de teneur en protéines (**Expérience 2 – Page 51**) ;
- Déterminer si le ratio PE sélectionné présentait un intérêt métabolique par rapport à un régime standard à 15% de protéines (**Régime 15P et 30P de l'Expérience 3 – Page 52**).

Les analyses statistiques ont été effectuées principalement par des tests ANOVA et des tests de corrélation.

Résultats principaux

Chez les rats sous DSS (**Expérience 1 - Page 50**), choisissant entre un régime 100P et un régime sans protéine avec 30, 45, 60 ou 75% de glucides, le poids corporel final ainsi que le gain de poids étaient similaires indépendamment des teneurs en glucides et lipides. Ils étaient cependant plus faibles que chez des rats nourris avec un régime composite témoin (contenant 15% de protéines).

Les poids de la masse maigre, de la masse grasse et de l'adiposité étaient similaires dans tous les groupes (DSS et témoins). Le ratio PE sélectionné était en moyenne de 30%, et a augmenté de 20 à 35% lorsque la teneur en glucides du régime sans protéine a augmenté de 30 à 75% ($R^2 = 0,56$; $P < 10^{-6}$). Par conséquent, le ratio PG était constant (environ 70%) dans tous les groupes ($P = 0,180$). Dans l'ensemble des groupes sous DSS, les rats préféraient consommer les régimes (100P et sans protéine) ensemble d'autant plus quand le régime sans protéine contenait beaucoup de glucides, indiquant qu'ils mélangeaient plus facilement les protéines et les glucides mais pas les protéines et les lipides. La dépense énergétique totale était similaire chez tous les rats en DSS, et plus élevée que chez les rats témoins 15P. Les mesures d'oxydation protéique ont mis en évidence que les protéines ingérées au-dessus de 29,7 kJ/d étaient catabolisées ($P_{ox} = \text{Intake} \times 1,02 - 29,7$, $R^2 = 0,976$). Cette valeur correspondait exactement à la quantité de protéines retenues dans l'organisme, qui était aussi similaire chez tous les rats. Ce résultat indique bien qu'à partir du moment où les protéines ont rempli leur fonction de renouvellement, elles sont dirigées vers le métabolisme énergétique.

Dans le second modèle de DSS (**Expérience 2 – Page 51**), où les rats choisissaient entre un régime 100P, un régime sans protéine avec 60% de glucides et à un régime composite dans lequel les protéines fournissaient 15, 30, 40 ou 50% de l'énergie, le poids corporel final ainsi que le gain de poids étaient similaires au premier modèle. Le ratio PE sélectionné était toujours en moyenne de 30% et ne variait pas selon les teneurs en protéines des régimes composites. Cela permettait le maintien d'un ratio PG à environ 70%. Ces résultats confirment le fait que le niveau de protéines est une valeur défendue.

Lorsque les rats étaient nourris avec des régimes composites riches en graisse ou riche en glucides et soit 15% soit 30% de protéines (**Régime 15P et 30P de l'Expérience 3 – Page 52**), les rats avec 30% étaient moins sujets à la prise de masse grasse et l'augmentation de l'adiposité que ceux avec 15%. De plus, ils avaient tendance à consommer moins d'énergie. Ces résultats indiquent que les régimes avec 30% de protéines, correspondant au niveau choisi sous DSS, préserve les rats d'une augmentation d'apport énergétique et ainsi d'une augmentation de masse grasse induite par des régimes riches en graisses.

Enfin, il a été montré que chez les rats sous DSS, les concentrations plasmatiques de FGF21 étaient 3 fois plus faibles que chez les rats témoins avec le régime à 15% de protéines ($P < 10^{-4}$), et similaires à celles des rats nourris avec un régime à 30%.

Conclusion

Ces résultats indiquent que l'apport optimal en protéines est supérieur au niveau nécessaire à l'équilibre azoté et qu'il fluctue en fonction de la teneur en glucides du régime alimentaire pour maintenir un ratio protéines/glucides stable. Les faibles niveaux plasmatiques de FGF21 chez les rats en choix, comparés aux rats nourris avec un régime composite contenant 15% de l'apport énergétique total sous forme de protéines, suggèrent qu'ils ont consommé suffisamment de protéines. FGF21 joue probablement un rôle dans l'orientation des choix alimentaires vers les protéines pour maintenir un rapport protéines/glucides élevé et réduire la dépendance du métabolisme énergétique à l'insuline.

Manuscrit de l'article 1

Le manuscrit a été accepté et publié dans Journal of Nutrition (DOI : <https://doi.org/10.1093/jn/nxab056>).

Rats self-select a constant protein-to-carbohydrate ratio rather than a constant protein-to-energy ratio and have low plasma FGF21 concentrations

Josephine Gehring, Dalila Azzout-Marniche, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, Patrick C. Even

Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE. UMR PNCA, 75005, Paris, France

Corresponding author: Patrick C. Even, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, 75005, Paris, France. +33 (0)1 44 08 79 42. patrick.even@agroparistech.fr

Sources of support: This study was supported by the Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE); by the doctoral school Agriculture Alimentation Biologie Environnement Santé (ABIES); and by the research unit Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions: D.A-M., J.G., C.G. and P-C.E. designed research; C.C., D.A-M., J.G., J.P. and P-C.E. conducted research; J.G., J.P. and P-C.E. analyzed data; J.G., C.C., D.A-M, C.G and P-C.E. drafted the original manuscript; J.G. and P-C.E. have primary responsibility for final content. All authors read and approved the final version.

Abbreviations: AMM: Active metabolic mass; CnpE ratio: Carbohydrate-to-non-protein-energy ratio; DSS: Diet self-selection; EE-Act: Energy expended in relation to activity; FGF21: Fibroblast growth factor 21; FQ: Food quotient; HDL: High Density Lipoprotein; HOMA-IR: Homeostatic model assessment of insulin resistance; LBM: Lean body mass; NEFA: Non-esterified fatty acids; PC ratio: Protein-to-carbohydrate ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio; REE: Resting energy expenditure; RQ: Respiratory quotient; SEM: Standard error of the mean; TEE: Total energy expenditure; TG: Triglycerides.

Abstract

Background. Under dietary self-selection (DSS), rats ingest 25–30% of energy as protein. This high level appears to be explained by metabolic benefits related to reduced carbohydrate dependence and associated pathologies. However, the mechanisms underlying these choices remain largely misunderstood. **Objectives.** The aim was to test the hypothesis that in a DSS model, rats select a protein-to-energy (PE) ratio to maintain the protein-to-carbohydrate (PC) ratio constant and that fibroblast growth factor 21 (FGF21) is involved in this response. **Methods.** Adult male Wistar rats were used in 3 experiments. The first was to determine whether the PE ratio was influenced by changes in carbohydrate content. The second was to test whether the PE ratio was defended with a modified DSS model. The third was to determine whether the selected PE ratio was of metabolic interest compared with a standard 15%protein diet. Food intake, body weight, and energy expenditure were measured. After 3 wk, plasma was sampled and rats were killed to determine body composition and gene expression. Statistical analyses were mainly done by ANOVA tests and correlation tests. **Results.** The selected PE ratio increased from 20% to 35% when the carbohydrate content of the protein-free diet increased from 30% to 75% ($R^2 = 0.56$; $P < 10^{-6}$). Consequently, the PC ratio was constant (70%) in all groups ($P = 0.18$). In self-selecting rats, plasma FGF21 concentrations were 3 times lower than in rats fed the 15% protein diet ($P < 10^{-4}$) and similar to those in rats fed a 30% diet. **Conclusions.** This study showed that self-selecting rats established PE ratios larger than those considered sufficient to achieve optimal growth in adult rats (10–15%), and the ratios were highly dependent on carbohydrates, apparently with the aim of maintaining a constant and high PC ratio. This was associated with a minimization of plasma FGF21.

Key words. Diet self-selection, Fibroblast growth factor 21, Protein intake, Protein-to-carbohydrate ratio, Meal pattern, Energy expenditure, Body composition.

Introduction

Dietary self-selection (DSS) is used to study macronutrient, vitamin, and mineral requirements in farm animals and laboratory rodent models (Richter, Holt, et Barelare 1938; Collier, Leshner, et Squibb 1969a; Kanarek 1985; Shor-Posner et al. 1991; Even, Gehring, et Tomé 2021). It has been observed that rats on DSS can ingest as much as 30 to 50% of total energy intake as protein (Musten, Peace, et Anderson 1974; Castonguay et al. 1982; Peters et Harper 1984; Mullen et Martin 1992; Jean et al. 2002; Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016), far more than required to preserve nitrogen balance (~15% of energy) (FAO/WHO/UNU Expert Consultation 1985). Thus emerged the question of whether the selection of such a high protein-to-energy (PE) ratio in self-selecting rats passively results from a weak regulation of protein intake or is finely adjusted and defended. The studies performed to answer this question have shown that the PE ratio is defended when proteins are diluted (Musten, Peace, et Anderson 1974; Booth 1974), increased when the nutritional quality of the protein is decreased (Kishi et al. 1982; Henry et Rerat 1963; Ashley et Anderson 1975), or adjusted in accordance with changes in metabolic requirements as affected by environmental (cold, exercise) or physiological (pregnancy, lactation, age) factors (Donhoffer et Vonotzky 1947; Collier, Leshner, et Squibb 1969b; 1969a; Musten, Peace, et Anderson 1974; Ashley 1985; Thouzeau 1995; Tomé et al. 2020). Some studies have also reported that the selected PE ratio was lower with high-fat diets (Richter, Holt, et Barelare 1938; Chee, Romsos, et Bergen 1981; Romsos et Ferguson 1982). Accordingly, some authors have suggested that rather than the PE ratio, it is the protein-to-carbohydrate (PC) ratio that is the controlled parameter, generally at a value between 60% and 80% (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Chee, Romsos, et Bergen 1981; Pol et den Hartog 1966). Selection of high PC ratio would induce metabolic benefits (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Larue-Achagiotis et al. 1992; Rieth et Larue-Achagiotis 1997), in particular, a reduced dependence on glucose metabolism. This leads to lower insulinemia, better preservation of fasting blood glucose concentrations, and reduced lipogenesis in liver and adipose tissue, in turn leading to lower gains in weight and adiposity in the long-term.

The mechanisms that regulate the PE ratio in self-selecting rats are still unresolved. One hypothesis is that self-selecting rats attempt to preserve a constant PC ratio because by altering the circulating plasma levels of tryptophan to large neutral aminos, this ratio would be involved in controlling brain serotonin synthesis and signaling. However, to date, no conclusive demonstration of this mechanism has been provided (Ashley, Coscina, et Anderson 1979; Peters et Harper 1981). On the other hand, Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) has been revealed as an important hormone signaling the level of protein intake. Plasma FGF21 levels increase exponentially when protein intake decreases below levels close to those considered necessary to preserve nitrogen balance (10-15%), and FGF21 is now considered as an essential regulator of the behavioral and metabolic responses to protein restriction (Hill et al. 2017;

2018; 2019; Laeger et al. 2014; Chaumontet et al. 2019; Gosby et al. 2016). To our knowledge, plasma FGF21 levels in self-selecting rats have not yet been measured.

The hypothesis of the present study was that rats self-selecting between a protein diet and a protein-free diet would select a PE ratio that would vary as a function of the carbohydrate content of the protein-free diet and that, in all cases, they would maintain low plasma FGF21 levels. FGF21 levels in self-selecting rats were also compared to those in rats fed composite diets containing 15% and 30% of energy as protein.

Methods

Animals and housing

The experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609 EEC) regarding the care and use of laboratory animals and were approved by the French Ethical Committee (APAFIS#16996).

Seven-week-old male rats (215-240 g) of the Wistar RccHan strain were used (ENVIGO, Indianapolis, United States). The rats were delivered weekly by groups of 10 and randomly assigned to one of the experimental diets, for a total of 120 rats. After one week of adaptation to the laboratory conditions (temperature $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, humidity 60%, 12/12 L/D cycle lights on at 08:00), the rats were singly housed for three weeks in Plexiglas cages bedded with wood shavings. The temperature of 24°C was used to maintain the rats close to the lower range of thermal neutrality and reduce the cost of thermal regulation.

Experimental diets and pellet preparation

The protein diet, named 100P, was composed with protein only. In the protein-free diets, carbohydrates and lipids were mixed so that carbohydrates amounted to 30%, 45%, 60%, or 75% by energy. This ratio is referred to as the carbohydrate-to-non-protein-energy (CnpE) ratio, and protein-free diets were then named in the form xxCnp. The composite diets were composed of a mixture of proteins, carbohydrates, and lipids, and named according to their PE and CnpE ratios in the form xxPxxCnp. We worked with constant CnpE ratios rather than constant carbohydrate-to-energy ratios in order that the carbohydrate-to-lipid ratios, susceptible to strongly affect energy intake, were the same in self-selecting rats and in those fed the composite diets (**Table 1; Supplementary table 1**).

The food pellets were prepared twice per week from dry powders manufactured at the unit Sciences de l'Animal et de l'Aliment de Jouyen-Josas—Equipe Régimes à Façon. Proteins were whole-milk proteins LR 85F (Armor Protein), carbohydrates were corn starch (Roquette) and sucrose (Eurosucré), and lipids were soy oil (Bailly SA). All diets were complemented with minerals and vitamins according to the American Institute of Nutrition Rodent Diet 93 (AIN-93) requirements (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). The powders were mixed with the necessary amount of water to make a consistent dough and

then formed into pellets sufficient for 3 d of feeding. The pellets were left to dry at room temperature for 3 d before being given to the rats. The diets and water were provided ad libitum.

Table 1. Composition and energy content of tested diets. CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PC ratio: Protein-to carbohydrate ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.

	15P87Cnp control	100P	30Cnp	45Cnp	60Cnp	75Cnp	15P30Cnp	15P60Cnp	30P30Cnp	30P60Cnp	40P60Cnp	50P60Cnp
Whole milk protein (g/kg)	140	957	-	-	-	-	208	166	380	319	416	507
Corn starch (g/kg)	622	-	408	528	620	690	318	507	239	402	334	272
Sucrose (g/kg)	100	-	66.0	85.0	100	111	51.9	81.7	38.5	64.7	53.9	43.8
Soy oil (g/kg)	40	-	429	290	183	102	327	149	246	117	98.6	80.2
Mineral compound AIN-93M (g/kg)	35.0	31.9	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin compound AIN-93Vx (g/kg)	10.0	9.11	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose (g/kg)	50.0	45.6	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Choline chloride (g/kg)	2.30	2.10	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30
Energy (kJ/g)	15.0	15.0	24.3	21.0	18.4	16.5	21.5	17.4	19.7	16.7	16.4	16.0
PE ratio (%)	15.0	100	-	-	-	-	15.2	15.0	30.3	30.0	40.1	50.0
CnpE ratio (%)	87.2	-	30.0	45.0	60.0	75.0	31.5	61.6	31.4	61.7	62.7	62.7
PC ratio (%)	20.0	-	-	-	-	-	57.0	29.0	138	69.0	109	163
Carbohydrate-energy ratio (%)	75.0	-	30.0	45.0	60.0	75.0	26.7	52.4	21.9	43.2	36.9	30.7
Fat-energy ratio (%)	11.0	-	70.0	55.0	40.0	25.0	58.1	32.7	47.8	26.8	23.1	19.2

Energy and macronutrient intake

Diet intake (g/d) was measured twice per week by weighing pellets and then converted to kJ/d according to the energy content of the diet and after correction for the pellet water content (**Table 1**). The water content at the time of weighing was calculated based on the water evaporation curve determined on pellets produced at the same time as those given to the rats.

In the DSS model, meal patterns were combined to analyze the timing of ingestion of each diet. Feeding bouts that were separated by <10 min were considered a single meal and grouped. Meal pattern was analyzed to report the energy intake from each diet, the number of single and mixed meals, and the sequence of ingestion of different diets within mixed meals.

Measurement of energy expenditure, spontaneous motor activity and cost of activity by indirect calorimetry

The rats were housed singly for two days in an indirect open-circuit calorimeter simultaneously monitoring five cages. Temperature in the calorimetry cages was about 2°C higher than in the home cages because of the heat released by the rat but remained in the window of thermal neutrality in rats. As previously described (Even et Nadkarni 2012), oxygen consumption and carbon dioxide production were recorded, and the cages were placed on an activity platform (scale 0-5 kg, sensitivity 0.1 g) and

equipped with food cups (sensitivity 0.01 g) to measure spontaneous motor activity and feeding pattern. Total metabolic rate was computed using oxygen consumption and carbon dioxide production (VO_2 and VCO_2), in mL.min⁻¹, according to a modification of the Weir formula to get data in Watts (J.sec⁻¹) (Even et Nadkarni 2012): $(16.3 \times VO_2 + 4.57 \times VCO_2) / 60$. Energy intakes, total energy expenditure (TEE), energy expended in relation to activity (EE-Act) and resting energy expenditure (REE=TEE-EE-Act) were calculated and expressed in kJ/d. The energy cost of activity (Watt/Activity Unit) was calculated as the slope of the relationship between total metabolic rate and activity level (Even et Nadkarni 2012). Energy balance was calculated by difference between energy intake and energy expenditure. Respiratory quotient (RQ) was calculated from the ratio of carbon dioxide production to oxygen consumption (VCO_2/VO_2). Differences between RQ and food quotient (FQ) were calculated to indicate the orientation of the metabolic processes toward storage (RQ>FQ) or degradation (RQ<FQ) (Even et Nadkarni 2012).

Protein oxidation (Pox) (kJ/d) was estimated from protein intake assuming that, in all rats, a constant amount of protein (29.7 kJ/d) remained fixed in the body and was therefore not oxidized (see Biochemistry section and **figure 3**). After Pox was established on each individual, the oxidation of glucose (Gox) and lipids (Lox) were derived according to the calculations summarized in **Supplementary table 2**.

Body weight, body composition and tissue sampling

Body weight (g) was measured twice per week throughout the experiments. At the end of the studies, the rats were deeply anesthetized with isoflurane, blood was collected from the vena cava until cardiac arrest and the rats were immediately decapitated to ensure death. Body composition was measured by dissection and weighing the main tissues and organs. Pieces of liver were quickly dissected, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analysis of gene expression and triglyceride (TG) levels.

Adiposity was calculated as total fat mass divided by body weight, and lean body mass (LBM) as body weight minus total fat. Active metabolic mass (AMM) (g) was calculated as the weight of lean body mass (LBM) plus 20% of the weight of fat mass and used to normalize energy intake, REE and TEE as initially suggested by Arch et al. (2006). More recently, we have confirmed the validity of this mode of adjusting for body composition, showing that it erased the effects of difference in AMM on TEE (Chaumontet et al. 2019) revealed by analysis of co-variance and was also the best way to reduce the variability of TEE and REE within groups (Azzout-Marniche et al. 2014; Nadkarni et al. 2013; François et al. 2017).

Biochemistry

Protein oxidation (Pox) was measured from urine urea collected over 24h while the rats were housed in metabolic cages: $\text{Pox (kJ/d)} = \text{Urea (g)} \times 6.25 \times 16.75$ (Even et Nadkarni 2012). Urinary levels of urea were determined on an Olympus AU400 robot by the technical platform of Bichat Hospital in Paris (CEFI Bichat-Paris).

Blood samples (0.5 mL) were collected from the tail vein in EDTA tubes in the morning (10:00-12:00) from rats that had not been previously fasted. A drop was immediately used to measure blood glucose with an automatic analyzer (Life-Scan, One Touch Vita). Then the blood was centrifuged (5000 g, 15 min, 4°C) and the plasma stored at -20°C until assayed. Plasma levels of glycerol, non-esterified fatty acids (NEFA), albumin, cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol and TG were determined on an Olympus AU400 robot (CEFI Bichat-Paris). Plasma insulin and FGF21 were assayed by ELISA tests using commercial kits from Mercodia (Rat Insulin ELISA 10-1250-10) and BioVendor (Mouse/Rat FGF-21 ELISA RD291108200R). The Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance (HOMA-IR) index was calculated as: $(\text{plasma insulin (pmol/L)} \times \text{plasma glucose (mmol/L)}) / 405$ (Matthews et al. 1985).

Some liver samples collected during dissection (80 -100 mg each) were homogenized in 1 mL of buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCL and 0.1% Triton X-100) (Arakawa et al. 2011) and their TG level was determined using a commercial kit (Randox).

Molecular biology

As previously described (Chaumontet, Azzout-Marniche, et al. 2015), RNAs were extracted from tissue samples in TRIzol® reagent (Invitrogen, Breda, The Netherlands), and the concentrations were measured (NanoDrop One spectrophotometer). After dilution, 0.4 µg of total RNA was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using a StepOne Real-time PCR (Applied Biosystems) and the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Gene expression was calculated as $2^{-\Delta\text{CT}}$ relative to 18s RNA (housekeeping gene). Target genes and primers used are detailed in **Supplementary Table 3**.

Statistical Analysis

Statistical tests were performed using RStudio software (2015; Integrated Development for R, RStudio, Inc.; Boston, USA). Some values are presented in tables (means $\pm$ standard error of the mean (SEM)) and other values in the form of boxplot. A threshold of $P \leq 0.05$ was chosen as significant. Between-group comparisons were performed by 1-way or 2-way ANOVA. The tested parameters were: energy intake, diet intakes, macronutrient intakes, PE ratio, PC ratio, meal size, meal number, body weight, daily body weight gain, LBM, fat mass, adiposity, fat distribution between subcutaneous and visceral pads, activity, cost of activity, EE-Act, TEE, REE, energy balance, plasma parameters (glucose, insulin,

HOMA-IR, glycerol, NEFA, albumin, cholesterol, HDL cholesterol, TG, FGF21), liver TG and expression of Fgf21 RNA in liver. When main effects were significant, ANOVA tests were followed by post-hoc Bonferroni tests. Significance of correlations between parameters was assessed using the Pearson correlation coefficient.

Experiments

Experiment 1: Protein selection as a function of the carbohydrate content of the protein-free diet. The goal of this study was to identify whether the CnpE ratios of the protein-free diet had an impact on the protein selection and to provide a metabolic profile of rats under DSS model. Four groups of 11 rats had a choice between a 100P diet and a protein-free diet that, according to the group, was 30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp (**Table 1**). The four groups were named P-30Cnp, P-45Cnp, P-60Cnp and P-75Cnp (**Supplementary table 1**). Another group of 14 rats was fed a composite 15P87Cnp diet and served as a control group. This 15P87Cnp control diet was designed according to the AIN-93 requirements (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). Accordingly, by energy, proteins amounted to 15%, lipids to 10%, carbohydrates to 75% and therefore the CnpE ratio was 87% (**Table 1**). Between-group comparisons were performed by 1-way ANOVA tests, using diet of each group (P-30Cnp, P-45Cnp, P-60Cnp, P-75Cnp and 15P87Cnp) as a factor (parameter ~ diet).

Experiment 2: Challenging protein selection by extending dietary choice to a composite diet. Experiment 1 showed that rats choosing between a protein and various protein-free diets selected high PE ratios (20 to 35%). The aim of this second experiment was to verify whether the PE ratio, established by the rats choosing between a protein diet and a protein-free diet, was defended when composite diets with various protein contents were simultaneously available. The assumption was that, if the PE ratio selected in the two-choice conditions was defended, the increase or decrease in PE ratios induced by the ingestion of the third composite diets would be corrected by appropriate adjustments in the level of intake of the protein and protein-free diets. Four groups of 10 rats were given access to a 100P diet, a 60Cnp protein-free diet and a composite diet in which the CnpE ratio was fixed at 60% and, according to the group, proteins provided 15%, 30%, 40% and 50% of energy (**Table 1**). The four groups were named according to the protein level in the composite diet followed by “3Ch” to remind the three choices conditions (15P-3Ch, 30P-3Ch, 45P-3Ch and 60P-3Ch) (**Supplementary table 1**). Between-group comparisons were performed by 1-way ANOVA tests, using diet of each group (15P-3Ch, 30P-3Ch, 45P-3Ch and 60P-3Ch) as a factor (parameter ~ diet).

Experiment 3: Influence of the self-selection process on energy balance. Experiment 1 demonstrated that in self-selecting rats, fat mass gain and adiposity were not significantly increased when the CnpE ratio of the protein-free diet was reduced (and conversely, the fat content was increased), but we also observed that in more than half of the meals, protein intake occurred as meals of pure protein. Thus, the aim of this experiment was to determine whether the possibility to separate intake of the protein and

protein free-diet under dietary self-selection played a significant role in the resistance to fat mass gain. Four groups of 6 rats were fed composite diets with two PE ratios (15 and 30%) and two CnpE ratios (30 and 60%). The aim was to compare the effects of increasing dietary protein content from 15% to 30% in low fat and high fat fed rats that had not the possibility to separate ingestion of protein from ingestion of carbohydrate and fat. The groups were named according to their diets: 15P30Cnp, 15P60Cnp, 30P30Cnp and 30P60Cnp (**Table 1; Supplementary table 1**). Between-group comparisons were performed by 2-way ANOVA tests, using PE and CnpE ratios of the diets as factors (parameter ~ PE ratio * CnpE ratio).

Results

Experiment 1: Protein selection as a function of the carbohydrate content of the protein-free diet

Body weight and body composition

Minor differences were observed in final body weight and weight gain, which were slightly lower in the 15P87Cnp control group compared to all self-selecting groups (**Table 2**). No differences were observed in LBM, total fat mass, adiposity, and fat distribution between subcutaneous and visceral pads.

Table 2. Body weight and body composition of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1)¹

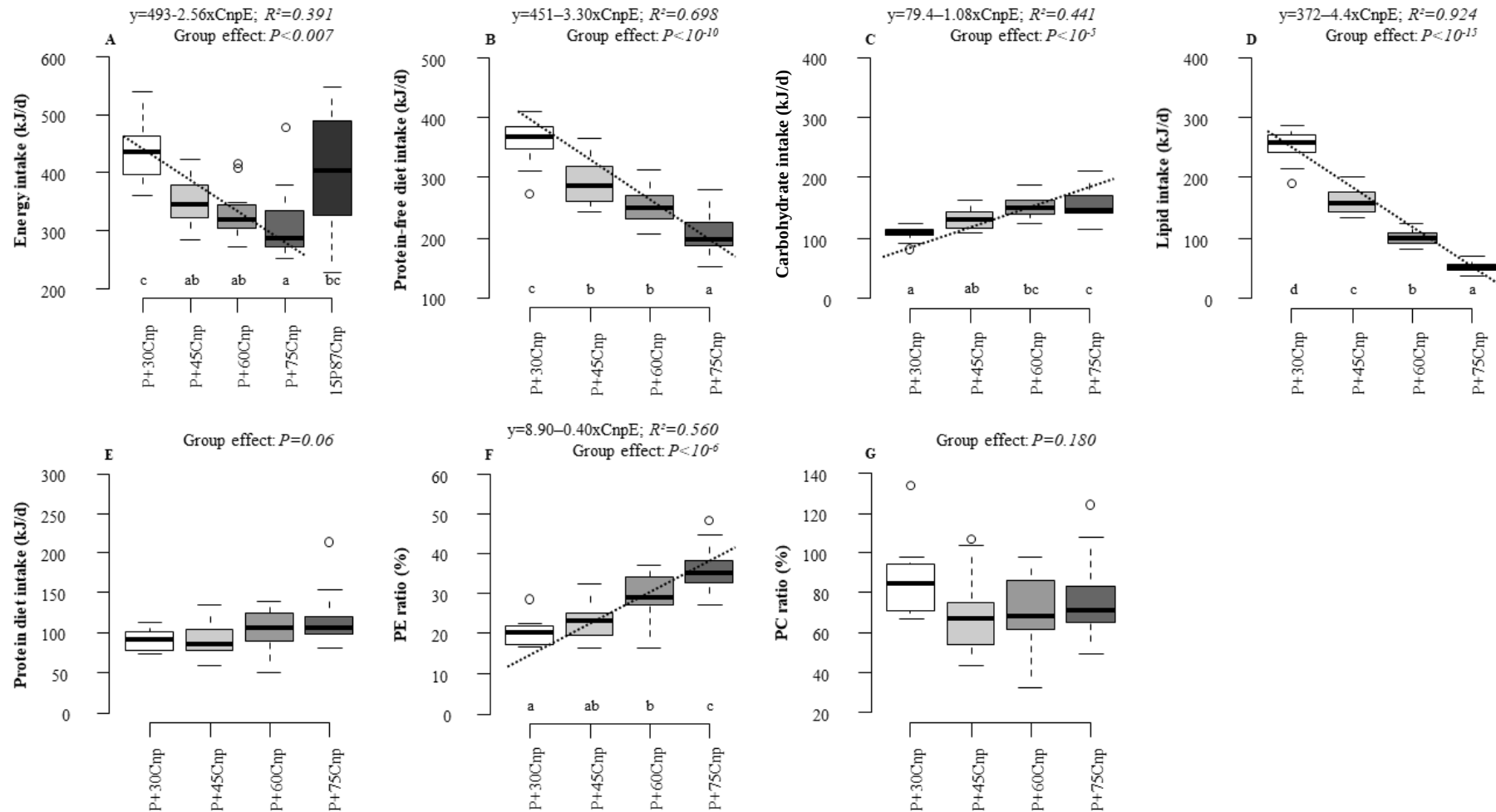
¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=6. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). LBM: Lean body mass.

	P-30Cnp (n=11)	P-45Cnp (n=11)	P-60Cnp (n=11)	P-75Cnp (n=11)	15P87Cnp control (n=14)	P ²
Initial body weight (g)	256 $\pm$ 3.85	267 $\pm$ 3.02	266 $\pm$ 4.38	259 $\pm$ 5.13	260 $\pm$ 3.24	0.251
Final body weight (g)	354 $\pm$ 5.95 ^{ab}	374 $\pm$ 4.37 ^a	366 $\pm$ 6.77 ^{ab}	353 $\pm$ 8.05 ^{ab}	345 $\pm$ 7.00 ^b	0.020
Daily BW gain in home cage (g/d)	4.64 $\pm$ 0.21 ^{ab}	5.11 $\pm$ 0.16 ^a	4.78 $\pm$ 0.18 ^{ab}	4.47 $\pm$ 0.21 ^{ab}	4.07 $\pm$ 0.22 ^b	0.007
Daily BW gain in calorimetry cage (g/d)	6.24 $\pm$ 0.85	5.04 $\pm$ 0.59	4.91 $\pm$ 0.96	4.45 $\pm$ 0.74	4.78 $\pm$ 0.63	0.568
LBM (g)	303 $\pm$ 6.29	319 $\pm$ 3.95	316 $\pm$ 6.27	305 $\pm$ 6.90	298 $\pm$ 5.06	0.056
Fat mass (g)	37.6 $\pm$ 1.76	41.1 $\pm$ 2.21	36.3 $\pm$ 2.23	34.7 $\pm$ 2.08	33.2 $\pm$ 2.71	0.146
Adiposity (%)	10.7 $\pm$ 0.006	11.0 $\pm$ 0.006	9.91 $\pm$ 0.006	9.82 $\pm$ 0.005	9.52 $\pm$ 0.006	0.350
Subcutaneous/Total fat ratio	0.403 $\pm$ 0.010	0.421 $\pm$ 0.006	0.406 $\pm$ 0.008	0.405 $\pm$ 0.013	0.415 $\pm$ 0.011	0.692

Energy and macronutrient intake

In the self-selecting rats, mean energy intake was significantly higher between the P-30Cnp group and the other groups (**Figure 1A**). Energy intake decreased progressively as the CnpE ratio increased. In the 15P87Cnp control group, mean energy intake was similar to that of the P-30Cnp group (**Figure 1A**). During the calorimetry recording, energy intake was not different between self-selecting groups and similar to those observed in the home cages (**Table 3**). However, the energy intake was lower for the 15P87Cnp control group than in the home cages (**Table 3**). It is therefore likely that the high energy intake measured in the home cages of the 15P87Cnp control group was the result of incomplete recovery

Figure 1. Total energy intake (kJ/d) (A), protein-free diet intake (kJ/d) (B), carbohydrate intake (kJ/d) from the protein-free diet (C), lipid intake (kJ/d) from the protein-free diet (D), protein diet intake (kJ/d) (E), PE ratio (%) (F) and PC ratio (%) (G) of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1, n=11-14). Intake measurements were adjusted to 300 g of AMM. All values, except total energy intake, were measured only in self-selected rats. The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc Bonferroni tests. Values that do not share the same letter are significantly different. Lines represent the correlation between the parameters and the CnpE ratio, only in self-selecting groups. AMM: Active metabolic mass.



from feed dispersion, which had a more crumbly consistency due to its low-fat content. We confirmed this hypothesis with subsequent food dispersion measurements (data not shown).

In self-selecting rats, the decrease in energy intake owing to the increase in the CnpE ratio resulted solely from a significant decrease in the protein-free diet intake (**Figure 1B**), inducing a significant increase in carbohydrate intake (**Figure 1C**) and a significant decrease in lipid intake (**Figure 1D**). All groups consumed equivalent protein amounts (**Figure 1E**). As a result, we observed that the PE ratio increased from 20% to 35% when the CnpE ratio increased from 30% to 75% (**Figure 1F**), whereas the PC ratio remained constant at 70% (**Figure 1G**).

Meal pattern

The number of meals was comparable from one group to another. In self-selecting rats, meal size decreased significantly as the CnpE ratio increased (**Table 3**). Interestingly, because the quantity in grams was similar between groups, the differences in meal size (0.170 kJ/d per unit of CnpE) closely matched the change in energy density of the protein-free diet (0.173 kJ/d per unit of CnpE), meaning that it was the quantity in grams rather than in kJ that remained constant. In all self-selecting rat groups, the number of meals consisting only of the protein diet or only of the protein-free diet was greater than the number of meals mixing the intake of protein and protein-free diets, meaning that the rats preferred to separate the protein intake from that of the carbohydrate/lipid mixture (**Table 3**). This phenomenon was more marked when the CnpE ratio was high. Within mixed meals, we did not observe any preference for starting or ending the meals with the protein rather than the protein-free diet (**Table 3**).

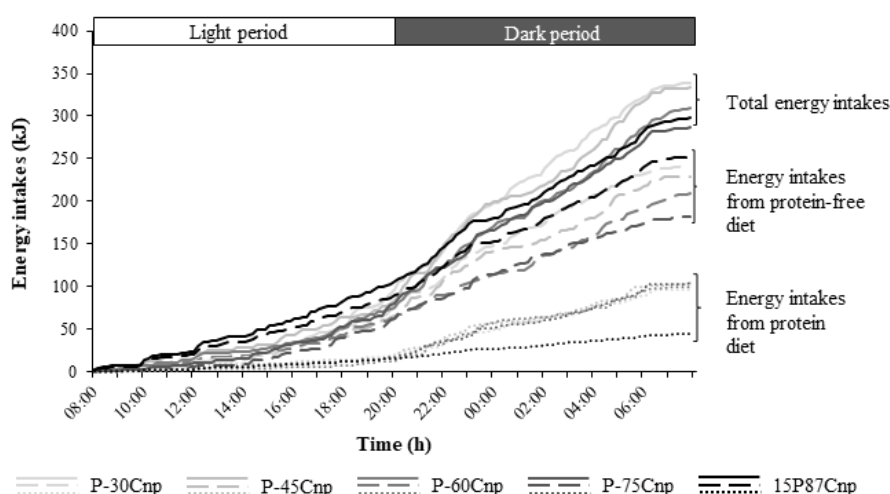
Table 3. Energy intakes and meal pattern recorded during calorimetry of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1)¹

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=11-14. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). ³ Meal composed of a mix of the diets. ⁴ Meal composed of one of the diets. AMM: Active metabolic mass.

	P-30Cnp (n=11)	P-45Cnp (n=11)	P-60Cnp (n=11)	P-75Cnp (n=11)	15P87Cnp control (n=14)	P ²
Energy intake adjusted to 300g AMM (kJ/d)	373 $\pm$ 21.2	356 $\pm$ 7.88	335 $\pm$ 10.9	324 $\pm$ 9.92	323 $\pm$ 19.6	0.282
Day energy intake	97.0 $\pm$ 14.7	83.9 $\pm$ 7.8	75.3 $\pm$ 17.3	79.6 $\pm$ 7.3	106 $\pm$ 14.8	0.450
Night energy intake	242 $\pm$ 12.1 ^{ab}	250 $\pm$ 12.7 ^b	234 $\pm$ 16.4 ^{ab}	207 $\pm$ 11.0 ^{ab}	192 $\pm$ 14.5 ^a	0.050
Meal size adjusted to 300g AMM (kJ)	28.2 $\pm$ 2.02 ^b	26.1 $\pm$ 2.29 ^b	20.8 $\pm$ 1.81 ^b	21.5 $\pm$ 1.66 ^b	23.2 $\pm$ 0.950 ^a	0.039
Meal number	13.4 $\pm$ 0.459	14.2 $\pm$ 0.926	16.3 $\pm$ 1.03	15.7 $\pm$ 1.57	14.2 $\pm$ 0.767	0.256
Day intake (%)	28.0 $\pm$ 3.68	25.3 $\pm$ 2.60	23.3 $\pm$ 4.65	27.8 $\pm$ 2.35	34.8 $\pm$ 3.31	0.160
Mixed meals (%)³	40.1 $\pm$ 5.79 ^b	27.8 $\pm$ 4.16 ^{ab}	19.3 $\pm$ 4.77 ^b	23.2 $\pm$ 3.12 ^{ab}	-	0.026
Mixed meals starting with the protein-free diet (%)	57.0 $\pm$ 8.55	41.8 $\pm$ 12.3	61.9 $\pm$ 14.1	70.6 $\pm$ 11.6	-	0.360
Single meals (%)⁴	59.9 $\pm$ 5.79 ^a	72.2 $\pm$ 4.16 ^{ab}	80.7 $\pm$ 4.77 ^b	76.8 $\pm$ 3.12 ^{ab}	-	0.026
Single protein meals	22.7 $\pm$ 3.69 ^a	38.1 $\pm$ 3.89 ^b	34.8 $\pm$ 3.38 ^{ab}	24.2 $\pm$ 3.29 ^{ab}	-	0.012
Single protein-free meals	37.1 $\pm$ 5.6 ^{ab}	34.1 $\pm$ 1.65 ^a	45.8 $\pm$ 5.79 ^{ab}	52.6 $\pm$ 2.76 ^b	-	0.020

Intake patterns of protein-free diets showed that the difference in the ingestion of protein-free diets developed during the dark period (**Figure 2**). In contrast, protein intake patterns were identical in all groups. Day energy intake in the 15P87Cnp control group tended to be higher than in the self-selecting rats until 16:00. Consequently, protein intake in this group (fed a diet that contained only 15% proteins) remained as high as in all self-selecting rats until this time of the day. Thereafter, the self-selecting rats started to increase their energy intake (**Figure 2**). During the dark period, the P-30Cnp and P-45Cnp fed rats tended to eat more than the 15P87Cnp control rats (**Figure 2**). In summary, meal pattern analysis showed that self-selecting rats exhibited a strikingly similar pattern of protein intake. It also revealed that the differences in energy intake developed during the dark period, primarily because of larger protein-free meals.

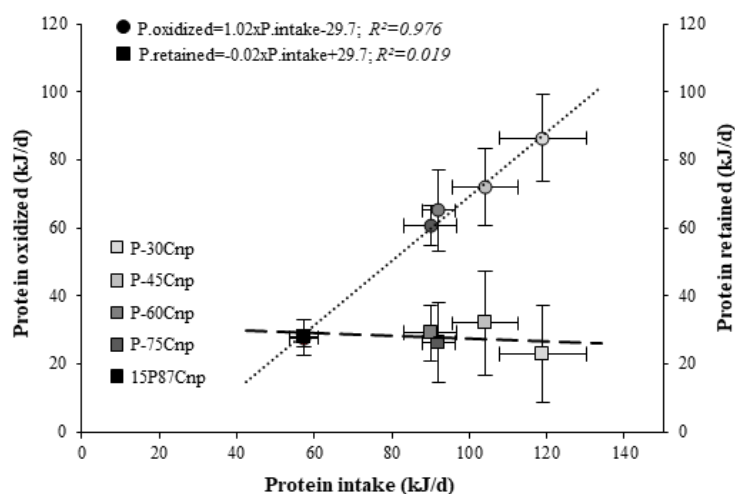
Figure 2. Meal pattern recorded in calorimetry cages of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1, n=11-14). Lines represent the energy intake recorded in the calorimetry cages: total (full lines), from protein-free diet (dashed lines) and from protein diet (dotted lines). In the control group (red), a single composite diet with the three macronutrients was given, but the intakes are separated in the graph so as to represent protein intake vs lipid and carbohydrate intake together. Values are mean per diet. SEM were not shown for sake of clarity.



Protein oxidation as a function of protein intake

Protein oxidation measured from 24-h urinary urea excretion increased as a linear function of protein intake ($R^2 = 0.976$) (**Figure 3**). In all groups, the proteins ingested above 29.7 kJ/d were catabolized, and accordingly, the protein retained in the body, calculated as the protein ingested minus the amount oxidized, was 29.7 kJ/d (corresponding to 1.8 g/d). This value was the same in all groups (**Figure 3**), which also explains the similarity in LBM at the end of the study (**Table 2**). The 15P87Cnp control and self-selecting rats aligned almost perfectly on the same regression line, demonstrating that the self-selection procedure, despite having induced a partial separation of protein and energy intake, had no influence on the metabolic fate of dietary proteins (**Figure 3**).

Figure 3. Protein retained (kJ/d) (right, squared) or oxidized (kJ/d) (left, round) according to protein intakes (kJ/d) of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1, n=11-14). Values are mean per diet $\pm$ SEM.



Components of energy expenditure and energy balance measured by indirect calorimetry

The level of spontaneous activity was 1.5 times higher in 15P87Cnp control than self-selecting rats ($P < 0.001$), mainly due to a doubling of the activity level during the light period (**Table 4**). The energy cost of activity was similar in all groups ($P = 0.919$), but EE-Act was significantly higher in the 15P87Cnp control group due to its higher activity level ($P < 0.001$), particularly during the light period. REE and TEE were similar between groups (**Table 4**) despite the higher level of spontaneous activity in the 15P87Cnp control group because activity amounted to only a small fraction of TEE. Energy balance, measured as the difference between energy intake and TEE, was positive (115 kJ/d equivalent to 3.2 g of fat) and similar in all groups (**Table 4**). This observation fits with the observation that at the end of the study, there were no significant differences regarding body composition. In accordance with these direct measurements of energy balance, we also observed that the differences between RQ and FQ were positive and similar in all groups (**Table 4**). These positive differences indicated that the proportion of fat oxidized to fuel TEE (reflected by RQ) was lower than the proportion of fat available in the diet (reflected by FQ).

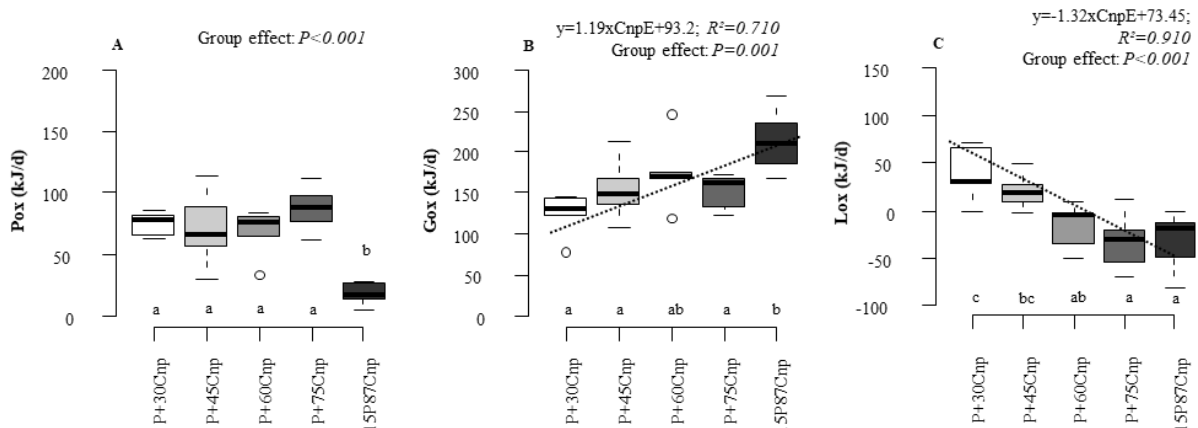
Pox was high and similar in all self-selecting rats and significantly lower in the 15P87Cnp control group (**Figure 4A**). Gox was larger in the 15P87Cnp fed rats than in the self-selecting ones, but a significant positive correlation between Gox and the dietary CnpE ratio was observed (**Figure 4B**). In contrast to Gox, a sharp decrease in Lox was observed in the self-selecting rats as the CnpE ratio increased from 30% to 75%. We also observed that Lox correlated tightly and negatively with the dietary CnpE ratio (**Figure 4C**).

Table 4. Spontaneous motor activity and components of energy expenditure and energy balance measured during calorimetry of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1)¹

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=11-14. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). AMM: Active metabolic mass; EE-Act: Energy expended in relation to activity; FQ: Food quotient; REE: Resting energy expenditure; RQ: Respiratory quotient; TEE: Total energy expenditure.

	P-30Cnp (n=11)	P-45Cnp (n=11)	P-60Cnp (n=11)	P-75Cnp (n=11)	15P87Cnp control (n=14)	P ²
Total activity adjusted to 300g AMM (Unit)	3.93 $\pm$ 0.277 ^a	4.31 $\pm$ 0.251 ^a	4.34 $\pm$ 0.373 ^a	3.97 $\pm$ 0.253 ^a	6.10 $\pm$ 0.208 ^b	< 0.001
Day activity	2.12 $\pm$ 0.172 ^a	2.31 $\pm$ 0.159 ^a	2.35 $\pm$ 0.243 ^a	2.24 $\pm$ 0.202 ^a	4.09 $\pm$ 0.200 ^b	< 0.001
Night activity	5.79 $\pm$ 0.403 ^a	6.37 $\pm$ 0.420 ^a	6.39 $\pm$ 0.575 ^{ab}	5.76 $\pm$ 0.339 ^a	8.16 $\pm$ 0.391 ^b	< 0.001
Day/Night activity ratio	0.367 $\pm$ 0.014 ^a	0.370 $\pm$ 0.030 ^a	0.371 $\pm$ 0.029 ^a	0.387 $\pm$ 0.023 ^{ab}	0.509 $\pm$ 0.034 ^b	< 0.001
Cost of activity (W/unit)	0.140 $\pm$ 0.015	0.123 $\pm$ 0.009	0.130 $\pm$ 0.016	0.133 $\pm$ 0.015	0.132 $\pm$ 0.010	0.919
EE-Act (Total activity * Cost) (kJ/d)	55.6 $\pm$ 3.28 ^{ab}	54.3 $\pm$ 2.07 ^{ab}	46.7 $\pm$ 3.04 ^a	54.5 $\pm$ 2.52 ^{ab}	66.3 $\pm$ 4.23 ^b	< 0.001
TEE adjusted to 300g AMM (kJ/d)	237 $\pm$ 12.2	241 $\pm$ 10.2	222 $\pm$ 10.7	208 $\pm$ 12.8	225 $\pm$ 8.13	0.232
REE (TEE – EE-Act) (kJ/d)	182 $\pm$ 10.4	187 $\pm$ 9.65	175 $\pm$ 8.97	154 $\pm$ 10.7	159 $\pm$ 6.47	0.060
Energy balance adjusted to 300g AMM (kJ/d)	134 $\pm$ 30.1	115 $\pm$ 12.5	113 $\pm$ 31.4	116 $\pm$ 18.7	97.9 $\pm$ 20.9	0.857
RQ-FQ	0.098 $\pm$ 0.010	0.088 $\pm$ 0.008	0.089 $\pm$ 0.022	0.096 $\pm$ 0.015	0.085 $\pm$ 0.013	0.950

Figure 4. Protein (Pox), lipid (Lox) and glucose (Gox) oxidations (in kJ) recorded during calorimetry of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1, n=11-14). The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc Bonferroni tests. Values that do not share the same letter are significantly different. Lines represent the correlation between the parameters and the CnpE ratio, only in self-selecting groups.



Plasma and liver parameters

All the plasma parameters related to glucose and lipid metabolism were similar between groups at the onset of the study (data not shown). At the end of the study, we observed significant differences in plasma glucose and no difference in HOMA-IR index, plasma insulin, glycerol, NEFAs, albumin, cholesterol, and HDL cholesterol (**Table 5**).

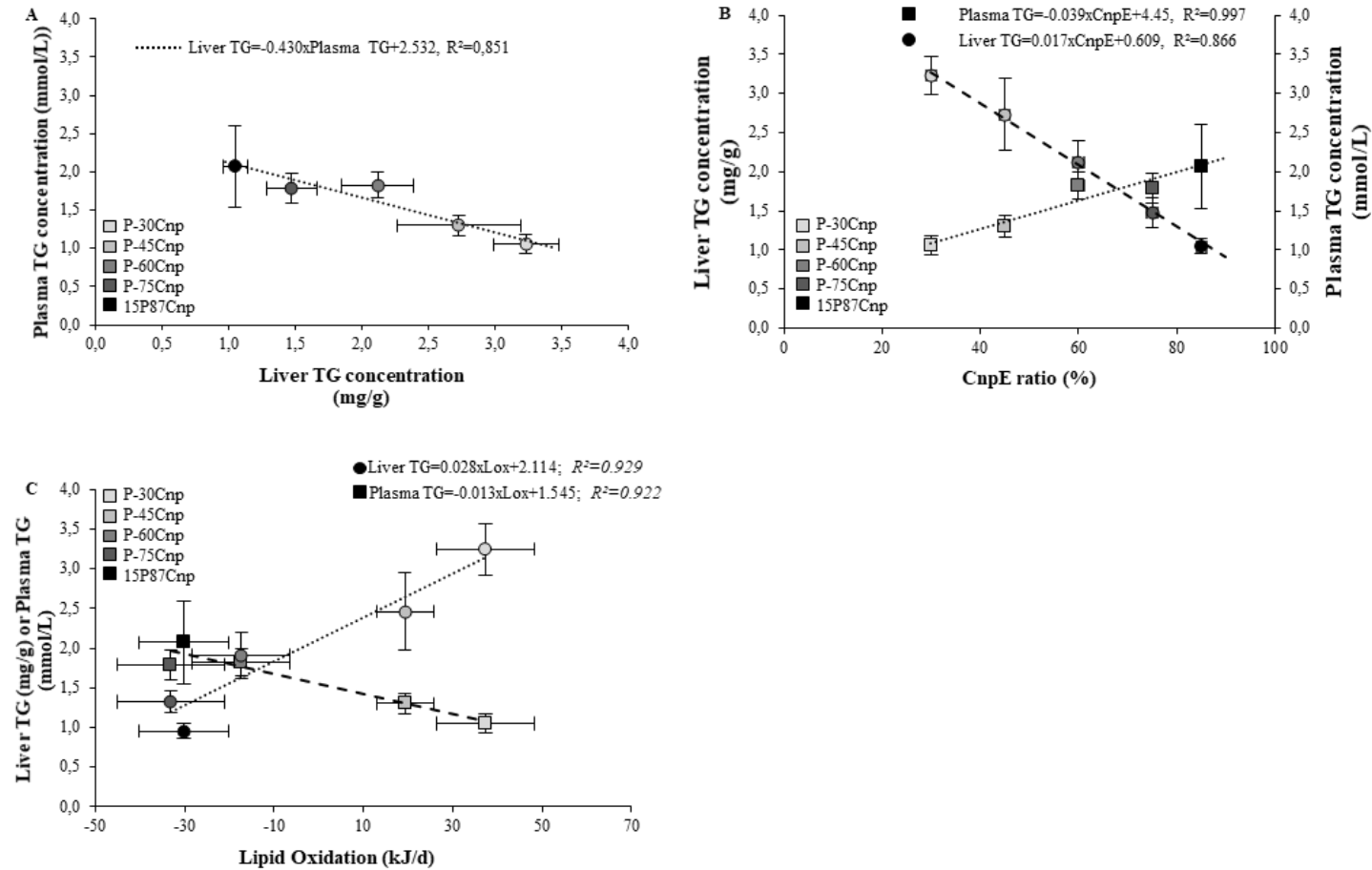
Table 5. Plasma and liver parameters of carbohydrate and lipid metabolisms of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1)¹

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=11-14. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). HOMA-IR: Homeostatic model assessment of insulin resistance; NEFA: Non-esterified fatty acids; TG: Triglycerides.

	P-30Cnp (n=11)	P-45Cnp (n=11)	P-60Cnp (n=11)	P-75Cnp (n=11)	15P87Cnp control (n=14)	P ²
Plasma						
Glucose (mmol/L)	6.46 $\pm$ 0.207	5.90 $\pm$ 0.192	5.83 $\pm$ 0.251	5.71 $\pm$ 0.177	6.37 $\pm$ 0.203	0.044
Insulin (pmol/L)	185 $\pm$ 8.57	172 $\pm$ 18.8	200 $\pm$ 33.4	168 $\pm$ 20.5	200 $\pm$ 21.7	0.752
HOMA-IR index	2.96 $\pm$ 0.193	2.48 $\pm$ 0.269	3.02 $\pm$ 0.581	2.34 $\pm$ 0.303	3.16 $\pm$ 0.342	0.419
Glycerol (μ mol/L)	211 $\pm$ 24.9	218 $\pm$ 54.0	187 $\pm$ 26.8	214 $\pm$ 41.6	167 $\pm$ 26.9	0.913
NEFA (mmol/L)	0.970 $\pm$ 0.096	0.909 $\pm$ 0.205	0.825 $\pm$ 0.112	1.038 $\pm$ 0.263	1.203 $\pm$ 0.518	0.868
Albumin (g/L)	40.8 $\pm$ 5.07	36.0 $\pm$ 0.608	36.1 $\pm$ 0.335	36.2 $\pm$ 0.423	55.3 $\pm$ 18.2	0.195
Cholesterol (mmol/L)	1.97 $\pm$ 0.199	2.37 $\pm$ 0.129	1.99 $\pm$ 0.098	2.00 $\pm$ 0.108	3.06 $\pm$ 0.964	0.165
HDL cholesterol (mmol/L)	1.40 $\pm$ 0.166	1.49 $\pm$ 0.070	1.18 $\pm$ 0.056	1.18 $\pm$ 0.084	1.69 $\pm$ 0.571	0.335
TG (mmol/L)	3.23 $\pm$ 0.254 ^a	2.73 $\pm$ 0.461 ^a	2.12 $\pm$ 0.270 ^{ab}	1.47 $\pm$ 0.188 ^b	1.04 $\pm$ 0.092 ^b	<0.001
Liver						
TG (mg/g)	1.05 $\pm$ 0.121	1.30 $\pm$ 0.132	1.82 $\pm$ 0.167	1.79 $\pm$ 0.191	2.07 $\pm$ 0.535	0.044

Liver and plasma TGs showed significant differences between groups (**Table 5**) and were correlated closely and negatively (**Figure 5A**). However, differences in liver TGs remained limited and did not induce steatosis as was visually observed at the time of dissection. Liver TGs correlated positively and plasma TGs correlated negatively with the CnpE ratio (**Figure 5B**; **Table 5**). Liver TGs also correlated with Lox measured during calorimetry, and the reverse was true for plasma TGs (**Figure 5C**). The 15P87Cnp control group was consistently on the same regression lines as the self-selecting rats, indicating that self-selection did not affect the metabolism of TGs. Taken together, these results show that plasma and liver TGs evolved in opposite directions and in close dependence on the rates of glucose and lipid oxidation.

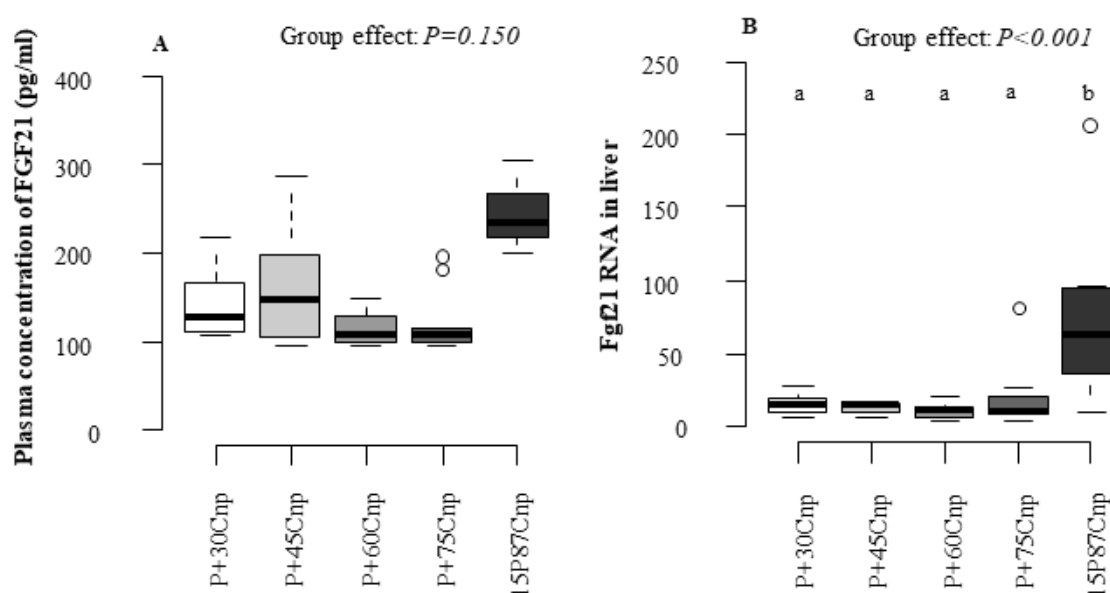
Figure 5. Plasma TG (mg/g) (right, round) and liver TG (mmol/L) (left, squared) of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1, n=11-14). Values are mean per diet $\pm$ SEM.



Plasma FGF21 and Fgf21 mRNA expression in liver

Plasma FGF21 concentrations were low and similar in all self-selecting groups (**Figure 6A**), indicating that they were insensitive to the CnpE ratio (30–75%) and to the high selected PE ratios (20–35%). Plasma FGF21 concentrations in the 15P87Cnp control group appeared slightly higher than in the self-selecting groups but not significantly ($P = 0.150$). Fgf21 mRNA expression in liver was correlated with plasma FGF21 concentrations ($R^2 = 0.71$) and was similar in all self-selecting groups (**Figure 6B**). Moreover, this expression was significantly higher in the 15P87Cnp control group ($P < 0.001$).

Figure 6. Plasma FGF21 (pg/mL) (A) and liver Fgf21 mRNA (B) of rats with a choice between a 100P diet and a protein-free diet (30Cnp, 45Cnp, 60Cnp or 75Cnp) or fed with the 15P87Cnp control diet for 3 wk (Experiment 1, $n=11-14$). The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc Bonferroni tests. Values that do not share the same letter are significantly different.



Experiment 2: Challenging protein selection by extending dietary choice to a composite diet

Body weight and body composition

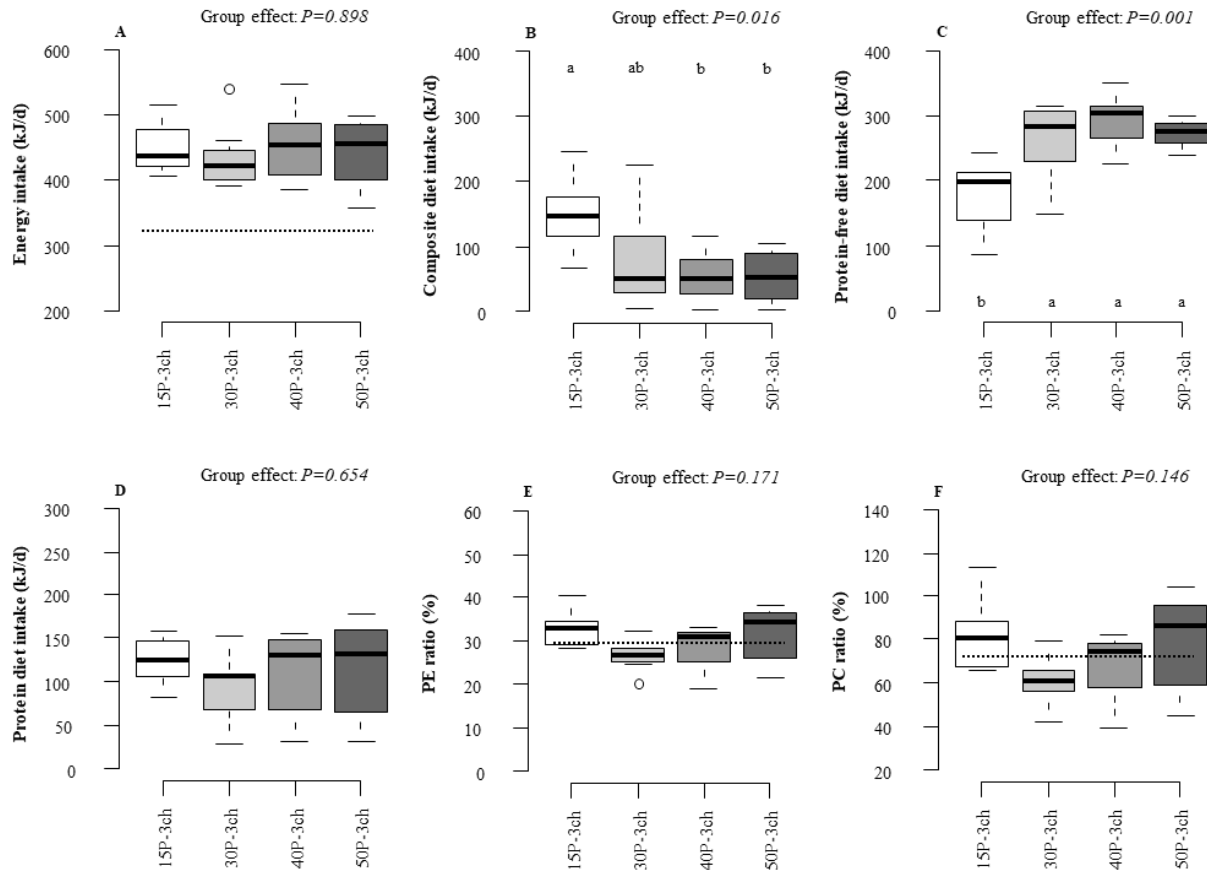
Final body weight, daily body weight gain, LBM, fat mass and adiposity were similar in all groups (**Supplementary table 4**). All values were close to those obtained in experiment 1 (**Table 2**).

Energy and macronutrient intake

Energy intake was similar regardless of the composite diet's protein content (**Figure 7A**). Ingestion of the composite diet amounted to ~50% of total energy intake in the 15P-3Ch group and ~20–25% in the 30P-3Ch, 40P-3Ch, and 50P-3Ch groups (**Figure 7B**). Energy intake from the protein-free diet was lower in the 15P-3Ch group (**Figure 7C**), but intake from the protein diet was identical in all groups (**Figure 7D**). Total carbohydrate and lipid intake remained constant because the amount ingested from

the protein-free diet decreased in exact proportion to the amount of the carbohydrates and lipids ingested from the composite diets (**Figure 7E**).

Figure 7. Total energy intakes (kJ/d) (A), composite diet intake (kJ/d) (B), protein-free diet intake (kJ/d) (C), protein diet intake (kJ/d) (D), PE ratio (%) (E) and PC ratio (%) (F) of rats with a choice between a 100P diet, a 60Cnp diet and a composite diet (15P60Cnp, 30P60Cnp, 40P60Cnp and 50P60Cnp) for 3 wk (Experiment 2, n=6). Intake measurements were adjusted to 300 g of AMM. Except for figure E, the diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc Bonferroni tests. Values that do not share the same letter are significantly different. Lines represent the mean value of the P-60Cnp group in experiment 1. AMM: Active metabolic mass.



As a result, despite large differences in the protein and carbohydrate contents of the composite diets, all groups continued to select PE (30%) and PC (70%) ratios (**Figure 7F** and **G**) identical to those measured in experiment 1 (**Figure 1F** and **G**). These results show that the PE and PC ratios established by the self-selecting rats were not the consequence of a poor regulation but were rather sought and defended when the self-selection conditions were changed. Furthermore, rats in the 30P-3Ch group, which had access to a composite diet with a PE ratio similar to that self-selected by rats in experiment 1, preferred to eat the protein and protein-free diets (75%) rather than the composite diet (25%), confirming that rats prefer to separate protein and energy intake (**Figure 7B, C, and D**).

Experiment 3: Influence of the self-selection process on energy balance

Body weight and body composition

Daily body weight gain, final body weight and LBM were not different between groups (**Table 6**). The rats fed the 30P diets had less fat mass and less adiposity, than those fed the composite diets with 15% proteins. There were no differences in the distribution of fat between subcutaneous and visceral pads.

Table 6. Body weight and body composition of rats fed with the 15P30Cnp, 15P60Cnp, 30P30Cnp and 30P60Cnp for 3 wk (Experiment 3)¹

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=6. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). LBM: Lean body mass.

	15P30Cnp (n=6)	15P60Cnp (n=6)	30P30Cnp (n=6)	30P60Cnp (n=6)	P ²		
					PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Initial body weight (g)	274 $\pm$ 8.55	271 $\pm$ 20.3	273 $\pm$ 8.31	266 $\pm$ 10.1	0.596	0.421	0.777
Final body weight (g)	365 $\pm$ 12.4	358 $\pm$ 26.2	356 $\pm$ 13.8	344 $\pm$ 17.5	0.184	0.273	0.730
Daily body weight gain (g/d)	4.53 $\pm$ 0.251	4.36 $\pm$ 0.169	4.18 $\pm$ 0.250	3.89 $\pm$ 0.209	0.092	0.331	0.790
LBM (g)	308 $\pm$ 17.1	306 $\pm$ 21.6	314 $\pm$ 14.1	300 $\pm$ 14.6	0.972	0.281	0.400
Fat mass (g)	43.1 $\pm$ 12.1 ^a	38.7 $\pm$ 7.72 ^a	29.2 $\pm$ 3.21 ^b	31.5 $\pm$ 4.34 ^b	0.004	0.719	0.319
Adiposity (%)	11.8 $\pm$ 3.17 ^a	10.8 $\pm$ 1.68 ^a	8.21 $\pm$ 1.04 ^b	9.12 $\pm$ 0.970 ^b	0.004	0.904	0.254
Subcutaneous/Total fat ratio	0.429 $\pm$ 0.029	0.448 $\pm$ 0.034	0.468 $\pm$ 0.041	0.452 $\pm$ 0.035	0.142	0.899	0.239

Energy intake

Mean energy intake of rats fed the composite diets with 15% proteins was higher than in those with 30% ($P < 0.001$). We observed a significant interaction between the PE and CnpE ratios ($P = 0.04$) because energy intake was significantly higher in the 15P30Cnp group than in the 15P60Cnp group but not in the 30P30Cnp group compared with the 30P60Cnp group (**Table 7**). The higher intake of rats fed the composite diets with 15% proteins was due to an increase in meal size without an increase in meal number (**Table 7**). These results show that the 30P diet prevented the increase in energy intake and adiposity in rats fed the low CnpE ratio (high fat).

Table 7. Energy intake and meal pattern recorded during calorimetry of rats fed with the 15P30Cnp, 15P60Cnp, 30P30Cnp and 30P60Cnp for 3 wk (Experiment 3)¹

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=11-14. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). AMM: Active metabolic mass.

	15P30Cnp (n=6)	15P60Cnp (n=6)	30P30Cnp (n=6)	30P60Cnp (n=6)	P ²		
					PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Energy Intake adjusted to 300g AMM (kJ/d)	367 $\pm$ 51.3 ^a	318 $\pm$ 13.3 ^{ab}	292 $\pm$ 20.1 ^b	298 $\pm$ 17.2 ^b	0.001	0.083	0.040
Meal size adjusted to 300g AMM (kJ)	28.7 $\pm$ 2.29 ^a	25.9 $\pm$ 2.10 ^a	22.0 $\pm$ 1.23 ^b	21.4 $\pm$ 2.19 ^b	0.011	0.392	0.571
Meal number	12.3 $\pm$ 0.973	11.8 $\pm$ 1.02	14.3 $\pm$ 0.459	12.8 $\pm$ 1.16	0.092	0.296	0.583

Plasma and liver parameters

There were no significant differences between groups at the onset of the study (data not shown). Final values of plasma glycerol, NEFAs, albumin, cholesterol, HDL cholesterol, plasma glucose, and insulin were not different. HOMA-IR indexes were significantly lower in rats fed the composite diets with 30% proteins than in those with 15% (**Table 8**). TG values in plasma and liver showed opposite changes to those observed in experiment 1 (**Table 8** compared with **Table 5**), as TG concentrations were higher in plasma and lower in liver when the CnpE ratio was high.

Table 8. Plasma and liver parameters of carbohydrate and lipid metabolisms of rats fed with the 15P30Cnp, 15P60Cnp, 30P30Cnp and 30P60Cnp for 3 wk (Experiment 3)¹

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=11-14.

² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). HOMA-IR: Homeostatic model assessment of insulin resistance; NEFA: Non-esterified fatty acids; TG: Triglycerides.

	15P30Cnp (n=6)	15P60Cnp (n=6)	30P30Cnp (n=6)	30P60Cnp (n=6)	<i>P</i> ²		
					PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Plasma							
Glucose (mmol/L)	6.88±0.286	6.85±0.414	6.39±0.246	6.41±0.139	0.137	0.933	0.968
Insulin (pmol/L)	180±26.6	163±20.2	110±17.9	150±23.7	0.066	0.613	0.216
HOMA-IR index	3.05±0.492a	2.91±0.548a	1.76±0.321b	2.37±0.360b	0.045	0.602	0.407
Glycerol (μmol/L)	158±14.6	201±39.7	127±9.70	161±20.3	0.121	0.105	0.844
NEFA (mmol/L)	0.660±0.063	0.710±0.142	0.560±0.092	0.700±0.107	0.519	0.381	0.666
Albumin (g/L)	36.5±0.480	35.6±0.206	35.1±0.574	36.3±0.798	0.380	0.857	0.074
Cholesterol (mmol/L)	2.11±0.129	2.21±0.107	2.04±0.142	2.49±0.248	0.687	0.103	0.278
HDL cholesterol (mmol/L)	1.40±0.079	1.32±0.039	1.36±0.094	1.51±0.127	0.534	0.765	0.223
TG (mmol/L)	1.08±0.146 ^a	1.57±0.310 ^b	0.797±0.086 ^a	1.63±0.285 ^b	0.404	0.006	0.418
Liver							
TG (mg/g)	3.05±0.0.186 ^a	1.97±0.231 ^b	2.51±0.294 ^a	2.30±0.366 ^b	0.732	0.023	0.125

Plasma FGF21 and Fgf21 mRNA expression in liver

Plasma FGF21 concentrations tended to be higher in rats fed the composite diets with 15% proteins than in those with 30% ($P = 0.048$) and were not affected by the CnpE ratio ($P = 0.513$) (**Figure 8A**). Fgf21 mRNA expression in liver was low, poorly correlated with plasma FGF21 concentrations ($R^2 = 0.35$), and similar in all groups (**Figure 8B**).

By associating these results with those of experiment 1 (**Figure 9A**), it resulted that rats fed the composite diets with 15% proteins had higher plasma FGF21 concentrations than rats fed with 30% proteins and self-selecting rats (**Figure 8A**) and that plasma FGF21 concentrations were highly correlated with protein intake (**Figure 9B**). These results suggest that there is a threshold PE ratio, ~15%, below which there is a stimulation of FGF21 production.

Figure 8. Plasma fibroblast growth factor 21 (FGF21) (pg/mL) (A) and liver Fgf21 mRNA (B) of rats fed with the 15P30Cnp, 15P60Cnp, 30P30Cnp, and 30P60Cnp for 3 wk (experiment 3, n = 6). The diet effects were tested by 2-factor ANOVA ($P \leq 0.05$) and post hoc Bonferroni tests. Values that do not share the same letter are significantly different.

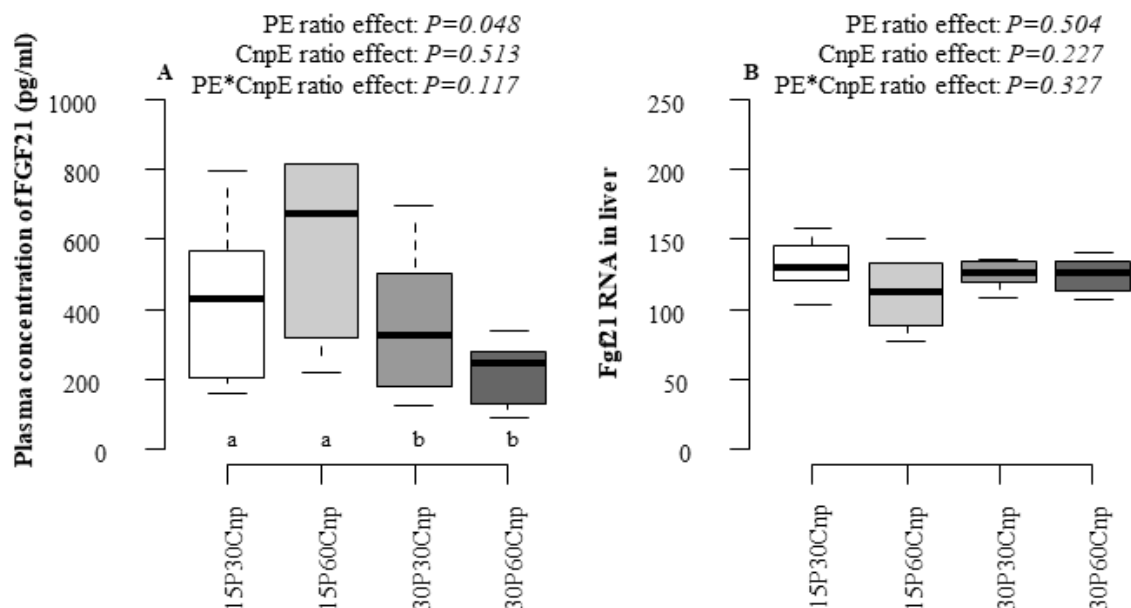
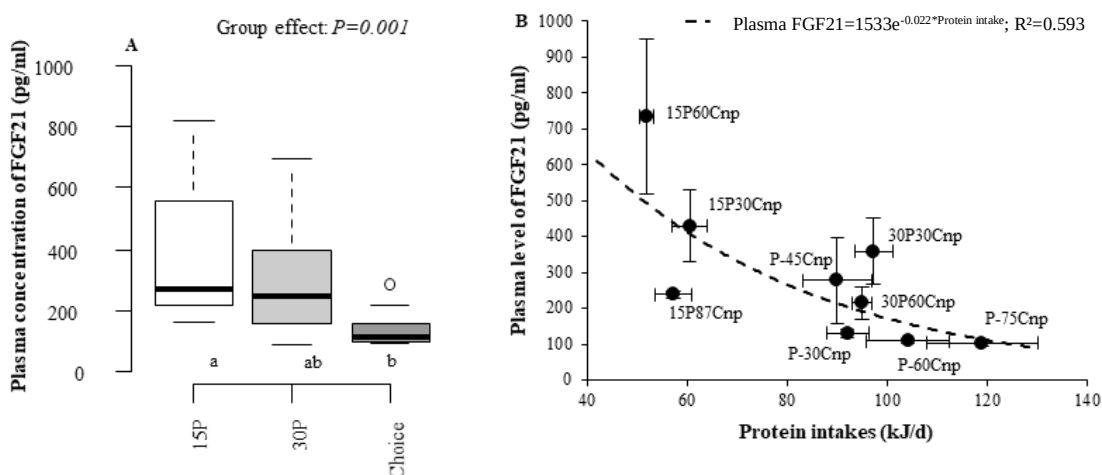


Figure 9. Comparison of plasma FGF21 between experiment 1 and 3. (A) Plasma FGF21 levels (pg/mL) in experiment 1 and 3. All self-selecting rats were grouped in the group “choice” (P-30Cnp, P-45Cnp, P-60Cnp and P-75Cnp, n=44). All rats fed 15% proteins were grouped in the group 15P (15P87Cnp, 15P30Cnp and 15P60Cnp, n=26) and the same for rats fed 30% proteins (30P30Cnp and 30P60Cnp, n=12). The diet effect was tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc Bonferroni tests. Values that do not share the same letter are significantly different. (B) Correlation between plasma FGF21 level (pg/mL) and protein intake (kJ/d) for each diet group in experiment 1 and 3. Values are mean per diet $\pm$ SEM (n=6-14).



Discussion

This study illustrates that self-selecting rats ingested significantly more proteins (~30% of energy) than the level considered sufficient to achieve nitrogen balance (~5%) or maintenance (10-15%) in adult rats (National Research Council 1995). The selected protein-to-energy (PE) ratios were not constant but rather increased from 20 to 35% when the carbohydrate-to-non-protein-energy (CnpE) ratio in the protein-free diets increased from 30 to 75%. This maintained a constant protein-to-carbohydrate (PC) ratio of 70% and suggests that self-selecting rats were regulating the PC ratio rather than the PE ratio. We also observed that increasing the PE ratio from 15 to 30% prevented an increase in energy intake and adiposity induced by a high-fat diet. Finally, we observed that plasma FGF21 levels were very low in all self-selecting rats and in those fed the 30% protein diets but tended to be higher in rats fed 15% proteins suggesting a slight protein deficiency signal in these rats.

High protein-to-energy ratio chosen to maintain a stable and high protein-to-carbohydrate ratio

Self-selecting rats in experiment 1 established high PE ratios, as has been previously observed in self-selection studies (Even, Gehring, et Tomé 2021; Musten, Peace, et Anderson 1974; Castonguay et al. 1982; Peters et Harper 1984; Mullen et Martin 1992; Jean et al. 2002; Makarios-Lahham et al. 2004). Several authors have suggested that these high PE ratios are indicative of poor control of protein intake, limited at keeping protein ingestion above levels required to secure nitrogen balance, and below levels that could impose costly, and possibly harmful metabolic adaptations (Booth 1985). Therefore, to test whether in this study the selected PE ratios were the result of precise control of protein intake, we attempted to disturb the PE ratio established under the two-choice condition by providing access to a third composite diet in which the PE ratio ranged from 15 to 50% (experiment 2). This experiment demonstrated that rats corrected the disturbance in protein/non-protein intake induced by consumption of the composite diets by appropriately adjusting their consumption of the protein-free diet. They therefore continued to select PE and PC ratios identical to those established under the two-choice conditions (experiment 1). It is also worth noting that they preferred to eat from the protein and protein-free diets rather than from the composite diets. In our opinion, the low inter-individual variability of the selected PE ratio, and the resistance to changes in self-selection conditions, strongly suggest that the PE ratios established in this study were sought and defended.

The evolution of the PE ratios as a function of the CnpE ratio of the protein-free diets led to the maintenance of a constant PC ratio of 70%. This value is much higher than the PC ratio of 20% prevailing in the 15P87Cnp control diet, formulated according to the AIN-93 (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). The apparent regulation of a PC ratio in the range of 60-80% has been previously observed in several studies, including some from our group (Richter, Holt, et Barelare 1938; Azzout-Marniche et al. 2016; Chee, Romsos, et Bergen 1981; Romsos et Ferguson 1982). Various authors have suggested that

the finality of the regulation of a stable PC ratio would be to maintain a stable ratio of tryptophan to large neutral amino-acids in the plasma, as well as stable brain serotonin levels (Theall, Wurtman, et Wurtman 1984; Fernstrom et Wurtman 1997; Wurtman et Fernstrom 1975). However, no studies reported significant correlations between protein intake and brain levels of serotonin or 5-Hydroxyindoleacetic acid (Ashley, Coscina, et Anderson 1979; Thibault et al. 1999; Yokogoshi, Theall, et Wurtman 1986).

The PE ratio established by self-selecting rats can vary quite widely from one study to another, which has also been an argument for the fact that protein intake is poorly regulated. However, our opinion, based on the analysis of numerous self-selection studies (Even, Gehring, et Tomé 2021), is that the selected PE ratio is finely tuned by changes in metabolic and environmental parameters (Richter et Barelare 1938; Leshner, Siegel, et Collier 1971; Cohen et Woodside 1989; Leshner, Collier, et Squibb 1971), among which are the quality of the proteins (Musten, Peace, et Anderson 1974; Kishi et al. 1982; Pol et den Hartog 1966), carbohydrates and lipids used. Accordingly, in our laboratory, in two experiments performed 12 years apart (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016) and again in the present study, we have observed that male adult Wistar rats select high but variable PE ratios (20-40%) and a constant PC ratio (70%). All studies used the same whole milk protein, the same mix of sucrose and corn starch, and the same lipid source (and the same vitamin and mineral mix).

Role of FGF21 in protein self-selection

To our knowledge, this is the first study in which FGF21 levels in plasma were measured in rats under conditions of dietary protein self-selection. A remarkable result was that plasma FGF21 levels in self-selecting rats were not only very low but also much less variable than those observed in rats fed the composite diets. Another interesting point is that these very low and reproducible FGF21 levels in plasma were established with PE ratios that varied quite widely with the CnpE ratio of the protein-free diets. These results strongly suggest that (i) when rats have the opportunity to fine-tune protein intake independently from energy intake, they adjust the PE intake ratios in order to minimize plasma FGF21 levels, and (ii) the dietary PE ratio required to prevent an increase in plasma FGF21 levels is higher when carbohydrate intake is high. According to the literature, which largely describes FGF21 as a signal of metabolic stress, particularly in response to a deficit in protein intake, we assumed that minimization of plasma FGF21 values would be observed in rats that had the ability to control protein intake independently of energy intake (Hill et al. 2018; 2019; Laeger et al. 2014, 21; Chaumontet et al. 2019). In retrospect, we believe that we should have introduced a groups of rats that had to select between a protein and a protein-free diet in which the CnpE ratio was 87%, because it is the CnpE ratio that prevailed in the 15P87Cnp control diet, prepared according to the AIN-93 requirements for rats (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). According to the evolution of the selected PE ratios with the dietary CnpE ratios, this group would have selected a PE ratio above 40% and also continued to maintain low FGF21

levels. We nevertheless have half of the answer, because using the same macronutrient sources, such a group was studied in 2004 in our laboratory; they indeed established a PE intake ratio above 45% (Makarios-Lahham et al. 2004), but no measurements of plasma FGF21 levels were performed in these rats. Therefore, it appears that plasma FGF21 levels are controlled by the absolute protein intake, on the one hand, and by the PC ratio on the other. It is well-documented that protein deficiency can induce increases in plasma FGF21 levels by several orders of magnitude greater than those observed in this study (Tomé et al. 2020; 2019), and that the dietary PE ratio is most probably the main parameter responsible for these increases. However, the results of this study rather suggest that, in a context of adequate protein intake, FGF21 levels would instead reflect the adequacy of the dietary PC ratio and would modulate the control of protein and carbohydrate intake towards an optimal target. In this study and in previous ones (Chee, Romsos, et Bergen 1981; Pol et den Hartog 1966), including those from our lab (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016), the optimal target for PC ratio appears to be in the range of 60-80%. This value is impressively higher than the 20% that prevails in the AIN-93 formulation for adult rats (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). Therefore, the higher FGF21 levels measured in rats fed composite diets with 15% proteins may well reflect that in these diets the PC ratios (respectively 20% and 50%), rather than protein intakes, were below the target.

In conclusion, we suggest the hypothesis that in rats fed adequate protein levels, plasma FGF21 may signal the adequacy of the protein-to-carbohydrate intake ratio. Thus when rats are in free-feeding conditions and can separate control of protein and energy intake, they respond to FGF21 signaling by adjusting protein intake according to the carbohydrate content of the protein-free diets and regulate a protein-to-carbohydrate intake ratio of 70%.

Potential beneficial metabolic effects of high protein-to-energy and protein-to-carbohydrate ratios

Once ingested, protein meets the needs for protein and amino acid renewal and synthesis of the body's main compounds, and the excess amino acid intake is used as an energy substrate. This contribution to energy metabolism, along with carbohydrates and lipids, helps to control energy intake and appears to be responsible for favorable metabolic effects¹. In addition, the establishment of a high PC ratio, in conjunction with the high PE ratio, also appears to result in metabolic benefits (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Larue-Achagiotis et al. 1992; Rieth et Larue-Achagiotis 1997).

In this study, we observed that large changes in protein intake between groups did not result in differences in LBM. Indeed, urinary excretion of urea showed that all proteins ingested above 30 kJ/d were catabolized. This result is in accordance with many previous studies, reporting that increasing protein intake does not increase LBM. The explanation, as we have demonstrated in our laboratory, is that when dietary protein content is increased, metabolic pathways involved in protein and amino acid catabolism are rapidly stimulated. This occurs in the liver, in particular. These pathways are able to adjust to a dietary protein content of up to 50% and more (L'Heureux-Bouron et al. 2004) within one to

two days (Jean et al. 2001). In contrast, we observed that when dietary protein intake was increased from 15 to 30%, it protected against hyperphagia and fat mass gain induced by a high-fat and high-carbohydrate diets. Given that high carbohydrate intake stimulates and high protein intake down regulates lipogenesis (Pichon et al. 2006; Stepien et al. 2011), one hypothesis for this protective effect is that in high-protein diets, the PC ratio is increased, and therefore energy metabolism and the hormonal response to meal ingestion is modified, with for instance more glucagon and a higher glucagon to insulin ratio, a lower increase in blood glucose, and a smaller inhibition of lipid oxidation in response to feeding (Jean et al. 2002; Rieth et Larue-Achagiotis 1997; Devkota et Layman 2011; Chaumontet, Even, et al. 2015; Acheson et al. 2011).

Accordingly, in this study, we observed that the HOMA-IR indexes of rats fed 30% protein was lower than in those fed 15%. One reason that many studies have shown that self-selecting rats ingest large amounts of protein may be related to the observation that in the long-term, high protein intake can protect from detrimental effects of diets high in carbohydrates and lipids. The corollary of this hypothesis is that if the glycemic index of carbohydrates is low, less proteins would be needed to prevent the deleterious effects of carbohydrates. In the framework of the “protein leverage” hypothesis (Simpson et Raubenheimer 2005), it has been suggested that a low protein intake may be responsible for the increased obesity prevalence in modern societies. However, the authors of this hypothesis have recently reanalyzed the literature and observed that leanness is preserved with low-protein, high-carbohydrate diets, if the carbohydrate source is mainly from vegetables and fruits that are rich in fiber and therefore have a low glycemic index. This analysis is consistent with the fact that in our study, we observed that self-selecting rats that had access to a fat-enriched protein-free diet spontaneously selected a lower PE ratio than those rats that had access to a protein-free, high-carbohydrate diet. However, it remains to be demonstrated that it is the glycemic index, and not the high lipid content per se, that was responsible for the decrease in protein intake. The high protein intake of self-selecting rats observed in many studies could therefore be related to the high glycemic index of carbohydrate sources (glucose, sucrose and corn starch) because protein would in particular reduce the post-meal increase in blood glucose levels and maintain a higher lipid oxidation rate. It can therefore be hypothesized that the target PE and PC ratios may be lower when the glycemic index of the carbohydrate source is low.

The fact that high protein diets may improve the metabolic responses to meal intake may however be challenged by the fact that various studies reported a stimulating effect of protein on the insulin response to carbohydrates. However, in most cases, this response was observed when the protein was added to, not exchanged with carbohydrate (Pallotta et Kennedy 1968; Rabinowitz et al. 1966; Frank Q Nuttall et Billington 1984; F. Q. Nuttall et Gannon 1991). In conditions when protein is exchanged with carbohydrate, for instance when the insulin response to a high-protein vs high-carbohydrate meal is measured, the insulin response is comparable or lower with the high-protein meal (Chaumontet, Even, et al. 2015; Acheson et al. 2011; Frank Q Nuttall et Billington 1984; Robinson et al. 1990), and in all

these studies, the increase in blood glucose level was of lower amplitude after protein containing meals suggesting that glucose clearance from the blood and glucose use by peripheral tissues was improved. Acheson et al. in 2011 also showed that high protein meals induced a large increase in energy expenditure and a lower decrease in lipid oxidation than an isoenergetic carbohydrate meal (Acheson et al. 2011). The effects of high-protein diets on metabolic health thus remain much debated and we suggest reading the review by Ranawan et al.⁶⁴ for a better understanding of the role of protein on insulin secretion and glycemic control. In our studies, the willingness of self-selecting rats to ingest large amounts of protein, and the results accumulated in our laboratory on protein-rich diets over the last 20 years, lead us to consider that appetite for protein is probably backed by positive metabolic effects (Tomé et al. 2020).

Role played by the self-selection process itself

The role played by self-selection itself may deserve future studies. We could not clearly discern significant effects of the self-selection process on its own in this study. Nevertheless, in addition to offering the possibility to finely tune the PE and PC ratios, self-selection offers the possibility to precisely select protein intake at a time when it is the most required. For instance, several studies reported that protein intake occurs preferentially during the day, while carbohydrate and lipid intake are preferably ingested at night (Makarios-Lahham et al. 2004), (Larue-Achagiotis et al. 1992; Tempel et al. 1989; Miller et al. 1994). The other point may be that within each meal, rats have the possibility to mix or separate ingestion of protein and ingestion of carbohydrates and lipids. We (Jean et al. 2002; Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016) and others (Miller et al. 1994; Konkle et al. 2003) have already reported that rats separate protein and carbohydrate intake more readily than protein and lipid intake. In this study, we again found that the proportion of mixed meals (simultaneous ingestion of protein and protein-free diets) was lowest (23%) in rats fed the high-carbohydrate protein-free diet, and gradually increased, but remained in the minority (40%), in those fed the high-fat protein-free diet. This strategy may reflect the fact that separating protein and carbohydrate intakes would improve the metabolic response to a meal, a hypothesis supported by evidence that whey protein consumed before a high-carbohydrate meal reduced food intake and induced a dose-dependent decrease in blood glucose and insulin levels (Akhavan et al. 2010).

The self-selection process allows for ordering ingestion of the macronutrients during a meal and adjusting the intake level of the macronutrients to changes in metabolic needs throughout the day-night cycle. The potential beneficial effects that can be achieved remain largely unexplored.

Conclusion

Altogether, these results indicate that optimal protein intake is above the levels needed for nitrogen balance and fluctuates with dietary carbohydrates to maintain a stable protein-to-carbohydrate ratio. The low plasma levels of FGF21 in self-selecting rats, compared to rats fed a composite diet with 15% of total energy intake as protein, suggest that they consumed sufficient protein. FGF21 likely plays a role in directing dietary choices toward protein to maintain a high protein-to-carbohydrate ratio and reduce the dependence of energy metabolism on insulin.

Acknowledgments

The authors thank Morgane Dufay for her precious help in the maintenance of rats during the study.

References

- Acheson, K. J., A. Blondel-Lubrano, S. Oguey-Araymon, M. Beaumont, S. Emady-Azar, C. Ammon-Zufferey, I. Monnard, S. Pinaud, C. Nielsen-Moennoz, et L. Bovetto. 2011. « Protein Choices Targeting Thermogenesis and Metabolism ». *American Journal of Clinical Nutrition* 93 (3): 525-34. <https://doi.org/10/bpv8mj>.
- Akhavan, Tina, Bohdan L. Luhovyy, Peter H. Brown, Clara E. Cho, et G. Harvey Anderson. 2010. « Effect of Premeal Consumption of Whey Protein and Its Hydrolysate on Food Intake and Postmeal Glycemia and Insulin Responses in Young Adults ». *American Journal of Clinical Nutrition* 91 (4): 966-75. <https://doi.org/10/c4nw2t>.
- Arakawa, Mie, Takayuki Masaki, Junko Nishimura, Masataka Seike, et Hironobu Yoshimatsu. 2011. « The Effects of Branched-Chain Amino Acid Granules on the Accumulation of Tissue Triglycerides and Uncoupling Proteins in Diet-Induced Obese Mice ». *Endocrine Journal* 58 (3): 161-70. <https://doi.org/10/fdzk9d>.
- Arch, J. R. S., D. Hislop, S. J. Y. Wang, et J. R. Speakman. 2006. « Some Mathematical and Technical Issues in the Measurement and Interpretation of Open-Circuit Indirect Calorimetry in Small Animals ». *International Journal of Obesity* 30 (9): 1322-31. <https://doi.org/10/ddk58p>.
- Ashley, David V. M., et G. Harvey Anderson. 1975. « Food Intake Regulation in the Weanling Rat: Effects of the Most Limiting Essential Amino Acids of Gluten, Casein, and Zein on the Self-Selection of Protein and Energy ». *Journal of Nutrition* 105 (11): 1405-11. <https://doi.org/10/gf9zx7>.
- Ashley, David V.M. 1985. « Factors Affecting the Selection of Protein and Carbohydrate from a Dietary Choice ». *Nutrition Research* 5 (5): 555-71. <https://doi.org/10/bp42xc>.
- Ashley, David V.M., Donald V Coscina, et G Harvey Anderson. 1979. « Selective Decrease in Protein Intake Following Brain Serotonin Depletion ». *Life Sciences* 24(11) (973-84): 12. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90315-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90315-1).
- Azzout-Marniche, Dalila, Tristan Chalvon-Demersay, Grégory Pimentel, Catherine Chaumontet, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2016. « Obesity-Prone High-Fat-Fed Rats Reduce Caloric Intake and Adiposity and Gain More Fat-Free Mass When Allowed to Self-Select Protein from Carbohydrate:Fat Intake ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310 (11): R1169-76. <https://doi.org/10/gf9zzv>.
- Azzout-Marniche, Dalila, Catherine Chaumontet, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2014. « Food Intake and Energy Expenditure Are Increased in High-Fat-Sensitive but Not in High-Carbohydrate-Sensitive Obesity-Prone Rats ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (3): R299-309. <https://doi.org/10/f6d2qr>.
- Booth, D. A. 1985. « Food-Conditioned Eating Preferences and Aversions with Interoceptive Elements: Conditioned Appetites and Satiety ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 443 (1 Experimental): 22-41. <https://doi.org/10/b5m8sw>.
- Booth, D.A. 1974. « Food Intake Compensation for Increase or Decrease in the Protein Content of the Diet ». *Behavioral Biology* 12 (1): 31-40. <https://doi.org/10/dz99rq>.

- Castonguay, Thomas W., Wilburta J. Hartman, Elizabeth A. Fitzpatrick, et Judith S. Stern. 1982. « Dietary Self-Selection and the Zucker Rat ». *The Journal of Nutrition* 112 (4): 796-800. <https://doi.org/10.1093/jn/112.4.796>.
- Chaumontet, Catherine, Dalila Azzout-Marniche, Anne Blais, Tristan Chalvon-Dermersay, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2015. « Rats Prone to Obesity Under a High-Carbohydrate Diet have Increased Post-Meal CCK mRNA Expression and Characteristics of Rats Fed a High-Glycemic Index Diet ». *Frontiers in Nutrition* 2. <https://doi.org/10/gg33z2>.
- Chaumontet, Catherine, Dalila Azzout-Marniche, Anne Blais, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2019. « Low-Protein and Methionine, High-Starch Diets Increase Energy Intake and Expenditure, Increase FGF21, Decrease IGF-1, and Have Little Effect on Adiposity in Mice ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 316 (5): R486-501. <https://doi.org/10/gfzg3m>.
- Chaumontet, Catherine, Patrick C. Even, Jessica Schwarz, Angélique Simonin-Foucault, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Dalila Azzout-Marniche, et Daniel Tomé. 2015. « High Dietary Protein Decreases Fat Deposition Induced by High-Fat and High-Sucrose Diet in Rats ». *British Journal of Nutrition* 114 (8): 1132-42. <https://doi.org/10/f7vfp4>.
- Chee, Kew M., Dale R. Romsos, et Werner G. Bergen. 1981. « Effect of Dietary Fat on Protein Intake Regulation in Young Obese and Lean Mice ». *Journal of Nutrition* 111 (4): 668-77. <https://doi.org/10/gf9zx8>.
- Cohen, Leslie R., et Barbara C. Woodside. 1989. « Self-Selection of Protein during Pregnancy and Lactation in Rats ». *Appetite* 12 (2): 119-36. <https://doi.org/10/dk2sng>.
- Collier, George, Alan I. Leshner, et Robert L. Squibb. 1969a. « Dietary Self-Selection in Active and Non-Active Rats ». *Physiology & Behavior* 4 (1): 79-82. <https://doi.org/10/c2q33b>.
- . 1969b. « Self-Selection of Natural and Purified Dietary Protein ». *Physiology & Behavior* 4 (1): 83-86. <https://doi.org/10/cq7fdw>.
- Devkota, Suzanne, et Donald K. Layman. 2011. « Increased ratio of dietary carbohydrate to protein shifts the focus of metabolic signaling from skeletal muscle to adipose ». *Nutrition & Metabolism* 8 (1): 13. <https://doi.org/10/dd332m>.
- Donhoffer, Sz., et J. Vonotzky. 1947. « The Effect of Environmental Temperature on Food Selection ». *American Journal of Physiology* 150 (2): 329-33. <https://doi.org/10/ggsgzn>.
- Even, Patrick C., Joséphine Gehring, et Daniel Tomé. 2021. « What Does Self-Selection of Dietary Proteins in Rats Tell Us about Protein Requirements and Body Weight Control? » *Obesity Reviews*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/obr.13194>.
- Even, Patrick C., et Nachiket A. Nadkarni. 2012. « Indirect Calorimetry in Laboratory Mice and Rats: Principles, Practical Considerations, Interpretation and Perspectives ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303 (5): R459-476. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00137.2012>.
- FAO/WHO/UNU Expert Consultation. 1985. « Energy and Protein Requirements ». *World Health Organization Technical Report* 724. Geneva, Switzerland: World Health Organization. <http://www.fao.org/3/aa040e/aa040e00.htm>.
- Fernstrom, J. D., et R. J. Wurtman. 1997. « Brain Serotonin Content: Physiological Regulation by Plasma Neutral Amino Acids ». *Obesity Research* 5 (4): 377-80. <https://doi.org/10/ghdh35>.

- François, Jean-Christophe, Saba Aïd, Zayna Chaker, Philippe Lacube, Jie Xu, Racha Fayad, Francine Côté, Patrick Even, et Martin Holzenberger. 2017. « Disrupting IGF Signaling in Adult Mice Conditions Leanness, Resilient Energy Metabolism, and High Growth Hormone Pulses ». *Endocrinology* 158 (7): 2269-83. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00261>.
- Gosby, Alison K., Namson S. Lau, Charmaine S. Tam, Miguel A. Iglesias, Christopher D. Morrison, Ian D. Caterson, Jennie Brand-Miller, Arthur D. Conigrave, David Raubenheimer, et Stephen J. Simpson. 2016. « Raised FGF-21 and Triglycerides Accompany Increased Energy Intake Driven by Protein Leverage in Lean, Healthy Individuals: A Randomised Trial ». *PLoS ONE* 11 (8): e0161003. <https://doi.org/10/ggs2sk>.
- Henry, Y, et A Rerat. 1963. « Variations de la consommation spontanée d'énergie en fonction de la nature et de la quantité des matières azotées chez le rat en croissance ». *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*.
- Hill, Cristal M., Hans-Rudolf Berthoud, Heike Münzberg, et Christopher D. Morrison. 2018. « Homeostatic Sensing of Dietary Protein Restriction: A Case for FGF21 ». *Frontiers in Neuroendocrinology* 51: 125-31. <https://doi.org/10/gfh76x>.
- Hill, Cristal M., Thomas Laeger, Diana C. Albarado, David H. McDougal, Hans-Rudolf Berthoud, Heike Münzberg, et Christopher D. Morrison. 2017. « Low Protein-Induced Increases in FGF21 Drive UCP1-Dependent Metabolic but Not Thermoregulatory Endpoints ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10/gbvfvn>.
- Hill, Cristal M., Thomas Laeger, Madeleine Dehner, Diana C. Albarado, Blaise Clarke, Desiree Wanders, Susan J. Burke, et al. 2019. « FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism ». *Cell Reports* 27 (10): 2934-2947.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.022>.
- Jean, Clémentine, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Christiane Larue-Achagiotis. 2002. « Wistar Rats Allowed to Self-Select Macronutrients from Weaning to Maturity Choose a High-Protein, High-Lipid Diet ». *Physiology & Behavior* 76 (1): 65-73. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00676-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00676-5).
- Jean, Clémentine, Sophie Rome, Véronique Mathé, Jean-François Huneau, Najat Aattouri, Gilles Fromentin, Christiane Larue Achagiotis, et Daniel Tomé. 2001. « Metabolic Evidence for Adaptation to a High Protein Diet in Rats ». *Journal of Nutrition* 131 (1): 91-98. <https://doi.org/10/ghd2cw>.
- Kanarek, R. B. 1985. « Determinants of Dietary Self-Selection in Experimental Animals ». *American Journal of Clinical Nutrition* 42 (5): 940-50. <https://doi.org/10/ggsg6p>.
- Kishi, Kyoichi, Kyoko Rikimaru, Yoshiko Matsumoto, Fujiko Shizuka, et Goro Inoue. 1982. « Constancy of Net Protein Intake in Rats on Self-Selection Regimen with Proteins of Various Qualities. » *Japanese Journal of Physiology* 32 (6): 959-70. <https://doi.org/10/bgx3hq>.
- Konkle, A. T. M., K. B. Sreter, S. L. Baker, et C. Bielajew. 2003. « Chronic Paroxetine Infusion Influences Macronutrient Selection in Male Sprague-Dawley Rats ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 74 (4): 883-90. <https://doi.org/10/bjbvmx>.
- Laeger, Thomas, Tara M. Henagan, Diana C. Albarado, Leanne M. Redman, George A. Bray, Robert C. Noland, Heike Münzberg, et al. 2014. « FGF21 Is an Endocrine Signal of Protein Restriction ». *Journal of Clinical Investigation* 124 (9): 3913-22. <https://doi.org/10/f6f43c>.

- Larue-Achagiotis, Christiane, C. Martin, P. Verger, et J. Louis-Sylvestre. 1992. « Dietary Self-Selection vs. Complete Diet: Body Weight Gain and Meal Pattern in Rats ». *Physiology & Behavior* 51 (5): 995-99. <https://doi.org/10/fkfc3k>.
- Leshner, Alan I., George H. Collier, et Robert L. Squibb. 1971. « Dietary Self-Selection at Cold Temperatures ». *Physiology & Behavior* 6 (1): 1-3. <https://doi.org/10/d78n4v>.
- Leshner, Alan I., Harold I. Siegel, et George Collier. 1971. « Dietary Self-Selection by Pregnant and Lactating Rats ». *Physiology & Behavior*, 4. <https://doi.org/10/bxt89n>.
- L'Heureux-Bouron, Diane, Daniel Tomé, Ahmed Bensaid, Céline Morens, Claire Gaudichon, et Gilles Fromentin. 2004. « A Very High 70%-Protein Diet Does Not Induce Conditioned Taste Aversion in Rats ». *Journal of Nutrition* 134 (6): 1512-15. <https://doi.org/10/ghd2cx>.
- Makarios-Lahham, Lina, Suzanne M. Roseau, Gilles Fromentin, Daniel Tome, et Patrick C. Even. 2004. « Rats Free to Select between Pure Protein and a Fat-Carbohydrate Mix Ingest High-Protein Mixed Meals during the Dark Period and Protein Meals during the Light Period ». *Journal of Nutrition* 134 (3): 618-24. <https://doi.org/10/gf9zzf>.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, et R. C. Turner. 1985. « Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Béta-Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man ». *Diabetologia* 28 (7): 412-19. <https://doi.org/10/dbht47>.
- Miller, Gary D., Brian J. Hrupka, Dorothy W. Gietzen, Quinton R. Rogers, et Judith S. Stern. 1994. « Rats on a Macronutrient Self-Selection Diet Eat Most Meals From a Single Food Cup ». *Appetite* 23 (1): 67-78. <https://doi.org/10/bgxcrt>.
- Mullen, B. J., et R. J. Martin. 1992. « Novel Approach to Diet Design for Determining Macronutrient Preference ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 42 (2): 343-46. <https://doi.org/10/fcg2jh>.
- Musten, Beverly, Doryne Peace, et G. Harvey Anderson. 1974. « Food Intake Regulation in the Weanling Rat: Self-Selection of Protein and Energy ». *The Journal of Nutrition* 104 (5): 563-72. <https://doi.org/10.1093/jn/104.5.563>.
- Nadkarni, Nachiket A., Catherine Chaumontet, Dalila Azzout-Marniche, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2013. « The Carbohydrate Sensitive Rat as a Model of Obesity ». Édité par Brenda Smith. *PLoS ONE* 8 (7): e68436. <https://doi.org/10/f5dkrx>.
- National Research Council. 1995. « Nutrient Requirements of Laboratory Animals : Fourth Revised Edition ». Washington, D.C.: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/4758>.
- Nuttall, F. Q., et M. C. Gannon. 1991. « Plasma Glucose and Insulin Response to Macronutrients in Nondiabetic and NIDDM Subjects ». *Diabetes Care* 14 (9): 824-38. <https://doi.org/10/cts63v>.
- Nuttall, Frank Q, et Charles Billington. 1984. « Effect of Protein Ingestion on the Glucose and Insulin Response to a Standardized Oral Glucose Load ». *Diabetes Care* 7 (5): 6. <https://doi.org/10/bjzcwm>.
- Pallotta, Johanna A., et Patricia J. Kennedy. 1968. « Response of Plasma Insulin and Growth Hormone to Carbohydrate and Protein Feeding ». *Metabolism* 17 (10): 901-8. <https://doi.org/10/chpwh9>.
- Peters, J. C., et A. E. Harper. 1984. « Influence of Dietary Protein Level on Protein Self-Selection and Plasma and Brain Amino Acid Concentrations ». *Physiology & Behavior* 33 (5): 783-90. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90048-9).

- Peters, J.C., et A.E. Harper. 1981. « Protein and Energy Consumption, Plasma Amino Acid Ratios, and Brain Neurotransmitter Concentrations ». *Physiology & Behavior* 27 (2): 287-98. <https://doi.org/10/d3zxx6>.
- Pichon, Lisa, Jean-François Huneau, Gilles Fromentin, et Daniel Tomé. 2006. « A High-Protein, High-Fat, Carbohydrate-Free Diet Reduces Energy Intake, Hepatic Lipogenesis, and Adiposity in Rats ». *Journal of Nutrition* 136 (5): 1256-60. <https://doi.org/10/ghn3d3>.
- Pol, G., et C. den Hartog. 1966. « The Dependence on Protein Quality of the Protein to Calorie Ratio in a Freely Selected Diet and the Usefulness of Giving Protein and Calories Separately in Protein Evaluation Experiments ». *British Journal of Nutrition* 20 (4): 649-61. <https://doi.org/10/dtrq7c>.
- Rabinowitz, D, T J Merimee, R Maffezzoli, et J A Burgess. 1966. « Patterns of Hormonal Release after Glucose, Protein, and Glucose plus Protein ». *Lancet*, 4.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et G. C. Fahey. 1993. « AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet ». *Journal of Nutrition* 123 (11): 1939-51. <https://doi.org/10/ghjkfp>.
- Richter, Curt P., et Bruno Barelare. 1938. « Nutritional Requirements of Pregnant and Lactating Rats Studied by the Self-Selection Method ». *Endocrinology* 23 (1): 15-24. <https://doi.org/10.1210/endo-23-1-15>.
- Richter, Curt P., L. Emmett Holt, et Bruno Barelare. 1938. « Nutritional Requirements for Normal Growth and Reproduction in Rats Studied by Self-Selection Method ». *American Journal of Physiology-Legacy Content* 122 (3): 734-44. <https://doi.org/10/ggsg2d>.
- Rieth, Nathalie, et Christiane Larue-Achagiotis. 1997. « Exercise Training Decreases Body Fat More in Self-Selecting Than in Chow-Fed Rats ». *Physiology & Behavior* 62 (6): 1291-97. <https://doi.org/10/bg5s7p>.
- Robinson, S M, C Jaccard, C Persaud, A A Jackson, E Jequier, et Y Schutz. 1990. « Protein Turnover and Thermogenesis in Response to High-Protein and High-Carbohydrate Feeding in Men ». *American Journal of Clinical Nutrition* 52 (1): 72-80. <https://doi.org/10/ghw99t>.
- Romsos, Dale R., et Deborah Ferguson. 1982. « Self-Selected Intake of Carbohydrate, Fat, and Protein by Obese (Ob/Ob) and Lean Mice ». *Physiology & Behavior* 28 (2): 301-5. <https://doi.org/10/b7bbwd>.
- Shor-Posner, Gail, Christopher Ian, Glen Brennan, Tamara Cohn, Harvey Moy, Autumn Ning, et Sarah F. Leibowitz. 1991. « Self-Selecting Albino Rats Exhibit Differential Preferences for Pure Macronutrient Diets: Characterization of Three Subpopulations ». *Physiology & Behavior* 50 (6): 1187-95. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90581-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90581-8).
- Simpson, S. J., et D. Raubenheimer. 2005. « Obesity: The Protein Leverage Hypothesis ». *Obesity Reviews* 6 (2): 133-42. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2005.00178.x>.
- Stepien, Magdalena, Claire Gaudichon, Gilles Fromentin, Patrick Even, Daniel Tomé, et Dalila D. Azzout-Marniche. 2011. « Increasing Protein at the Expense of Carbohydrate in the Diet Down-Regulates Glucose Utilization as Glucose Sparing Effect in Rats ». *PLoS ONE* 6 (2): np. <https://doi.org/10/d39j45>.
- Tempel, D. L., G. Shor-Posner, D. Dwyer, et S. F. Leibowitz. 1989. « Nocturnal Patterns of Macronutrient Intake in Freely Feeding and Food-Deprived Rats ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 256 (2): R541-48. <https://doi.org/10/ggsgz3>.

- Theall, Cynthia L., Judith J. Wurtman, et Richard J. Wurtman. 1984. « Self-Selection and Regulation of Protein:Carbohydrate Ratio in Foods Adult Rats Eat ». *Journal of Nutrition* 114 (4): 711-18. <https://doi.org/10/ggsgz2>.
- Thibault, L, E Mok, K Nagai, et C Wong. 1999. « Serotonin Infusion in the SCN Reduces Casein Ingestion in Rats ». *Physiology & Behavior* 68 (1-2): 37-45. <https://doi.org/10/b8d6th>.
- Thouzeau, C. 1995. « Refeeding in Fasted Rats: Dietary Self-Selection According to Metabolic Status ». *Physiology & Behavior* 58 (6): 1051-58. <https://doi.org/10/fn9223>.
- Tomé, Daniel, Catherine Chaumontet, Patrick C. Even, Nicolas Darcel, et Dalila Azzout-Marniche. 2019. « Protein Status Modulates the Rewarding Value of Foods and Meals to Maintain an Adequate Protein Intake ». *Physiology & Behavior* 206: 7-12. <https://doi.org/10/gfzg74>.
- Tomé, Daniel, Catherine Chaumontet, Patrick C. Even, Nicolas Darcel, Simon N. Thornton, et Dalila Azzout-Marniche. 2020. « Protein Status Modulates an Appetite for Protein To Maintain a Balanced Nutritional State-A Perspective View ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68 (7): 1830-36. <https://doi.org/10/ggnrxx>.
- Wurtman, R. J., et J. D. Fernstrom. 1975. « Control of Brain Monoamine Synthesis by Diet and Plasma Amino Acids ». *American Journal of Clinical Nutrition* 28 (6): 638-47. <https://doi.org/10/ghdh38>.
- Yokogoshi, Hidehiko, Cynthia L. Theall, et Richard J. Wurtman. 1986. « Selection of Dietary Protein and Carbohydrate by Rats: Changes with Maturation ». *Physiology & Behavior* 36 (5): 979-82. <https://doi.org/10/bddqnm>.

Supplementary table 1. Experimental procedures: List of the names of the different groups studied and the associated diets.

Diets are named according to their protein-to-energy (PE) ratio and carbohydrate-to-non-protein-energy (CnpE) ratio, corresponding to the amount of carbohydrate in the protein-free part of diet. Names were in the form 100P (protein diet), xxCnp (carbohydrate-lipid diet) or xxPxxCnp (composite diet).

	Group name	Protein diet	Protein-free diet	Composite diets
Experiment 1	P-30Cnp	100P	30Cnp	-
	P-45Cnp	100P	45Cnp	-
	P-60Cnp	100P	60Cnp	-
	P-75Cnp	100P	75Cnp	-
	15P87Cnp	-	-	15P87Cnp
Experiment 2	15P-3ch	100P	60Cnp	15P60Cnp
	30P-3ch	100P	60Cnp	30P60Cnp
	40P-3ch	100P	60Cnp	40P60Cnp
	50P-3ch	100P	60Cnp	50P60Cnp
Experiment 3	15P30Cnp	-	-	15P30Cnp
	15P60Cnp	-	-	15P60Cnp
	30P30Cnp	-	-	30P30Cnp
	30P60Cnp	-	-	30P60Cnp

Supplementary table 2. Method of calculation of protein, glucose and lipid oxidation

Values: Quotient of protein oxidation = 0.825; Quotient of lipid oxidation = 0.700; Quotient of glucose oxidation = 1.000. NPRQ: Non-protein respiratory quotient; RQ: Respiratory quotient.

Parameter	Calculations
NPRQ	$(RQ - (PE \text{ ratio} \times \text{quotient of protein oxidation})) / (1 - PE \text{ ratio})$
%Gox	$(NPRQ - \text{quotient of lipid oxidation}) / (\text{quotient of glucose oxidation} - \text{quotient of lipid oxidation})$
%Lox	$1 - \%Gox$
Pox (kJ)	TEE x PE ratio
Gox (kJ)	$(TEE - PE \text{ ratio}) \times \%Gox$
Lox (kJ)	$(TEE - PE \text{ ratio}) \times \%Lox$

Supplementary table 3. Primer sequences used for liver RNA analysis.

Forward and reverse primers were designed using primer express software (Applied Biosystems). Fgf21: fibroblast growth Factor 21.

	Forward Primer (5' to 3')	Reverse Primer (3' to 5')
18s	ACGGAAGGGCACCACAGGAG	GCACCACCAACCGGAAACG
Fgf21	CCTGGAGCTCAAAGCCTTGA	AAACTGCAGGCCTCAGGATC

Supplementary table 4. Body weight and body composition of rats with a choice between a 100P diet, a 60Cnp diet and a composite diet (15P60Cnp, 30P60Cnp, 40P60Cnp and 50P60Cnp) for 3 wk (Experiment 2)¹.

¹ Values are mean $\pm$ SEMs, n=6. ² P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different, $P \leq 0.05$ (post-hoc Bonferroni tests). LBM: Lean body mass

	15P-3Ch (n=6)	30P-3Ch (n=6)	40P-3Ch (n=6)	50P-3Ch (n=6)	P ²
Initial body weight (g)	281 $\pm$ 3.94	282 $\pm$ 2.96	282 $\pm$ 3.49	283 $\pm$ 3.64	0.993
Final body weight (g)	387 $\pm$ 8.96	374 $\pm$ 7.39	376 $\pm$ 12.3	377 $\pm$ 8.39	0.798
Daily BW gain	5.26 $\pm$.335	4.64 $\pm$ 0.302	4.67 $\pm$.456	4.73 $\pm$ 0.318	0.579
LBM (g)	330 $\pm$ 6.39	320 $\pm$ 5.17	322 $\pm$ 7.03	320 $\pm$ 6.75	0.627
Fat mass (g)	38.4 $\pm$ 5.12	40.3 $\pm$ 3.33	39.4 $\pm$ 7.67	38.5 $\pm$ 3.18	0.994
Adiposity (%)	9.80 $\pm$ 1.19	10.7 $\pm$ 0.759	10.2 $\pm$ 1.56	10.5 $\pm$ 0.685	0.960
Subcutaneous/Total fat ratio	0.437 $\pm$ 0.013	0.445 $\pm$ 0.008	0.458 $\pm$ 0.030	0.440 $\pm$ 0.007	0.832

2.3.2. Etude 2 – L'interaction protéines-glucides affecte l'équilibre énergétique, les concentrations plasmatiques de FGF21 et IGF-1, et l'expression des gènes hypothalamiques chez le rat

2.3.2.A. Article principal

Contexte et objectifs de l'étude

Un apport protéique adéquat est essentiel pour la croissance et la maintenance de l'organisme, ainsi des systèmes de régulation sont capables de spécifiquement détecter un apport insuffisant et d'y répondre en déclenchant des changements de la prise alimentaire, de la dépense énergétique et de la composition corporelle. Les acides aminés étant impliqués dans l'homéostasie énergétique, tout comme les glucides et les lipides, les mécanismes contrôlant l'apport en protéines doivent fonctionner indépendamment mais aussi en combinaison avec les systèmes contrôlant l'apport énergétique global.

FGF21 est un médiateur essentiel des réponses métaboliques liées à la baisse de la teneur en protéines. Cependant, il a été montré que d'autres paramètres, tels que les concentrations élevées de glucose ou d'insuline dans le sang, sont capables d'augmenter les concentrations plasmatiques de FGF21. Cependant, la plupart des études était formulée par un échange entre les protéines et les glucides ou inversement pour maintenir une teneur en graisses fixe, donc tous ces résultats ne permettent pas de conclure clairement sur l'interaction possible entre les protéines et les glucides pour contrôler la réponse de FGF21. La question de savoir si FGF21 est régulé par la teneur en protéines ou la teneur en glucides fait encore débat.

L'objectif de cette étude était de quantifier les rôles respectifs des niveaux de protéines et de glucides alimentaires sur la balance énergétique, les concentrations plasmatiques de FGF21 et d'IGF-1, et les neurotransmetteurs hypothalamiques (POMC, NPY, AgRP et CART).

Méthodes

Dans un cadre géométrique (« *geometric framework* ») simplifié, des rats Wistar mâles ont été nourris pendant 3 semaines avec 12 régimes alimentaires contenant 3 à 30% de protéines, et variant selon la quantité de glucides et de lipides (**Expérience 3 – Page 52**)

Les analyses statistiques ont été effectuées principalement par des tests ANOVA et des tests de corrélation.

Résultats principaux

Les paramètres de la composition corporelle étaient majoritairement impactés par la teneur en protéines des régimes, mais faiblement et de façon moins systématique par la teneur en glucides et lipides. Le gain de poids corporel était négatif avec le régime 3P, faible avec les régimes 5P et 8P, et plus élevé avec les régimes 15P et 30P ($P < 2,00 \times 10^{-16}$). Cela provient majoritairement du fait que la masse maigre était aussi réduite quand la teneur en protéines diminuait, notamment sous 15%.

La consommation énergétique augmentait quand la teneur en protéines diminuait ($P = 0,009$). De plus, elle augmentait quand le ratio glucides/(glucides+lipides) diminuait, lorsqu'il avait plus de

lipides par rapport aux glucides, sauf dans les régimes 3P et 30P. Nous pouvons supposer que le régime 30P préserve les rats de cette augmentation de prise alimentaire induite par les régimes riches en graisses. En parallèle de l'augmentation de la prise alimentaire, nous avons montré que la dépense énergétique était plus élevée avec les régimes faibles en protéines, 3P et 5P notamment ($P=2,20 \times 10^{-10}$).

Dans cette étude, les concentrations plasmatiques de FGF21 n'étaient impactées que par les teneurs en protéines des régimes ($P=2,00 \times 10^{-16}$) et pas par le ratio glucides/(glucides/lipides) ($P=0,844$). Les concentrations suivaient une fonction puissance tel que l'augmentation de FGF21 se faisait doucement de 100 à 40 kJ de protéines consommées puis augmentait très fortement ($R^2=0,797$).

Conclusion

Cette étude a utilisé 12 régimes différents avec des niveaux de protéines, de glucides et de lipides variés, qui nous ont permis d'analyser les effets des teneurs en protéines et en glucides dans les régimes alimentaires sur plusieurs paramètres impliqués dans la régulation de l'équilibre énergétique. La plupart des organes et des tissus ainsi que la dépense énergétique ont été affectés uniquement par la teneur en protéines. FGF21 a également répondu principalement à la teneur en protéines, ce résultat permet de distinguer les rôles spécifiques des niveaux de protéines et de glucides alimentaires sur la régulation à long terme de la concentration de FGF21 dans le plasma.

Manuscrit de l'article 2

Le manuscrit est accepté dans American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.

Protein-carbohydrate interaction effects on energy balance, FGF21, IGF-1 and hypothalamic genes expression in rats

Josephine Gehring, Dalila Azzout-Marniche, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, Patrick C. Even
Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE. UMR PNCA, 75005, Paris, France

Corresponding author: Joséphine Gehring, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, 75005, Paris, France. josephine.gehring@agroparistech.fr

Sources of support: This study was supported by the Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) and by the research unit Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions: D.A-M., J.G., C.G. and P-C.E. designed research; C.C., D.A-M., J.G. J.P. and P-C.E. performed experiments; J.G. and P-C.E. analysed data; J.G., D.A-M, C.G and P-C.E. drafted the original manuscript; J.G. and P-C.E. have primary responsibility for final content. All authors read and approved the final version.

Abbreviations: AgRP: Agouti-related Protein Precursor; AMM: Active Metabolic Mass; CART: Cocaine and Amphetamine Regulated; CnpE ratio: Carbohydrate-to-Non-Protein-Energy ratio; CNS: Central Nervous System; FGF21: Fibroblast Growth Factor 21; HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of the Insulin Resistance; IBAT: Interscapular Brown Adipose Tissue; IGF-1: Insulin Growth Factor 1; LBM: Lean Body Mass; NAcc: Nucleus Accumbens; NPY: Neuropeptide Y; PE ratio: Protein-to-Energy ratio; POMC: Proopiomelanocortin Precursor; Pox: Protein Oxidation; SEM: Standard Error of the Mean; TEE: Total Energy Expenditure.

Abstract

Amino acids are involved in energy homeostasis, just as are carbohydrates and lipids. Therefore, mechanisms controlling protein intake should operate independently and in combination with systems controlling overall energy intake to coordinate appropriate metabolic and behavioural responses. The objective of this study was to quantify the respective roles of dietary protein and carbohydrate levels on energy balance, plasma FGF21 and IGF-1 concentrations, and hypothalamic neurotransmitters (POMC, NPY, AgRP and CART). In a simplified geometric framework, 7-week-old male Wistar rats were fed 12 diets containing 3 to 30% protein for 3 weeks, in which carbohydrates accounted for 30 to 75% of the carbohydrate and fat part of the diet. As a result of this study, most of the studied parameters (body composition, energy expenditure, plasma FGF21 and IGF-1 concentrations and Pomc/AgRP ratio) responded mainly to the protein content and to a lesser extent to the carbohydrate content in the diet.

Key words. Low-protein diet; FGF21; IGF-1, Protein-carbohydrate interaction; energy balance; body composition; hypothalamic gene expression.

New & Noteworthy

As mechanisms controlling protein intake can operate independently and in combination with those controlling energy intakes, we investigated the metabolic and behavioural effects of the protein-carbohydrate interaction. With a simplified geometric framework, we showed that body composition, energy balance, plasma FGF21 and IGF-1 concentrations, and hypothalamic Pomc/AgRP ratio were primarily responsive to protein content and, to a lesser extent, to carbohydrate content of the diet.

Introduction

An adequate qualitative and quantitative supply of amino acids is essential for growth and health. Regulatory systems dedicated specifically to the detection of insufficient protein intake operate both independently and in combination with the systems controlling energy intake to coordinate appropriate metabolic and behavioural responses (Morrison et Laeger 2015). Thus, these systems are able to sense a defect in protein intake and to respond by triggering changes in appetite for protein (Larson et al. 2019; Hill et al. 2019), in energy expenditure, in substrate metabolism and in regulation of various metabolic processes as well as simultaneously reducing growth to reduce protein requirements.

It appeared recently that fibroblast growth factor 21 (FGF21) is an essential mediator of these responses (Morrison et Laeger 2015; Hill et al. 2019; Huang et al. 2013; Laeger et al. 2014; Solon-Biet et al. 2015; Maida et al. 2016; Hill et al. 2017). FGF21 is expressed in multiple tissues (Hill et al. 2019; Staiger et al. 2017), but its circulating concentrations have been primarily linked to FGF21 synthesis in the liver (Laeger et al. 2014; Hill et al. 2018; Chaumontet et al. 2019) that is well positioned to sense alterations in amino-acid intake due to its direct sensing of absorbed amino acids via the portal circulation (Maida et al. 2016). FGF21 mediates also brain specific responses to fasting (Liang et al. 2014) and protein deprivation (Hill et al. 2019), and therefore coordinates the hepatic response through a liver-brain signalling axis. It is now clear that the chronic metabolic effects of FGF21 are mediated through actions on the central nervous system (CNS) since deletion of the β -klotho receptors in the CNS, but not in hepatocytes or adipocytes, impairs FGF21 mediated effects on energy homeostasis (BonDurant et Potthoff 2018; Owen et al. 2014; Talukdar, Zhou, et al. 2016; Lan et al. 2017; BonDurant et al. 2017). Other parameters than low-protein diets, such as fasting, ketogenic diets, cold (Hondares et al. 2011), high blood glucose or insulin concentrations and carbohydrate intake (BonDurant et Potthoff 2018; von Holstein-Rathlou et al. 2016; Sánchez, Palou, et Picó 2009) have been shown to increase plasma FGF21 concentrations. Several studies reported that ingestion of carbohydrate stimulated the release of FGF21, at least in the short-term. In mice, it has been shown that ingestion of a high-carbohydrate low-protein diet stimulates FGF21 synthesis and secretion through the high blood glucose delivery, but also the low amino acid concentration (Chalvon-Demersay et al. 2016). The same study demonstrated that FGF21 synthesis and secretion in the liver are controlled by hepatic glucose levels by ex-vivo analysis of FGF21 mRNA expression in hepatocytes. In agreement with these results, other studies have shown that this carbohydrate-induced increase in FGF21 gene expression in mouse hepatocytes and liver is mediated by the transcription factor ChREBP (Iizuka, Takeda, et Horikawa 2009; Benhamed et al. 2012). In humans, it has also been shown that a single monosaccharide (fructose) intake is a powerful but brief activator of FGF21 secretion (Dushay et al. 2015), as is an excess of dietary carbohydrates (Lundsgaard, Fritzen, et al. 2017).

Since in most studies, low-protein diets were formulated by an exchange between protein and carbohydrate or inversely to maintain a fixed fat content, all these results do not lead to a clear conclusion regarding the possible interaction between protein and carbohydrate to control the FGF21 response. To our knowledge, there is only one study in which variations in dietary protein and carbohydrate did not systematically evolve in opposite directions (Solon-Biet et al. 2016). This study involved, in a “nutritional framework”, more than 800 mice consuming a wide range of diets, and is thus difficult to replicate using a rat model which we consider a better model than the mouse to study human nutritional requirements (Blais et al. 2018; Even, Gehring, et Tomé 2021). The authors concluded that the dietary protein level was by far the main parameter affecting plasma FGF21 concentrations, but noticed also that the largest FGF21 responses occurred in the context of a low-protein high-carbohydrate diet and therefore that carbohydrate also affected FGF21 to some extent.

Furthermore, the interest in the role of FGF21 in protein and energy homeostasis has led to neglecting somewhat the important role played by insulin-like growth factor-1 (IGF-1). IGF-1 is very much implicated in the regulation of body composition and therefore protein synthesis. As for FGF21, nutritional status and protein intake are critical regulators of IGF-1 production (J.-P. Thissen, Ketelslegers, et Underwood 1994; J. P. Thissen et al. 1991). IGF-1 is a low molecular weight peptide that mediates the growth-promoting effects of growth hormone (GH). It circulates bound to specific carrier proteins and possess, to a different extent, sulfation, mitogenic and insulin-like activity (Grant et al. 1979; Clemmons et al. 1985; Copinschi G et Chatelain P 1985). The principal source of circulating IGF-1 is the liver, and it is secreted as it is produced. Plasma IGF-1 concentrations are decreased in patients with poor nutritional conditions (Grant et al. 1979) and rise significantly when the nutritional status is improved and is considered as a reliable nutritional parameter (Clemmons et al. 1985; Minuto et al. 1989). The decrease in plasma IGF-1 also appears to be involved in the metabolic adaptation to starvation since treatment with IGF-1 to prevent the starvation-induced decrease in IGF-1 reduces weight loss (O’Sullivan et al. 1989). Studies in laboratory animals and volunteer human subjects revealed a strong relationship between caloric intake, dietary protein, and circulating IGF-1 (R. D. Reeves et al. 1979; Takano et al. 1980; Clemmons et al. 1981). However, that protein rather than energy balance may be particularly involved in the regulation of IGF-1 can be suspected from the observation that patients with protein or protein-calorie malnutrition have lower IGF-1 than have patients with calorie-only malnutrition, and that changes in IGF-1 are correlated with nitrogen balance (Donahue et Phillips 1989). It appears that IGF-1 responses to changes in nutrition status is much quicker than that of other protein like albumin or transferrin but require several hours (J.-P. Thissen, Ketelslegers, et Underwood 1994; Donahue et Phillips 1989), while FGF21 responds on a meal to meal basis (Dushay et al. 2015). In a previous study conducted in mice, we observed also that the increase in FGF21 and the decrease in IGF-1 that occurred in response to a decrease in dietary protein content were closely correlated (Chaumontet et al. 2019).

There is still debate as to whether FGF21 is regulated solely by the protein content of the diet or whether the carbohydrates content of the diet also plays a significant role, due to the reported effects of carbohydrates on the plasma and liver FGF21 levels at least in the short term. The aim of this paper was to quantify the respective roles of carbohydrates and protein in the long-term regulation of FGF21 and IGF-1 using various diets in which protein and carbohydrates did not systematically evolve in opposite directions.

General materials and methods

Animals and housing

Seventy-seven-week-old male rats (215-240 g) of the Wistar RccHan strain were used (ENVIGO, Gannat, France). The rats were delivered weekly by groups of 10 and assigned randomly to one of the experimental diets, for a total of 70 rats. After one week of adaptation to the laboratory conditions (temperature $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, humidity 60%, 12/12 L/D cycle lights on at 08:00), the rats were singly housed for three weeks in Plexiglas cages bedded with wood shavings. The experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609 EEC) regarding the care and use of laboratory animals and were approved by the area Ethics Committee (APAFIS#16996).

Composition of diets and pellet preparation

Twelve diets in which the protein-to-energy ratios (PE) varied from 3 to 30%, and the carbohydrate-to-carbohydrate+fat ratio, subsequently named the carbohydrate-to-non-protein-energy ratios (CnpE) varied from 30 to 75% were used (**Table 1**). We established a fixed value of CnpE ratios rather than a fixed value of carbohydrates-to-energy ratios in the diet, in order to better control the effects of the fat/carbohydrates content of the diet that is well known to affect energy intake. The diets were named according to their PE and CnpE ratios in the form “xxPxxCnp”. The food pellets were prepared twice per week from dry powders manufactured by the research Sciences de l'Animal et de l'Aliment de Jouy-en-Josas - Equipe Régimes à Façon (Jouy-en-Josas, France). Proteins were whole milk proteins LR 85F (Armor Protein, Nantes, France), carbohydrates were corn starch (Roquette, Lestrem, France) and sucrose (Eurosucre, Paris, France), and fat was soy oil (Bailly SA, Aulnay-sous-bois, France). The LR 85F milk protein is produced by ultrafiltration, and was initially designed for infant nutrition, sports nutrition, slimming diets, and hospital nutrition. We did not directly measure the nitrogen content of the batch used during this study, but according to the manufacturer analyses and quality control periodically performed in the laboratory, protein content amounts 77% of powder weight assuming 6.25g protein per gram of nitrogen. Its digestibility after accounting for nitrogen losses in urine and faeces was previously measured in rats of the same strain and age as those used in this experiment and amounts 85%. Therefore,

digestible protein intake was computed as milk powder intake * 77% * 85% (**Table 1**). All the diets were complemented with minerals and vitamins according to the AIN-93 requirements (P. G. Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). The powders were mixed with the necessary amount of water to make a consistent dough and then formed into pellets sufficient for three days of feeding. The pellets were left to dry at room temperature for three days before being given to the rats. The diets and water were provided ad libitum.

Table 1. Composition and energy content of tested diets.

Whole milk protein was provided by Armor protein. According to the manufacturer, control quality measurements regularly performed by mass spectrometry in our laboratory, protein amounted 77% of the wet weight of the powder. In addition, from studies performed in collaboration with Pr. Vermorel at unit of Human Nutrition at Clermont-Ferrand, we previously measured that digestibility after nitrogen losses in urine and faeces was 85%. Accordingly, the metabolizable energy content of the milk powder was computed as $5.725 * 0.77 * 0.85 = 3.75$ kcal/g (15.7 kJ/g). Corn Starch was provided by Roquette, dry matter amounted 88%, digestibility 1 and metabolizable energy was thus $4.18 * 0.88 = 3.4$ kcal/g (15.7 kJ/g). Saccharose was provided by Eurosucre, dry matter amounted 99.5% digestibility was 1, and metabolizable energy was thus $3.94 * 0.995 = 3.92$ kcal/g (16.41 kJ/g). Soy oil was provided by Bailly SA, dry matter was 100% and digestibility 1, so that metabolizable energy was 9 kcal/g (37.7 kJ/g). The carbohydrate-to-non-protein-energy (CnpE) ratio was computed as the carbohydrates-to-carbohydrates+lipid content of the diet. We controlled this parameter rather than the carbohydrates content only of the diet to prevent to numerous different values of the fat content of the diet, since this parameter is known to affect energy intake. Fixing a limited value of CnpE ratios allowed to vary the carbohydrates content of the diet and simultaneously to limit to 2-3 different levels the carbohydrates/fat content in the diet.

	3P45Cnp	3P75Cnp	5P30Cnp	5P60Cnp	8P45Cnp	8P75Cnp	15P30Cnp	15P60Cnp	15P75Cnp	30P30Cnp	30P45Cnp	30P60Cnp
Whole milk protein (g/kg)	38.8	30.5	73.8	56.7	101	80.9	208	166	151	380	346	319
Corn starch (g/kg)	509	667	379	582	472	629	318	507	575	239	328	402
Sucrose (g/kg)	81.9	108	61.0	93.7	76.0	101	51.9	81.7	92.7	38.5	52.8	64.7
Soy oil (g/kg)	274	98.0	389	171	254	92.3	327	149	84.6	246	176	117
Mineral compound AIN-93M (g/kg)	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin compound AIN-93Vx (g/kg)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose (g/kg)	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Choline chloride (g/kg)	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30
Energy (kJ/g)	20.3	16.3	22.9	17.9	19.8	16.1	21.5	17.4	16.0	19.7	18.1	16.7
Protein-to-energy (PE) ratio (%)	3.00	3.00	5.00	4.90	8.00	7.90	15.2	15.0	14.8	30.3	30.1	30.0
Carbohydrate-to-non-protein-energy (CnpE) ratio (%)	46.7	76.2	46.7	76.2	46.7	76.2	31.5	61.6	76.2	31.4	46.7	61.7
Carbohydrate-to-energy ratio (%)	45.3	74.0	29.8	58.5	42.9	70.2	26.7	52.4	64.9	21.9	32.6	43.2
Fat-to-energy ratio (%)	51.7	23.1	65.1	36.5	49.0	21.9	58.1	32.7	20.3	47.8	37.3	26.8

Body weight, body composition and tissues sampling

Body weight (g) was measured twice per week throughout the experiments. At the end of the studies, the rats were anesthetized with isoflurane, blood was collected from the vena cava until cardiac arrest

and the rats were immediately decapitated to remove the brain to collect the hypothalamus and the nucleus accumbens (NAcc). The liver and the interscapular brown adipose tissue (IBAT) were also collected. All samples were dissected quickly, deep-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for subsequent analysis. Body composition was measured by dissection and weighing of all the fat depots (visceral, sub-cutaneous, retroperitoneal and epididymal), the main tissues and organs. Lean body mass (LBM) was computed as body weight minus fat mass, and adiposity as fat mass divided by body weight. Active metabolic mass (AMM) (g) was computed as the weight of lean body mass plus 20% of the weight of fat mass (Arch et al. 2006; Even et Nadkarni 2012). AMM was used to normalize energy intake and expenditure. In previous studies, we have confirmed the validity of this adjustment mode for body composition (Chaumontet et al. 2019; Even et Nadkarni 2012; Azzout-Marniche et al. 2014; Nadkarni et al. 2013; François et al. 2017). Initial body composition of rats was estimated from a data base in which body composition was measured by MRI at the “Small Animal Imaging Platform” of Paris-Descartes University (Paris, France), and in which we selected of a reference group of 9 rats of the same strain delivered by the same provider (ENVIGO, Gannat, France). Mean body weight of this reference group was 267.9 ± 2.2 g for 269.4 ± 1.4 g in the rats of this study.

Energy and water intakes

Food intake (g/d) was measured twice per week by weighing the pellets and was then converted to kJ/d according to the energy content of the diet and after correction for the pellet water content (**Table 1**). The water content at the time of weighing was calculated based on the water evaporation curve determined on pellets produced at the same time as those given to the rats. Water intake was also measured during the study and added to the amount of water consumed in the pellets to estimate the total amount of water consumed (mL/d).

Energy expenditure, food efficiency and protein oxidation

Mean total energy expenditure (TEE) throughout the study was computed by subtracting energy retrained in the body from energy intake. Energy intake was not corrected for the percent of energy lost in faeces, on the average 10-15% of the ingested calories (Elvert et al. 2013; Le Bellego et al. 2001). Therefore, TEE was overestimated by 10-15%. We also assumed that digestibility was not affected by the dietary protein level (but see discussion) and therefore that the overestimation was similar in all groups.

Food efficiency (kJ/kJ) was measured from energy intake and the gain in fat and LBM assuming 32.2 kJ for 1g of fat and 7.6 kJ for 1g of LBM (Hall 2008), and computed as energy retained in the body divided by energy ingested. Protein intake computed from total energy intake times the percentage of protein in the diet, and evolution of body composition during the study were used to compute protein

oxidation (Pox) as the difference between protein intake (kJ/d) and the amount of protein fixed in the body (kJ/d) assuming that protein amounted to 25% of LBM.

Biochemistry

Blood samples (0.5 mL) were collected from the tail vein in EDTA tubes in the morning (10:00-12:00) from rats that had not been previously fasted. A drop was immediately used to measure blood glucose with an automatic analyser (Life-Scan, One Touch Vita). Then the blood was centrifuged (5000 g, 15 min, 4°C) and the plasma stored at -20°C until assayed. Plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), albumin, cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride (TG) were determined on an Olympus AU400 robot (CEFI Bichat-Paris). Plasma insulin, FGF21 and IGF-1 were assayed by ELISA tests using commercial kits from Mercodia (Rat Insulin ELISA 10-1250-10), BioVendor (Mouse/Rat FGF-21 ELISA RD291108200R) and Alpco (Mouse/Rat IGF-1 ELISA 22-IG1MS-E01). The Homeostatic Model Assessment of the Insulin Resistance (HOMA-IR) index was calculated as: (insulinemia (pmol/L)* blood glucose (mmol/L))/405 (Matthews et al. 1985). Liver samples collected during dissection (80-100 mg) were homogenized in 1 mL of buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris HCL and 0.1% Triton X-100) (Arakawa et al. 2011) and their TG content was determined using a commercial kit (Randox).

Molecular biology

RNAs were extracted from liver, hypothalamus and NAcc samples in 1 ml of TRIzol® reagent (Invitrogen, Breda, The Netherlands), and in IBAT in 1.5 ml of TRIzol® reagent (Invitrogen, Breda, The Netherlands). The RNA concentrations were measured (NanoDrop One spectrophotometer), and after dilution, 0.4 µg of total RNA was reverse-transcribed using a high-capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed using a StepOne Real-time PCR (Applied Biosystems) and the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) as described previously (Chaumontet et al. 2015). For each run, the efficiency and possible contaminations were checked. Gene expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$ relative to 18s RNA (liver and IBAT) or RPL13 RNA (hypothalamus and NAcc), used as the housekeeping gene. Target genes and primers used are detailed in Supplementary Table 1.

Statistical Analysis

Statistical tests were performed using RStudio software (2015; Integrated Development for R, RStudio, Inc.; Boston, USA) and a threshold of $P \leq 0.05$ was chosen as significant. Values in the tables are means $\pm$ standard error of the mean (SEM) and values in figures are presented in the form of boxplot (1st quartile, median, 3rd quartile). Normality of the parameter's distribution was previously verified by a Shapiro test and corrected by the Box and Cox transformation before statistical comparisons. Dietary

PE and CnpE ratios were converted in non-numeric factors and differences between groups were analysed by 2-way ANOVA test (parameter ~ PE ratio * CnpE ratio) and a post-hoc Bonferroni test. All groups were presented in the figures when we observed an effect of both PE and CnpE ratios. However, in most cases, we observed an effect of only the PE ratio, and for clarity, the data have been plotted by PE ratios only. When ANOVA tests revealed significant effects of both PE and CnpE ratios on a given parameter, the analysis was continued by performing a stepwise regression analysis to quantify the respective roles of PE and CnpE ratios on that parameter. Correlation analyses between various parameters and the PE ratio were also performed in Excel and the significance of the correlation was assessed using the Pearson correlation coefficient.

Results

Body weight and body composition

Body weight gain was negative in the 3P fed rats, and positive but significantly lower in 5P and 8P fed rats than in 15P and 30P fed rats (**Table 2**). The weight of LBM (**Table 2**), and of all measured organs and skin (**Supplementary Table 2**), was reduced when the PE ratio was reduced at or below 8%, while the CnpE ratio induced no significant effects. The significant decrease in the weights of tail, head and limbs (**Supplementary Table 2**) in which bone mass amounts to a significant part of the weight, with the decrease in the dietary PE ratio, suggests that together with the LBM decrease, bone mass was also decreased in rats fed diets with less than 15% of protein. Total fat mass, IBAT mass, and to a lesser extend adiposity and visceral fat mass were affected only by the PE ratio (**Table 2**). LBM gain was negative in the P3 fed mice and fat mass gain was also lower than in all the other groups. As a result, energy retained in the body was extremely low, even when compared to P5 fed rats. The parameter that was significantly affected by PE ratio and to a lower extent by CnpE ratio was the sub-cutaneous fat mass that tended to be lower in 15P and 30P fed rats than in low-protein fed ones (**Table 2**), indicating that fat tended to deposit more in subcutaneous tissues in low-protein fed rats. In summary, body composition shows that LBM decreased in rats fed diets with less than 15% protein, but that the changes in fat mass were less systematic. On the other hand, the CnpE ratio had no significant effects on most of the parameters of body composition.

Energy, protein and water intake

Energy intake increased as the PE ratio in the diet decreased, but also increased as the CnpE ratio decreased except for 3P and 30P diets (**Figure 1A**). Regression analysis showed also that the PE ratio alone ($R^2=0.42$), but not the CnpE ratio alone ($R^2=0.04$), allowed for a significant prediction of mean energy intake, but stepwise regression analysis showed that the combination of the PE and CnpE ratios improved the prediction of mean energy intake ($R^2=0.56$; **Figure 1B**). Protein intake was primarily

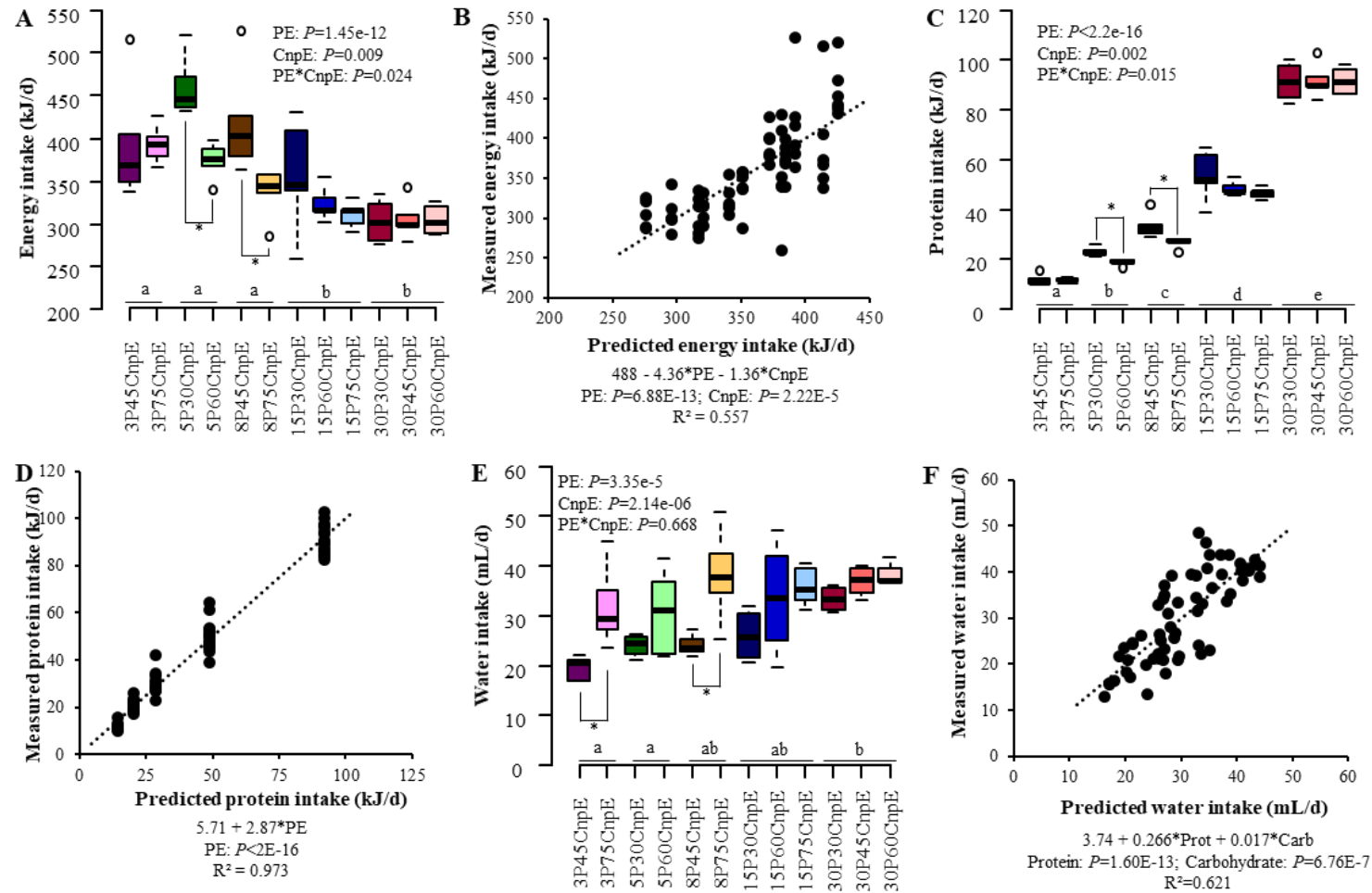
affected by the PE ratio, the CnpE ratio having only a marginal effect in 5P and 8P fed rats (**Figure 1C**). In a stepwise regression analysis, the model including only the PE ratio as predictors of protein intake ($R^2=0.97$; **Figure 1D**) was not improved by the addition of the CnpE ratio ($R^2=0.98$). Water intake was affected by both the PE and CnpE ratios (**Figures 1E**), being larger with high PE and high CnpE ratios, i.e. when the protein and carbohydrates contents of the diets were higher. Stepwise regression analysis also showed that the combination of protein and carbohydrate intakes best predicted water intake ($R^2=0.62$; **Figures 1F**) and that catabolism of protein required 15 times more water than that of carbohydrates (0.266 ml/kJ vs 0.017 mL/kJ).

Table 2. Body weight and composition in response to PE and CnpE ratios.

Values are mean $\pm$ SEMs, $n=5-6$, 3 wks. 1 P for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different ($P \leq 0.05$). CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.

	3P45Cnp (n=6)	3P75Cnp (n=6)	5P30Cnp (n=6)	5P60Cnp (n=6)	8P45Cnp (n=6)	8P75Cnp (n=6)	15P30Cnp (n=6)	15P60Cnp (n=6)	15P75Cnp (n=5)	30P30Cnp (n=6)	30P45Cnp (n=6)	30P60Cnp (n=5)	P^1		
													PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Initial body weight (g)	261 ± 5.37	266 ± 3.04	269 ± 4.32	275 ± 4.55	267 ± 5.81	276 ± 3.33	274 ± 3.49	271 ± 8.29	272 ± 2.83	273 ± 3.39	263 ± 6.85	266 ± 4.52	0.510	0.380	0.780
Final body weight (g)	251 ^a ± 5.41	257 ^a ± 4.59	300 ^b ± 9.03	297 ^b ± 4.51	319 ^b ± 6.37	314 ^b ± 8.39	365 ^c ± 6.31	359 ^c ± 10.7	353 ^c ± 3.29	356 ^c ± 5.65	355 ^c ± 5.46	344 ^c ± 7.85	<2.00E-16	0.630	0.720
Body weight gain (g)	-9.70 ^a ± 4.90	-8.38 ^a ± 3.39	31.1 ^b ± 5.27	22.0 ^b ± 3.97	52.1 ^c ± 3.70	38.1 ^c ± 6.61	90.6 ^d ± 5.03	87.3 ^d ± 3.39	81.8 ^d ± 3.36	83.6 ^d ± 5.00	91.8 ^d ± 5.20	77.8 ^d ± 4.18	<2.00E-16	0.133	0.438
Lean body mass (g)	219 ^a ± 3.22	225 ^a ± 4.76	253 ^b ± 7.11	255 ^b ± 3.73	276 ^c ± 5.65	273 ^c ± 5.52	308 ^d ± 6.98	306 ^d ± 8.83	307 ^d ± 2.88	314 ^d ± 5.67	311 ^d ± 5.11	300 ^d ± 6.52	<2.00E-16	0.750	0.599
Lean body mass gain (g)	-23.4 ^a ± 3.57	-18.8 ^a ± 5.42	11.8 ^b ± 8.02	14.2 ^b ± 4.29	36.5 ^{bc} ± 6.23	32.7 ^{bc} ± 6.27	68.4 ^d ± 7.62	66.5 ^d ± 10.1	67.4 ^d ± 3.00	73.7 ^d ± 6.73	72.0 ^d ± 6.51	59.6 ^{cd} ± 6.52	<10 ⁻¹⁵	0.807	0.612
Total white adipose tissue (g)	21.1 ^a ± 2.52	21.5 ^a ± 1.59	35.3 ^{bc} ± 2.97	29.7 ^{bc} ± 1.71	29.5 ^{ba} ± 2.06	28.2 ^{ba} ± 4.03	43.1 ^c ± 4.95	38.8 ^c ± 3.15	32.6 ^c ± 1.76	29.2 ^b ± 1.31	30.4 ^b ± 2.12	31.5 ^b ± 1.93	1.11E-4	0.302	0.388
Adipose tissue gain (g)	6.45 ^a ± 2.77	8.05 ^{ab} ± 1.13	20.6 ^{bcd} ± 3.26	15.0 ^{ac} ± 1.87	14.8 ^a ± 2.26	13.5 ^{ac} ± 4.42	28.4 ^d ± 5.43	24.0 ^{cd} ± 3.46	17.9 ^{ad} ± 1.77	14.5 ^{ac} ± 1.44	15.0 ^{ad} ± 2.46	16.8 ^{ad} ± 1.94	1.57E-4	0.190	0.346
Energy retained in the body (kJ)	30.1 ^a ± 111	117 ^{ab} ± 41.6	752 ^c ± 143	590 ^{bc} ± 73.1	752 ^c ± 93.8	685 ^c ± 170	1435 ^d ± 156	1280 ^d ± 156	1090 ^{cd} ± 58.7	1016 ^{cd} ± 50.8	1065 ^{cd} ± 88.4	993 ^{cd} ± 101	<10 ⁻¹³	0.276	0.560
Adiposity (% of body weight)	8.35 ^a ± 0.833	8.37 ^a ± 0.651	11.7 ^b ± 0.809	9.98 ^b ± 0.509	9.21 ^{ab} ± 0.569	8.88 ^{ab} ± 1.12	11.8 ^b ± 1.30	10.8 ^b ± 0.688	9.23 ^b ± 0.463	8.21 ^a ± 0.425	8.57 ^a ± 0.592	9.12 ^a ± 0.434	0.016	0.249	0.300
Sub-cutaneous fat mass (% of total fat mass)	47.0 ^{ab} ± 1.50	53.4 ^{ab} ± 4.58	47.9 ^{ab} ± 1.08	49.8 ^{ab} ± 0.776	50.6 ^a ± 1.04	52.4 ^a ± 3.42	42.9 ^b ± 1.19	44.8 ^b ± 1.38	50.5 ^b ± 2.02	46.8 ^b ± 1.66	48.3 ^b ± 1.80	45.2 ^b ± 1.57	0.025	0.027	0.667
Visceral fat mass (% of total fat mass)	18.2 ^a ± 0.792	16.9 ^a ± 0.640	16.7 ^{ab} ± 0.680	16.7 ^{ab} ± 0.413	15.9 ^b ± 0.524	15.9 ^b ± 0.603	15.6 ^b ± 0.761	14.2 ^b ± 0.677	15.3 ^b ± 0.502	16.0 ^{ab} ± 1.68	16.2 ^{ab} ± 1.15	15.1 ^{ab} ± 1.24	0.019	0.226	0.825
Total brown adipose tissue (g)	0.647 ^a ± 0.072	0.672 ^a ± 0.059	0.870 ^b ± 0.102	0.798 ^b ± 0.063	0.692 ^a ± 0.064	0.421 ^a ± 0.056	0.640 ^a ± 0.060	0.564 ^a ± 0.040	0.542 ^a ± 0.029	0.514 ^a ± 0.023	0.550 ^a ± 0.037	0.494 ^a ± 0.55	5.57E-6	0.073	0.167

Figure 1. Energy, protein and water intake in response to PE and CnpE ratios. A, C and E: PE and CnpE ratios effects tested by ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). B, D and F: predictive values determined by stepwise regression and prediction quality tested by Pearson correlation test. n=5-6, 3 wks. CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.

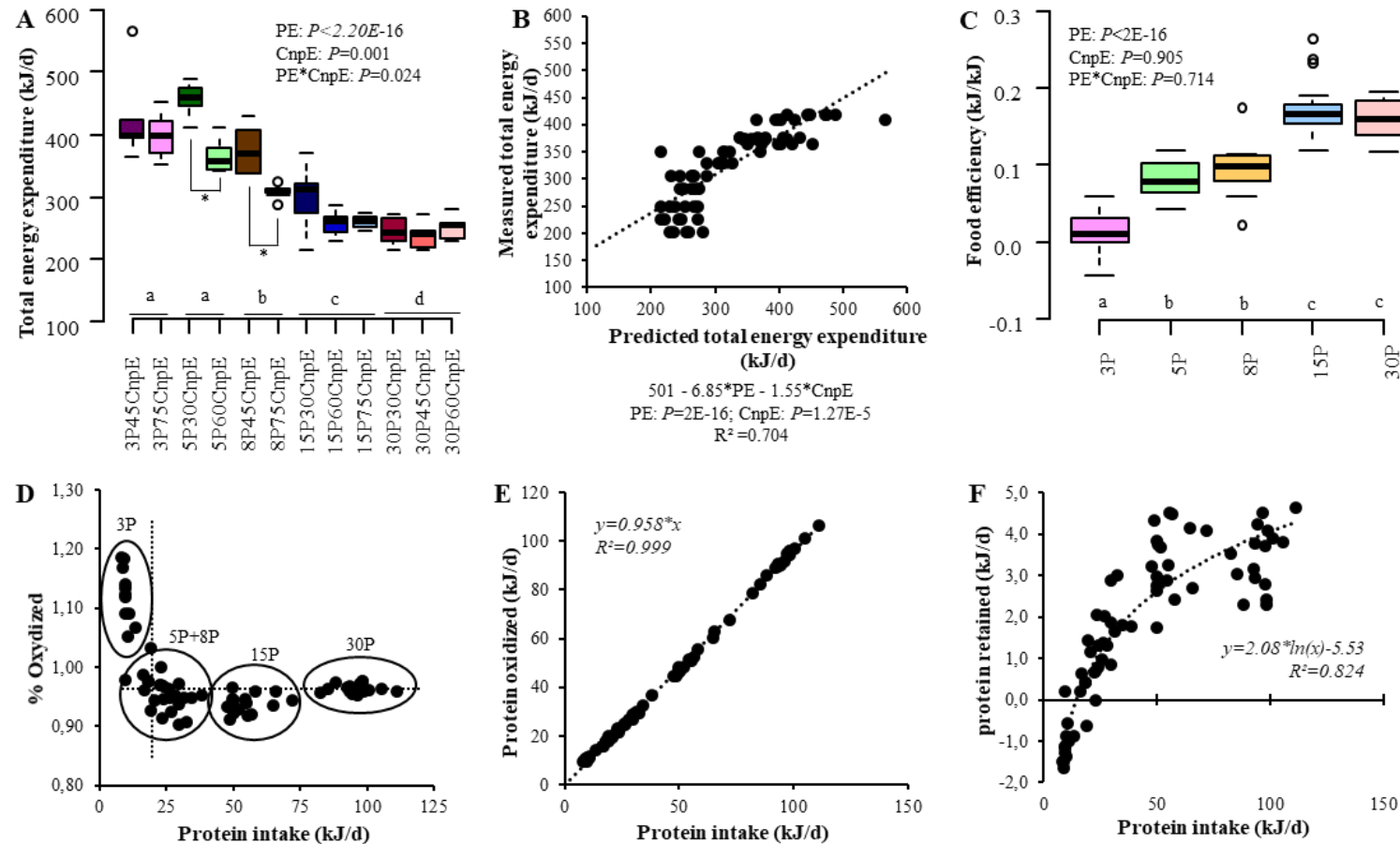


Energy expenditure, food efficiency and protein oxidation

TEE was larger in rats fed the low-protein diets, especially in the groups fed the 3P and 5P diets, and was also affected by the CnpE ratio (**Figure 2A**). Stepwise regression analysis showed that use of both the PE and CnpE ratios more accurately predicted TEE ($R^2=0.70$; **Figure 2B**) than the PE ratio alone ($R^2=0.60$). Food efficiency was affected by the PE ratio only and was significantly lower in 5P and 8P fed rats than in 15P and 30P fed ones and further reduced to zero, in 3P fed rats (**Figure 2C**).

Pox amounted 94 to 96% of protein intake in 5P, 8P, 15P and 30P fed rats and was larger than protein intake in 3P fed rats (**Figure 2D**), meaning that, as testified by the negative gain in LBM, the 3P fed rats had to mobilize their protein stores to survive. In the 5P and 8P fed rats, the high proportion of dietary protein that was oxidized (~95%) occurred at the expense of protein deposition since in these rats, the amount of protein retained in the body was significantly lower than in 15P and 30P fed rats. All groups taken together, Pox increased as a linear function of protein intake (**Figure 2E**), and protein retained in the body as a log function of protein intake (**Figure 2F**).

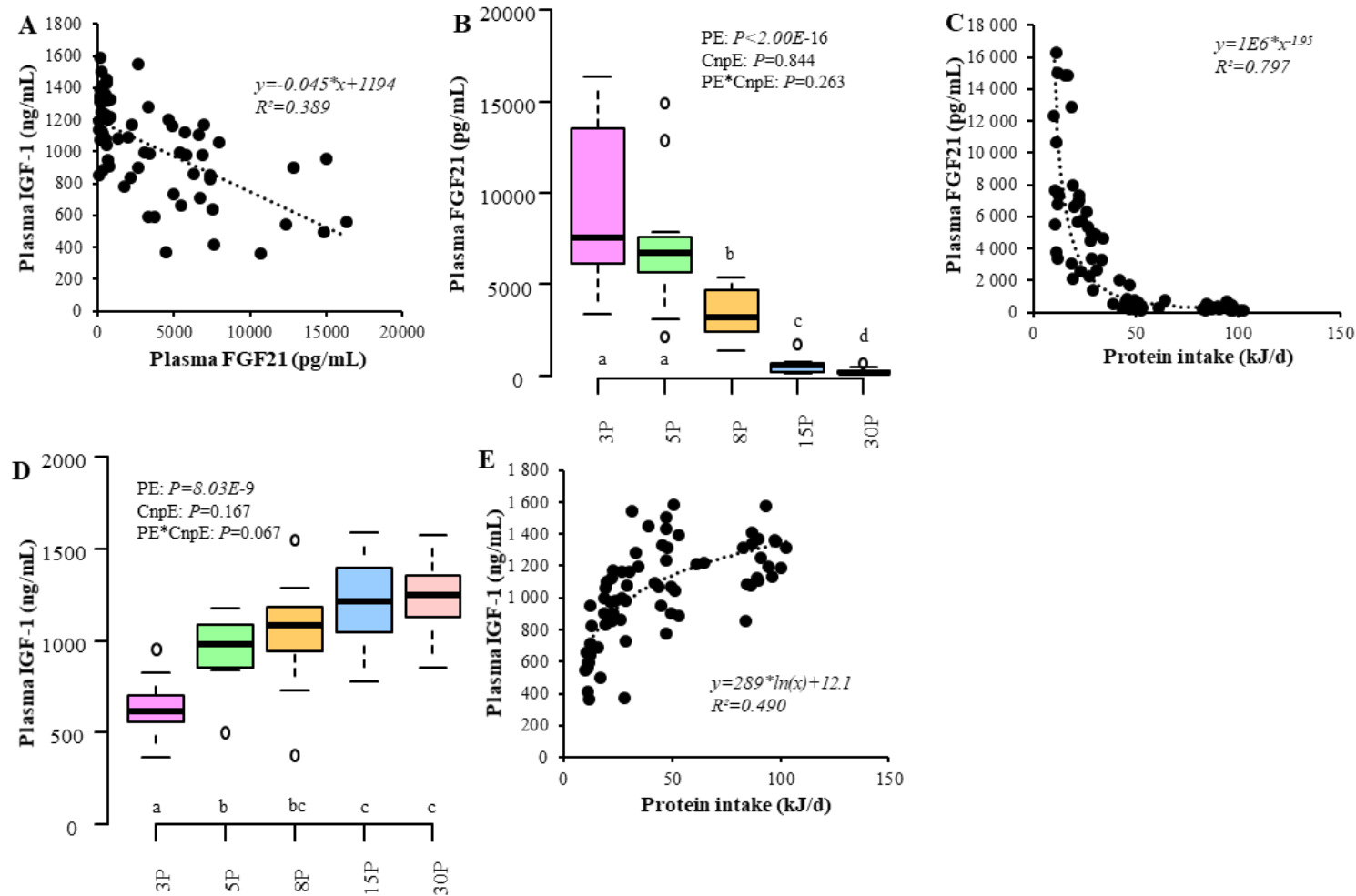
Figure 2. Energy expenditure, food efficiency and protein balance in response to PE and CnpE ratios. A and C: PE and CnpE ratios effects tested by ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). B: predictive values determined by stepwise regression and prediction quality tested by Pearson correlation test. D, E and F: correlation by Pearson test. $n=5-6$, 3 wks. CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.



FGF21 and IGF-1

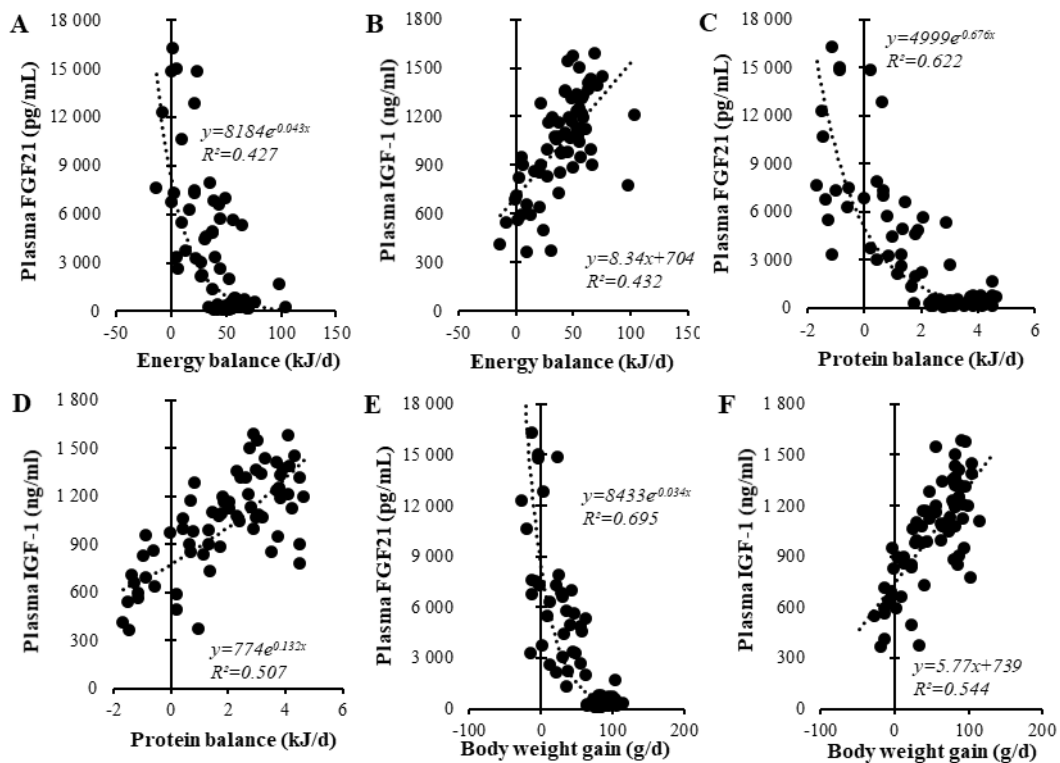
Plasma FGF21 and IGF-1 concentrations appeared fairly tightly correlated (**Figure 3A**). Plasma FGF21 concentrations responded to the PE ratio but not to the CnpE ratio (**Figure 3B**). Accordingly, plasma FGF21 correlated with dietary protein intake. The relation was best described by a power function indicating that FGF21 increased slowly when dietary protein intake decreased from 100 to 40 kJ, then sharply when the protein intake decreased below 40kJ (**Figure 3C**). Plasma IGF-1 concentrations responded also only to the PE ratio (**Figure 3D**). The relation between plasma IGF-1 concentrations and dietary protein intake was best described by a Log function (**Figure 3E**) indicating that IGF-1 decreased abruptly when protein intake decreased below 20 kJ, i.e. in the P3 group.

Figure 3. Plasma FGF21 and IGF-1 concentrations in response to PE and CnpE ratios. A, C and E: correlation by Pearson test. B and D: PE and CnpE ratios effects tested by ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). $n=5-6$, 3 wks. CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.



Plasma FGF21 and IGF-1 correlated with energy (**Figures 4A and B**), protein balance (**Figures 4C and D**), body weight gain (**Figure 4E and F**) and LBM (**Supplementary Figure 1**). They did not correlate with total fat mass and adiposity (**Supplementary Figure 1**).

Figure 4. Plasma FGF21 and IGF-1 concentrations as a function of energy balance, protein balance and body weight gain. Analysis done by Pearson correlation test. Predictive values determined by stepwise regression and prediction quality tested by Pearson correlation test. $n=5-6$, 3 wks.



Plasma parameters

Blood glucose and plasma HDL concentrations were not affected by the various diets, but plasma NEFA, albumin, insulin and the HOMA index decreased as the PE ratio decreased (**Table 3**). Plasma cholesterol was mildly affected by the CnpE ratio (**Table 3**), but no clear relation between the CnpE ratio and plasma cholesterol emerged. Plasma TG concentrations were the only parameters that were affected by both PE and CnpE ratios (**Table 3**), the effect of the PE ratio being however much stronger than the effect of the CnpE ratio: TG increased as the PE ratio increased but in the 30P and 15P fed rats, the increase was reduced when the CnpE ratio was low. Plasma TG correlated also positively with FGF21 ($R^2=0.16$, $P=0.001$) et negatively but poorly with IGF-1 ($R^2=-0.07$, $P=0.040$).

Table 3. Plasma and liver parameters in response to PE and CnpE ratios.

Values are mean $\pm$ SEMs, n=5-6, 3 wks. 1 P for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different ($P \leq 0.05$). CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; HOMA-IR: Homeostatic model assessment of insulin resistance; NEFA: Non-esterified fatty acids; PE ratio: Protein-to-energy ratio; TG: Triglycerides.

	3P45Cnp (n=6)	3P75Cnp (n=6)	5P30Cnp (n=6)	5P60Cnp (n=6)	8P45Cnp (n=6)	8P75Cnp (n=6)	15P30Cnp (n=6)	15P60Cnp (n=6)	15P75Cnp (n=5)	30P30Cnp (n=6)	30P45Cnp (n=6)	30P60Cnp (n=5)	P ⁱ		
													PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Plasma															
Insulin (pmol/L)	0.393 ^a ±0.117	0.298 ^a ±0.063	0.493 ^a ±0.087	0.382 ^a ±0.070	0.538 ^{ab} ±0.069	0.552 ^{ab} ±0.126	1.05b ^c ±0.154	0.945b ^c ±0.117	0.926b ^c ±0.282	0.636 ^{bc} ±0.104	0.846 ^{bc} ±0.074	0.873 ^{bc} ±0.138	6.56E-7	0.801	0.589
Glucose (mmol/L)	6.68 ±0.366	6.46 ±0.176	6.98 ±0.365	6.57 ±0.285	6.35 ±0.269	6.48 ±0.289	6.85 ±0.286	6.88 ±0.414	5.93 ±0.360	6.39 ±0.246	6.48 ±0.343	6.41 ±0.139	0.687	0.332	0.495
HOMA-IR index	1.18 ^a ±0.375	0.805 ^a ±0.153	1.46 ^{ab} ±0.286	1.06 ^{ab} ±0.196	1.46 ^{ab} ±0.199	1.54 ^{ab} ±0.385	3.05 ^c ±0.492	2.91 ^c ±0.548	2.40 ^c ±0.863	1.76 ^{bc} ±0.321	2.28 ^{bc} ±0.258	2.37 ^{bc} ±0.360	9.37E-6	0.664	0.528
Cholesterol (mmol/L)	1.80 ^b ±0.156	2.16 ^{ab} ±0.096	2.10 ^{ab} ±0.064	2.31 ^a ±0.080	2.00 ^b ±0.111	1.99 ^{ab} ±0.130	2.11 ^{ab} ±0.129	2.21 ^a ±0.107	2.27 ^{ab} ±0.124	2.04 ^{ab} ±0.142	1.96 ^b ±0.128	2.49 ^a ±0.248	0.866	0.031	0.298
HDL (mmol/L)	1.04 ±0.147	1.24 ±0.089	1.26 ±0.050	1.43 ±0.059	1.29 ±0.068	1.20 ±0.122	1.40 ±0.079	1.32 ±0.039	1.30 ±0.069	1.36 ±0.094	1.32 ±0.110	1.51 ±0.127	0.459	0.475	0.286
NEFA (mmol/L)	0.395 ^a ±0.088	0.448 ^a ±0.077	0.562 ^a ±0.037	0.423 ^a ±0.081	0.493 ^{ab} ±0.056	0.650 ^{ab} ±0.076	0.660 ^b ±0.063	0.710 ^b ±0.142	0.774 ^b ±0.081	0.560 ^{ab} ±0.092	0.484 ^{ab} ±0.046	0.700 ^{ab} ±0.107	0.013	0.277	0.410
Albumin (g/L)	33.4 ^a ±0.990	32.1 ^a ±0.413	34.0 ^{ab} ±0.563	33.6 ^{ab} ±0.461	34.5 ^{bc} ±0.548	34.2 ^{bc} ±0.599	36.5 ^d ±0.480	35.6 ^d ±0.206	35.8 ^d ±0.391	35.1 ^{cd} ±0.574	35.6 ^{cd} ±0.318	36.3 ^{cd} ±0.798	1.73E-7	0.598	0.331
TG (mmol/L)	0.683 ^a ±0.100	0.745 ^a ±0.148	0.830 ^{ab} ±0.080	0.850 ^{ab} ±0.165	0.700 ^a ±0.083	1.34 ^{ab} ±0.357	1.08 ^{ab} ±0.146	1.57 ^{ab} ±0.310	1.94 ^b ±0.301	0.797 ^{ab} ±0.086	1.07 ^{ab} ±0.170	1.63 ^{ab} ±0.285	3.70E-4	0.028	0.150
Liver															
TG (mg/g)	2.42 ^{ab} ±0.331	0.979 ^d ±0.109	2.83 ^{ab} ±0.480	1.13 ^{cd} ±0.112	2.46 ^{ab} ±0.264	1.01 ^{cd} ±0.076	3.05 ^a ±0.186	1.97 ^{abc} ±0.232	1.43 ^{bcd} ±0.131	2.51 ^{ab} ±0.259	2.42 ^{ab} ±0.259	2.30 ^{ab} ±0.366	0.041	6.56E-11	0.057

Liver triglycerides

In contrast to plasma TGs, which were mainly affected by the PE ratio, liver TGs were affected almost exclusively by the CnpE ratio, and increased when the CnpE ratio decreased (**Table 3**). In opposition to FGF21, liver TGs correlated negatively with plasma FGF21 ($R^2=0.10$, $P=0.007$) and positively correlated with plasma IGF-1 ($R^2=0.15$, $P=0.001$), but liver and plasma TGs did not correlate ($R^2=-0.01$, $P=0.480$).

Gene expression

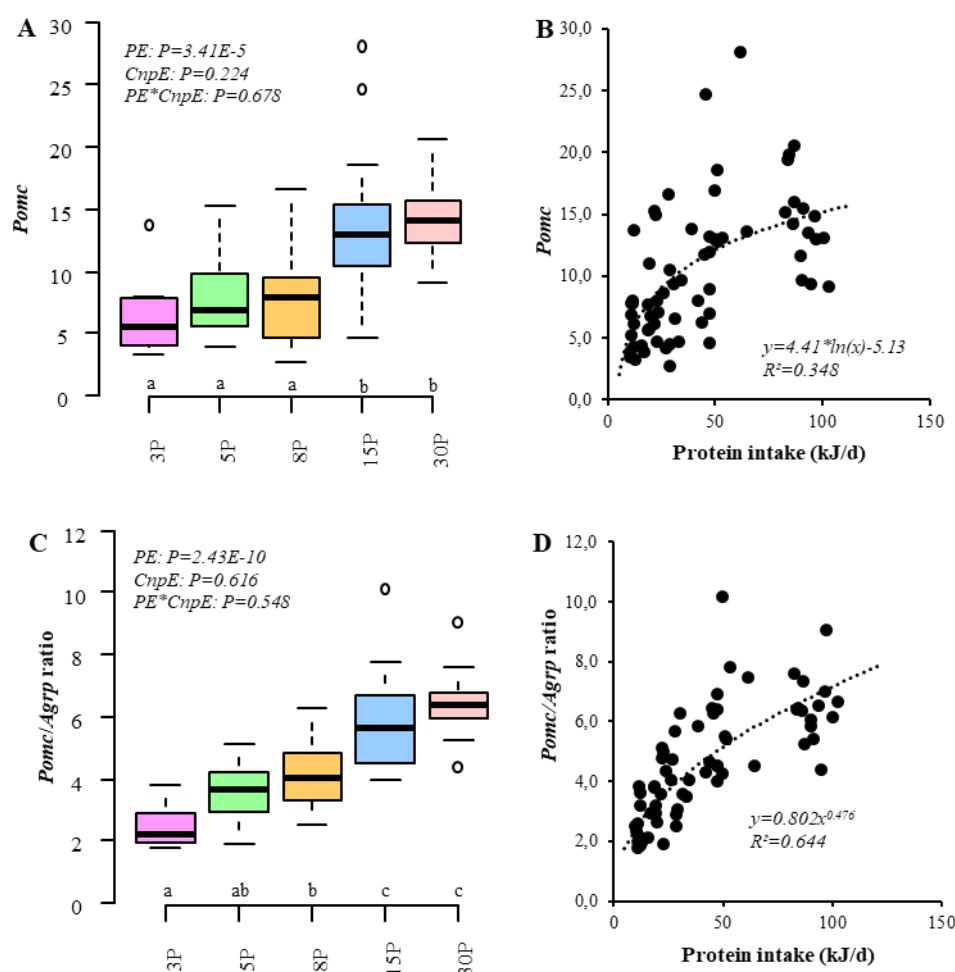
In the liver, Fgf21 and Igf-1 expressions were affected only by the dietary PE ratio (**Table 4**) and correlated with their plasma values (Fgf21: $R^2=0.35$, $P=8.84e-6$; Igf-1: $R^2=0.21$, $P=1.39e-4$). Fas expression tended to be higher in low-protein fed rats. Cpt1 expression was affected by the PE ratio, and to a lesser extent by the interaction between the PE and CnpE ratios (**Table 4**). Finally, the expression of Acca, Lpk and Gk were insensitive to the dietary PE and CnpE ratios (Data not shown).

Table 4. Gene expression vs. 18S in liver (Fgf21, Igf-1, Fas and Cpt1) in response to PE and CnpE ratios. Values are mean $\pm$ SEMs, n=5-6, 3 wks. 1 P for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different ($P \leq 0.05$). CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.

	3P45Cnp (n=6)	3P75Cnp (n=6)	5P30Cnp (n=6)	5P60Cnp (n=6)	8P45Cnp (n=6)	8P75Cnp (n=6)	15P30Cnp (n=6)	15P60Cnp (n=6)	15P75Cnp (n=5)	30P30Cnp (n=6)	30P45Cnp (n=6)	30P60Cnp (n=5)	P ¹		
													PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Fgf21	2.59 ^a ± 0.666	2.48 ^a ± 0.491	2.19 ^{ab} ± 1.04	1.71 ^{ab} ± 0.550	0.859 ^b ± 0.189	0.451 ^b ± 0.090	0.153 ^c ± 0.082	0.069 ^c ± 0.033	0.069 ^c ± 0.010	0.026 ^d ± 0.005	0.040 ^d ± 0.019	0.037 ^d ± 0.008	2.00E-16	0.717	0.313
Igf-1	0.540 ^a ± 0.067	0.598 ^a ± 0.116	0.824 ^{ab} ± 0.155	0.820 ^{ab} ± 0.098	0.941 ^{bc} ± 0.074	1.09 ^{bc} ± 0.081	1.90 ^{cd} ± 0.317	1.11 ^{cd} ± 0.085	1.35 ^{cd} ± 0.137	2.19 ^d ± 0.338	1.86 ^d ± 0.550	1.44 ^d ± 0.118	2.63E-11	0.092	0.404
Fas	5.94 ^a ± 1.40	5.64 ^a ± 2.19	3.73 ^{ab} ± 0.471	4.67 ^{ab} ± 1.36	3.84 ^{ab} ± 0.826	2.32 ^{ab} ± 0.746	3.39 ^b ± 0.990	1.95 ^b ± 0.589	1.30 ^b ± 0.398	1.81 ^{ab} ± 0.460	4.93 ^{ab} ± 1.34	3.12 ^{ab} ± 1.26	0.012	0.115	0.199
Cpt1	3.96 ^a ± 0.805	4.55 ^a ± 0.591	3.96 ^a ± 0.537	4.90 ^a ± 0.797	2.42 ^{ab} ± 0.477	3.34 ^a ± 0.508	2.25 ^{ab} ± 0.427	1.52 ^b ± 0.097	3.37 ^a ± 0.670	2.83 ^{ab} ± 0.381	3.92 ^a ± 1.44	2.39 ^{ab} ± 0.125	5.03E-6	0.006	0.553

In the hypothalamus, it was notable that the expression of Fgf21, and of the FGF21 receptor genes (Fgf21r1, Fgf21r2b, Fgf21r2c and Fgf21r3) were not modified by the diets (Data not shown). Only Pomc expression was affected significantly by the diet, and especially by the PE ratio (**Figure 5A**). Cart, Agrp and Npy expressions were unaffected by the PE and CnpE ratios (Data not shown). Because Pomc and Cart expressions on the one hand, and Agrp and Npy expressions on the other hand are considered closely related, we also investigated whether various combinations of the expression of these neurotransmitters were affected by the diet. We observed that although Agrp expression was not at all correlated with the PE ratio ($R^2=0.002$), the Pomc/Agrp ratio was much better correlated with the PE ratio ($R^2=0.64$; **Figure 5C and D**) than Pomc expression alone ($R^2=0.35$, **Figure 5B**) suggesting that the Pomc/Agrp ratio conveyed to the hypothalamus a more precise information on the dietary PE ratio than Pomc alone.

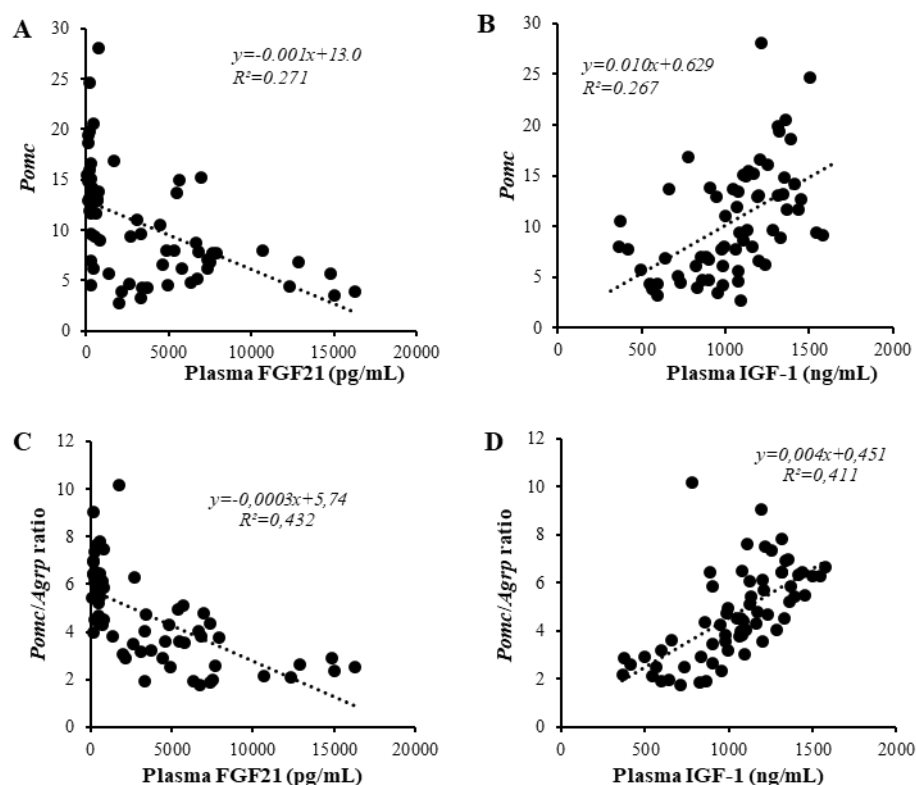
Figure 5. Gene expression vs. RPL13 in hypothalamus (Pomc, and Pomc/AgRP ratio) in response to PE and CnpE ratios. A, and C: PE and CnpE ratios effects tested by ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). B and D: correlation with PE ratio tested by Pearson correlation test. $n=5-6$, 3 wks. CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.



We investigated also if Npy, AgRP, Pomc and Cart expressions were correlated with plasma FGF21 and IGF-1 concentrations. Only Pomc was correlated to both FGF21 and IGF-1 (**Figure 6A and B**), and we also observed that the Pomc/AgRP ratios was well correlated with FGF21 and IGF-1 (**Figure 6C and D**). These results suggested that FGF21 and IGF-1 in plasma and Pomc and Pomc/AgRP ratio in the brain conveyed the information of the dietary PE ratio.

Finally, in the NAcc, there was no difference between groups regarding the expression of Dr1, Dr2, Dor and Kor (Data not shown). In the IBAT, there was no difference between groups regarding the expressions of Ucp1, Ucp2 and Ucp3 (Data not shown).

Figure 6. Gene expression vs. RPL13 in hypothalamus (Pomc and Pomc/Agrp ratio) as a function of plasma FGF21 and IGF-1 concentrations. Analysis done by Pearson correlation test. Predictive values determined by stepwise regression and prediction quality tested by Pearson correlation test. n=5-6, 3 wks.



Discussion

The main result of this study was that long-term regulation of plasma FGF21 concentration depends exclusively on the dietary protein level and that this is also true for the regulation of plasma IGF-1 concentration. Most of the parameters of body composition and energy expenditure were affected also by the dietary protein content only, except for energy and water intake which were affected by a combination of dietary protein and carbohydrate content. In the hypothalamus, Pomc expression and with more significance the Pomc/Agrp ratio were the parameters most responsive to dietary protein content.

Effects of the low-protein diets on body composition, protein oxidation, energy expenditure and food efficiency

Analysis of body composition showed that all organs and tissues were affected by the dietary protein level, and none of them, including fat mass were affected by the CnpE ratio, with the exception of subcutaneous fat mass, which was however only slightly impacted by the CnpE ratio. Body weight, weight of most of the lean tissues and overall LBM were reduced significantly in rats fed the 3P, 5P and 8P diets, and were similar in 15P and 30P fed rats. Fat mass did not exhibit a progressive decrease in

relation to the decrease in the dietary protein content as observed for the other organs, but did not change significantly from 5P to 30P diets and was noticeably decreased only in rats fed the 3P. The evolution of fat mass and LBM led to the fact that the differences in adiposity between the groups finally proved to be limited and were not correlated with the dietary PE ratio. Weight of IBAT was increased also in 3P and 5P fed rats. Taken together these results showed that the weight of the lean tissues decreased rapidly as the dietary protein level was decreased below the requirement that in this study appeared to be between 15% and 8%. The lack of effect of the CnpE ratio on the majority of body composition parameters was probably due to it being hidden by the stronger effects of protein levels.

Surprisingly, we observed that the 8P and 5P fed rats continued to oxidize up to 95% of their dietary protein intake rather than preserving the dietary proteins to sustain growth. This result suggests strongly that protein oxidation plays a very important regulatory function in the metabolic fate of energy substrates, so strong that the rats apparently preferred to sacrifice growth of lean tissues rather than to reduce the participation of amino acids in energy production. This result raises an important question, because it shows that, behind the apparent capacity of rats and other living organisms to deal with a large variability in dietary protein levels, the role of protein in the regulation of substrate fluxes to provide energy is very important and is preserved even at the cost of growth. The optimal protein intake has been suggested to be around 15%, but in this study, even if the 15P fed rats had the highest growth rate, they also tended to be fatter than the 30P fed ones, suggesting that 30% protein would be a better level than 15% to sustain growth with an optimal ratio of LBM to fat deposition. The lower adiposity level of the 30P fed rats may have resulted from the fact that high dietary protein levels increase postprandial lipid oxidation (Petzke, Riese, et Klaus 2007) and therefore may reduce the retention of lipids in adipose tissues. Accordingly, in self-selecting rats, many studies have reported that rats prefer to select a diet in which proteins amount for around 30% of energy, and sometimes more (Even, Gehring, et Tomé 2021). Therefore, this study has shown that decreasing dietary protein levels below 15% rapidly slows growth rate, indicating that 15% dietary protein is close to the lowest acceptable level. Finally, the decrease in tail weight in proportion to the dietary protein level also testified to the essentiality of protein intake to sustain bone growth (McNulty et al. 2020).

In this study, we observed a significant increase in TEE and a decrease in food efficiency in low-protein fed rats, that is considered as a metabolic response induced by the increase in plasma FGF21 concentrations (Owen et al. 2014; Markan et al. 2014; Laeger et al. 2016; Cuevas-Ramos et Aguilar-Salinas 2017). We report here also that food efficiency was reduced by a half in 8P and 5P fed rats, by 80% in 3P fed ones, and was similar in 15P and 30P fed rats. As described in the method section, these calculations assumed that digestible energy was not affected by the protein level of the diet. However, one author, Pezeshki et al. who, to our knowledge was the only one to compare as large differences in dietary protein levels as those used in this study, reported that, compared to 15P fed rats, digestible energy was unaffected in 10P fed rats, but reduced by ~10% in 5P fed rats and up to 40% in rats fed a

protein-free diet (Pezeshki et al. 2016). Therefore, it is possible that in this study feed efficiency was larger than estimated, in particular in P3-fed rats, but given the very low amount of energy retained in the body by the 3P fed rats (on the average less than 11% of the energy retained by the 5P fed rats and 6% of the energy retained by the 15P fed ones (**Table 2**)), this limitation does not negate the fact that feed efficiency was reduced in proportion to the reduction in protein intake.

Food efficiency was not affected by the dietary CnpE ratio in all groups, which contradicts the repeated observation that food efficiency is increased by high fats diets, a mechanism largely suspected to be responsible for the increase in fat mass and adiposity in high-fat fed subjects (Dulloo et al. 1995; Héliès et al. 2005). This difference remains to be understood, but it is possible that the reduced food efficiency induced already by the decrease in the protein content prevailed over a possible CnpE ratio effect and was part of a general adaptation that allowed these rats to increase energy intake without gaining in adiposity. In the rats of this study, TEE and food efficiency were also measured by indirect calorimetry, but in conditions of thermal neutrality (27°C) in order to assess the role played by the cost of thermal regulation in the increase in energy expenditure observed with the decrease in dietary protein. Accordingly, energy intake and TEE values measured during indirect calorimetry were on the average ~25% lower than computed from energy balance but confirmed the results by energy balance that TEE was increased and feed efficiency decreased in the P3 and P5 fed rats. These results will be the subject of a specific paper being prepared describing which component(s) of energy expenditure (thermal regulation, intensity and cost of activity, thermogenic response to feeding) sustain the increase in energy expenditure in low-protein fed rats.

Roles of dietary protein and carbohydrate on FGF21 and IGF-1

One important question to which this study wanted to answer was to decipher the specific roles of the dietary protein and carbohydrate levels on the long-term regulation of plasma concentrations of FGF21 and IGF-1. For both hormones, the response is clearly that their plasma concentrations respond exclusively to changes in the dietary PE ratio and protein intake. Plasma FGF21 concentrations increased abruptly when the PE ratio and protein intake decreased below a threshold level somewhere between 15% and 8% while IGF-1 concentrations increased from 3 to 15% dietary protein, then levelled from 15 to 30%. As a result of these symmetrical changes, it appeared that plasma FGF21 and IGF-1 concentrations were fairly closely correlated, suggesting that the mechanisms controlling the secretion of these 2 hormones are linked. One possibility suggested by Inagaki et al. (2008) may be that FGF21 inhibits growth hormone signalling by increasing resistance to Growth Hormone (GH), and thus that FGF21 reduces serum IGF-1 by reducing IGF-1 mRNA expression in the liver. As a result, when the evolution of one or another of the studied parameters was correlated with one of the hormones, it was also correlated with the other, and therefore it was not possible to decide which was the hormone that could be suspected to affect this parameter.

That FGF21 is the signal of protein deprivation is now widely accepted, but FGF21 was shown also to respond to various other metabolic signals such as food restriction (Hollstein et al. 2020), cold (Hollstein et al. 2020), lipolysis (Lee et al. 2013), exercise and others (Staiger et al. 2017). FGF21 increases energy expenditure, stimulates food intake and a specific appetite for protein, and improves glucose tolerance and insulin sensitivity in the liver and adipose tissue. In this study, plasma FGF21 concentrations were increased impressively in 8P, 5P and 3P fed rats, but none of these groups were influenced by the CnpE ratio. This result enters into a conflict with previous reports that showed that FGF21 responds to glucose or fructose ingestion, and also to conclusions of the study by Solon-Biet et al. (2016) that FGF21 responds more strongly to a low dietary protein intake when it is coupled with a high carbohydrate intake. One main reason for the lack of significant effects of carbohydrate in this study is certainly related to fact that, if carbohydrate intake can indeed increase FGF21 concentrations, the FGF21 response to carbohydrate intake is an order magnitude much smaller than the response to low-protein diets. Lundsgaard et al. (2017) reported that excess carbohydrate intake induced an 8-fold increase of plasma FGF21, while the response to low-protein diets observed in this study and others corresponded to at least a 100-fold increase of plasma FGF21. It must be noticed also that changes in plasma FGF21 in response to carbohydrate intake have always been measured in the short-term, and therefore, that no study has reported long-term changes in plasma FGF21 specifically related to changes in the dietary carbohydrate content (BonDurant et al. 2017; von Holstein-Rathlou et al. 2016; Dushay et al. 2015; Adams et Gimeno 2016; Lin et al. 2012; Vienberg et al. 2017). Therefore, it is not surprising that in conditions where both dietary protein and carbohydrate levels are modified, the long-term effects of carbohydrates do not appear significant because they are hidden by the much stronger effect of proteins. On the other hand, while it is clear that protein deprivation induces a strong increase in the appetite for protein, carbohydrate deprivation does not induce such a response (DiBattista 1991) but at best, as described by Raubenheimer and Simpson (1997), a mild attempt to eat carbohydrate when possible. Thus there is little evidence that carbohydrate intake is necessary per se, or that carbohydrate restriction promotes a specific appetite for carbohydrate (DiBattista 1991). In contrast to fat and carbohydrate, there is a large and growing literature that demonstrates clearly that animals selectively detect and adaptively respond to the restriction of dietary protein and that FGF21 is strongly involved in this response (David Raubenheimer et Simpson 2019; Morrison, Reed, et Henagan 2012; Berthoud et al. 2012).

FGF21 acts centrally to induce the expression of thermogenic genes via activation of the sympathetic nervous system, as reported by Owen et al. (2014), and the FGF21 action requires corticotropin-releasing factor (CRF). They proposed that CRF stimulates sympathetic nerve activity which in turn induces Ucp1 expression and lipolysis in IBAT. In this study we found that IBAT weight was slightly larger in low-protein fed rats but observed no differences in Ucp1 expression in IBAT between groups despite extremely large increases in plasma FGF21 in the low-protein fed rats. This result indicates that

in this study the increase in TEE was probably not resulting from an increased heat release in the IBAT. The differences between Owen's study and our results may be related to the species (rat vs mouse), or to the fact that, in the Owen study, the increased expression of Ucp1 in IBAT was observed after plasma FGF21 concentrations were increased by two weeks of osmotic pump infusion, whereas in our study, plasma FGF21 concentrations were increased more physiologically by 2 to 3 weeks of low-protein feeding.

Concerning IGF-1, we observed that the plasma concentrations of this hormone were inversely correlated to the plasma concentrations of FGF21 and therefore, logically increased exclusively in response to the decrease in protein intake. Therefore, in the studies that reported that IGF-1 was reduced in food restricted rats (Rahmani et al. 2019; Speakman et Mitchell 2011; Breese, Ingram, et Sonntag 1991), it is possible that the decrease in protein intake resulting from the decrease in energy intake may have been the factor primarily responsible for the decrease in plasma IGF-1 and that IGF-1 responds to the quantity and quality of the nutrient mix as a function of its capacity to promote growth.

Correlation analyses of FGF21 and IGF-1 with the PE ratios and protein intake showed that FGF21 was not much affected as long as protein intake remained above 40 kJ/d (PE ratio $\geq 8\%$) then it increased considerably. In contrast, IGF-1 concentrations increased continuously while protein intake increased from 10 to 40 kJ/d (PE ratio = 3 to 15%) and then levelled out from 40 to 80 kJ/d (PE ratio = 15 to 30%) which fits with the global evolution of body weight, body composition and bone growth. Therefore, if changes in plasma FGF21 and IGF-1 concentrations are correlated, it appears that the threshold at which significant changes in plasma levels are induced by protein intake are different, and higher for FGF21 than for IGF-1. Our interpretation of these results is that IGF-1 would respond to protein content by decrease significantly when protein intake was very low, while FGF21 would respond more early as soon as dietary protein content decreased below 10-15% in order to induce behavioural changes, in particular the motivation to seek out and ingest protein rich diets (Chaumontet et al. 2018; Adams et Gimeno 2016; Talukdar, Owen, et al. 2016).

Energy and protein intake regulation in the hypothalamus

Neurotransmitters analysed in our study (POMC, CART, NPY and AgRP) are important regulators of energy intake (Davidenko et al. 2013; Wen et al. 2018). Both POMC and CART are involved in the inhibition of food intake. NPY is considered one of the most potent neurotransmitters stimulating food intake, but with short-lived effects, in contrast to AgRP which is considered the most robust chronically orexigenic molecule (Schwartz et al. 2000). We observed that Cart, Npy and Agrp expressions were insensitive to the PE and CnpE ratios, a result that contrasted with previous reports (White et al. 1994), including from our group (Chaumontet et al. 2018). In contrast, we observed that Pomc expression was lower in low-protein fed rats. However, it was the Pomc/Agrp ratio that best correlated with the dietary PE ratio. This result shows that the decrease in the dietary protein content, and by extension to protein

intake, was translated into the hypothalamus by a decrease in the expression of Pomc and more finely in the Pomc/Agrp ratio. These results can be interpreted as a relaxation of signals inhibiting energy intake rather than a stimulation of signals stimulating food intake. On the other hand, Pomc expression and the Pomc/Cart ratio were correlated also with the CnpE ratio, which may suggest that a subtle balance in Pomc, Cart, Npy and Agrp expressions modulate the metabolic and behavioural responses to both protein and energy intake in the hypothalamus (Berthoud et al. 2012; Chaumontet et al. 2018).

Because FGF21 and IGF-1 cross the blood-brain barrier to activate neurons in the brainstem and hypothalamus, and to induce responses affecting energy balance and feeding behaviour, we studied also the relation between plasma concentrations of FGF21 and IGF-1 with these brain neurotransmitters. It appeared that Pomc and Pomc/Agrp correlated with both FGF21 and IGF-1, but also correlated with very similar accuracy as testified by the fact that the coefficients of determination were extremely close in all cases, which was not necessarily expected since the coefficients of determination linking FGF21 and IGF-1 were only equal to 0.39. Therefore, we can consider the hypothesis that FGF21 and IGF-1 acted to adjust the Pomc/Agrp/Cart/Npy balance in the hypothalamus in response to protein and energy intake. Consistent with these findings, some authors have shown that FGF21 administration (as a single administration in rats or by infusion for 2 weeks in obese mice) increased food intake in parallel with increased expression of Agrp and Npy (Recinella et al. 2017; Coskun et al. 2008), and decreased expression of Cart and Pomc (Recinella et al. 2017) in the hypothalamus. In addition, one study showed that FGF21-KO mice had higher levels of Pomc expression and lower levels of Agrp expression in the hypothalamus compared with wild-type mice (Badman et al. 2009).

Conclusion

This study used 12 different diets with various protein, carbohydrate and lipid levels, and created a dietary framework that has allowed us to analyse the effects of the dietary protein and carbohydrate contents on several parameters involved in the regulation of energy balance. Most of the organs and tissues and energy expenditure were affected only by the dietary protein content. Plasma FGF21, IGF-1 and hypothalamic Pomc expression and Pomc/Agrp ratios responded also primarily to the dietary protein content. This study has deciphered the specific roles of dietary protein and carbohydrate levels on the long-term regulation of plasma FGF21 concentration.

Acknowledgments

The authors thank Morgane Dufay for her precious help in the maintenance of rats during the study, and Professor S.N. Thornton for assistance with the English.

Reference

- Adams, Andrew C., et Ruth E. Gimeno. 2016. « The Sweetest Thing: Regulation of Macronutrient Preference by FGF21 ». *Cell Metabolism* 23 (2): 227-28. <https://doi.org/10/gfzgz9>.
- Arakawa, Mie, Takayuki Masaki, Junko Nishimura, Masataka Seike, et Hironobu Yoshimatsu. 2011. « The Effects of Branched-Chain Amino Acid Granules on the Accumulation of Tissue Triglycerides and Uncoupling Proteins in Diet-Induced Obese Mice ». *Endocrine Journal* 58 (3): 161-70. <https://doi.org/10/fdzk9d>.
- Arch, J. R. S., D. Hislop, S. J. Y. Wang, et J. R. Speakman. 2006. « Some Mathematical and Technical Issues in the Measurement and Interpretation of Open-Circuit Indirect Calorimetry in Small Animals ». *International Journal of Obesity* 30 (9): 1322-31. <https://doi.org/10/ddk58p>.
- Azzout-Marniche, Dalila, Catherine Chaumontet, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2014. « Food Intake and Energy Expenditure Are Increased in High-Fat-Sensitive but Not in High-Carbohydrate-Sensitive Obesity-Prone Rats ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 307 (3): R299-309. <https://doi.org/10/f6d2qr>.
- Badman, Michael K., Anja Koester, Jeffrey S. Flier, Alexei Kharitonov, et Eleftheria Maratos-Flier. 2009. « Fibroblast Growth Factor 21-Deficient Mice Demonstrate Impaired Adaptation to Ketosis ». *Endocrinology* 150 (11): 4931-40. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0532>.
- Benhamed, Fadila, Pierre-Damien Denechaud, Maud Lemoine, Céline Robichon, Marthe Moldes, Justine Bertrand-Michel, Vlad Ratzu, et al. 2012. « The Lipogenic Transcription Factor ChREBP Dissociates Hepatic Steatosis from Insulin Resistance in Mice and Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (6): 2176-94. <https://doi.org/10/f32qsx>.
- Berthoud, Hans-Rudolf, Heike Münzberg, Brenda K. Richards, et Christopher D. Morrison. 2012. « Neural and Metabolic Regulation of Macronutrient Intake and Selection ». *Proceedings of the Nutrition Society* 71 (3): 390-400. <https://doi.org/10/f34nrh>.
- Blais, Anne, Catherine Chaumontet, Dalila Azzout-Marniche, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Claire Gaudichon, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2018. « Low-Protein Diet-Induced Hyperphagia and Adiposity Are Modulated through Interactions Involving Thermoregulation, Motor Activity, and Protein Quality in Mice ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 314 (2): E139-51. <https://doi.org/10/gc559r>.
- BonDurant, Lucas D., Magdalene Ameka, Meghan C. Naber, Kathleen R. Markan, Sharon O. Idiga, Michael R. Acevedo, Susan A. Walsh, David M. Ornitz, et Matthew J. Potthoff. 2017. « FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms ». *Cell Metabolism* 25 (4): 935-944.e4. <https://doi.org/10/f9z86q>.
- BonDurant, Lucas D., et Matthew J. Potthoff. 2018. « Fibroblast Growth Factor 21: A Versatile Regulator of Metabolic Homeostasis ». *Annual Review of Nutrition* 38 (1): 173-96. <https://doi.org/10/gg4gzk>.
- Breese, C. R., R. L. Ingram, et W. E. Sonntag. 1991. « Influence of Age and Long-Term Dietary Restriction on Plasma Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), IGF-1 Gene Expression, and IGF-1 Binding Proteins ». *Journal of Gerontology* 46 (5): B180-187. <https://doi.org/10/gjv44s>.
- Chalvon-Demersay, Tristan, Patrick C. Even, Daniel Tomé, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, et Dalila Azzout-Marniche. 2016. « Low-Protein Diet Induces, Whereas High-Protein Diet Reduces Hepatic FGF21 Production in Mice, but Glucose and Not Amino

- Acids up-Regulate FGF21 in Cultured Hepatocytes ». *Journal of Nutritional Biochemistry* 36: 60-67. <https://doi.org/10/f86k5v>.
- Chaumontet, Catherine, Dalila Azzout-Marniche, Anne Blais, Tristan Chalvon-Dermersay, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2015. « Rats Prone to Obesity Under a High-Carbohydrate Diet have Increased Post-Meal CCK mRNA Expression and Characteristics of Rats Fed a High-Glycemic Index Diet ». *Frontiers in Nutrition* 2. <https://doi.org/10/gg33z2>.
- Chaumontet, Catherine, Dalila Azzout-Marniche, Anne Blais, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2019. « Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 316 (5): R486-501. <https://doi.org/10/gfzg3m>.
- Chaumontet, Catherine, Isidra Recio, Gilles Fromentin, Simon Benoit, Julien Piedcoq, Nicolas Darcel, et Daniel Tomé. 2018. « The Protein Status of Rats Affects the Rewarding Value of Meals Due to Their Protein Content ». *Journal of Nutrition* 148 (6): 989-98. <https://doi.org/10/gdrn84>.
- Clemmons, D. R., A. Klibanski, L. E. Underwood, J. W. McArthur, E. C. Ridgway, I. Z. Beitins, et J. J. Van Wyk. 1981. « Reduction of Plasma Immunoreactive Somatomedin C during Fasting in Humans ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 53 (6): 1247-50. <https://doi.org/10.1210/jcem-53-6-1247>.
- Clemmons, D. R., L. E. Underwood, R. N. Dickerson, R. O. Brown, L. J. Hak, R. D. MacPhee, et W. D. Heizer. 1985. « Use of Plasma Somatomedin-C/Insulin-like Growth Factor I Measurements to Monitor the Response to Nutritional Repletion in Malnourished Patients ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 41 (2): 191-98. <https://doi.org/10/gmh5s>.
- Copinschi G, et Chatelain P. 1985. « Recent Developments in the Study of Growth Factors: GRF and Somatomedins. » In , 24:81-200. Paris: Horm Res.
- Coskun, Tamer, Holly A. Bina, Michael A. Schneider, James D. Dunbar, Charlie C. Hu, Yanyun Chen, David E. Moller, et Alexei Kharitonov. 2008. « Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice ». *Endocrinology* 149 (12): 6018-27. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0816>.
- Cuevas-Ramos, Daniel, et Carlos A. Aguilar-Salinas. 2017. « Modulation of Energy Balance by Fibroblast Growth Factor 21 ». *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* 30 (1). <https://doi.org/10/gg4gzw>.
- Davidenko, O, N Darcel, G Fromentin, et D Tomé. 2013. « Control of Protein and Energy Intake - Brain Mechanisms ». *European Journal of Clinical Nutrition* 67 (5): 455-61. <https://doi.org/10/f4xcvb>.
- DiBattista, David. 1991. « Effects of Time-Restricted Access to Protein and to Carbohydrate in Adult Mice and Rats ». *Physiology & Behavior* 49 (2): 263-69. <https://doi.org/10/bm4cdp>.
- Donahue, S P, et L S Phillips. 1989. « Response of IGF-1 to Nutritional Support in Malnourished Hospital Patients: A Possible Indicator of Short-Term Changes in Nutritional Status ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 50 (5): 962-69. <https://doi.org/10/gmh58>.
- Dulloo, A. G., N. Mensi, J. Seydoux, et L. Girardier. 1995. « Differential Effects of High-Fat Diets Varying in Fatty Acid Composition on the Efficiency of Lean and Fat Tissue Deposition during Weight Recovery after Low Food Intake ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 44 (2): 273-79. <https://doi.org/10/cc8tk8>.

- Dushay, Jody R., Elena Toschi, Emilie K. Mitten, Ffolliott M. Fisher, Mark A. Herman, et Eleftheria Maratos-Flier. 2015. « Fructose Ingestion Acutely Stimulates Circulating FGF21 Levels in Humans ». *Molecular Metabolism* 4 (1): 51-57. <https://doi.org/10/gh2std>.
- Elvert, R., A. Wille, J. Wandschneider, U. Werner, H. Glombik, et A. W. Herling. 2013. « Energy Loss via Urine and Faeces - a Combustive Analysis in Diabetic Rats and the Impact of Antidiabetic Treatment on Body Weight ». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15 (4): 324-34. <https://doi.org/10/gmhbbq7>.
- Even, Patrick C., Joséphine Gehring, et Daniel Tomé. 2021. « What Does Self-Selection of Dietary Proteins in Rats Tell Us about Protein Requirements and Body Weight Control? » *Obesity Reviews*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/obr.13194>.
- Even, Patrick C., et Nachiket A. Nadkarni. 2012. « Indirect Calorimetry in Laboratory Mice and Rats: Principles, Practical Considerations, Interpretation and Perspectives ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303 (5): R459-476. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00137.2012>.
- François, Jean-Christophe, Saba Aïd, Zayna Chaker, Philippe Lacube, Jie Xu, Racha Fayad, Francine Côté, Patrick Even, et Martin Holzenberger. 2017. « Disrupting IGF Signaling in Adult Mice Conditions Leanness, Resilient Energy Metabolism, and High Growth Hormone Pulses ». *Endocrinology* 158 (7): 2269-83. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00261>.
- Grant, D. B., J. Hambley, D. Becker, et B. L. Pimstone. 1979. « Reduced Sulphation Factor in Undernourished Children ». *Archives of Disease in Childhood* 48 (8): 596-600. <https://doi.org/10/dj9shn>.
- Hall, Kevin D. 2008. « What is the Required Energy Deficit per unit Weight Loss? » *International Journal of Obesity* 32 (3): 573-76. <https://doi.org/10/btwjqd>.
- Héliès, Jean-Marie, Abdoulaye Diane, Allan Langlois, Christiane Larue-Achagiotis, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Pierre Mormède, et Nathalie Marissal-Arvy. 2005. « Comparison of Fat Storage between Fischer 344 and Obesity-Resistant Lou/C Rats Fed Different Diets ». *Obesity Research* 13 (1): 3-10. <https://doi.org/10/cpd75g>.
- Hill, Cristal M., Hans-Rudolf Berthoud, Heike Münzberg, et Christopher D. Morrison. 2018. « Homeostatic Sensing of Dietary Protein Restriction: A Case for FGF21 ». *Frontiers in Neuroendocrinology* 51: 125-31. <https://doi.org/10/gfh76x>.
- Hill, Cristal M., Thomas Laeger, Diana C. Albarado, David H. McDougal, Hans-Rudolf Berthoud, Heike Münzberg, et Christopher D. Morrison. 2017. « Low Protein-Induced Increases in FGF21 Drive UCP1-Dependent Metabolic but Not Thermoregulatory Endpoints ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10/gbvfvn>.
- Hill, Cristal M., Thomas Laeger, Madeleine Dehner, Diana C. Albarado, Blaise Clarke, Desiree Wanders, Susan J. Burke, et al. 2019. « FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism ». *Cell Reports* 27 (10): 2934-2947.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.022>.
- Hollstein, Tim, Sascha Heinitz, Takafumi Ando, Theresa L Rodzevik, Mary Walter, Douglas C Chang, Jonathan Krakoff, et Paolo Piaggi. 2020. « The Metabolic Responses to 24-h Fasting and Mild Cold Exposure in Overweight Individuals Are Correlated and Accompanied by Changes in FGF21 Concentration ». *Diabetes*, 37.

- Hondares, Elayne, Roser Iglesias, Albert Giralt, Frank J. Gonzalez, Marta Giralt, Teresa Mampel, et Francesc Villarroya. 2011. « Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (15): 12983-90. <https://doi.org/10/d5scvh>.
- Huang, Xin, Dale P. Hancock, Alison K. Gosby, Aisling C. McMahon, Samantha M.C. Solon, David G. Le Couteur, Arthur D. Conigrave, David Raubenheimer, et Stephen J. Simpson. 2013. « Effects of Dietary Protein to Carbohydrate Balance on Energy Intake, Fat Storage, and Heat Production in Mice: Protein Leverage and Thermogenesis in Mice ». *Obesity* 21 (1): 85-92. <https://doi.org/10/f45cnx>.
- Iizuka, Katsumi, Jun Takeda, et Yukio Horikawa. 2009. « Glucose Induces FGF21 mRNA Expression through ChREBP Activation in Rat Hepatocytes ». *FEBS Letters* 583 (17): 2882-86. <https://doi.org/10/fgbgr3>.
- Inagaki, Takeshi, Vicky Y. Lin, Regina Goetz, Moosa Mohammadi, David J. Mangelsdorf, et Steven A. Kliewer. 2008. « Inhibition of Growth Hormone Signaling by the Fasting-Induced Hormone FGF21 ». *Cell Metabolism* 8 (1): 77-83. <https://doi.org/10/d79f8s>.
- Laeger, Thomas, Diana C. Albarado, Susan J. Burke, Lexus Trosclair, John W. Hedgepeth, Hans-Rudolf Berthoud, Thomas W. Gettys, J. Jason Collier, Heike Münzberg, et Christopher D. Morrison. 2016. « Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 That Is Delayed by the Absence of GCN2 ». *Cell Reports* 16 (3): 707-16. <https://doi.org/10/gf9wk9>.
- Laeger, Thomas, Tara M. Henagan, Diana C. Albarado, Leanne M. Redman, George A. Bray, Robert C. Noland, Heike Münzberg, et al. 2014. « FGF21 Is an Endocrine Signal of Protein Restriction ». *Journal of Clinical Investigation* 124 (9): 3913-22. <https://doi.org/10/f6f43c>.
- Lan, Tian, Donald A. Morgan, Kamal Rahmouni, Junichiro Sonoda, Xiaorong Fu, Shawn C. Burgess, William L. Holland, Steven A. Kliewer, et David J. Mangelsdorf. 2017. « FGF19, FGF21, and an FGFR1/β-Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia ». *Cell Metabolism* 26 (5): 709-718.e3. <https://doi.org/10/gcw7mk>.
- Larson, Karlton R, Aki T-B Chaffin, Michael L Goodson, Yanbin Fang, et Karen K Ryan. 2019. « Fibroblast Growth Factor-21 Controls Dietary Protein Intake in Male Mice ». *Endocrinology* 160 (5): 1069-80. <https://doi.org/10.1210/en.2018-01056>.
- Le Bellego, L., J. van Milgen, S. Dubois, et J. Noblet. 2001. « Energy Utilization of Low-Protein Diets in Growing Pigs ». *Journal of Animal Science* 79 (5): 1259-71. <https://doi.org/10/gmh49>.
- Lee, Paul, Robert J. Brychta, Joyce Linderman, Sheila Smith, Kong Y. Chen, et Francesco S. Celi. 2013. « Mild Cold Exposure Modulates Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Diurnal Rhythm in Humans: Relationship between FGF21 Levels, Lipolysis, and Cold-Induced Thermogenesis ». *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (1): E98-102. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3107>.
- Liang, Q., L. Zhong, J. Zhang, Y. Wang, S. R. Bornstein, C. R. Triggle, H. Ding, K. S. L. Lam, et A. Xu. 2014. « FGF21 Maintains Glucose Homeostasis by Mediating the Cross Talk Between Liver and Brain During Prolonged Fasting ». *Diabetes* 63 (12): 4064-75. <https://doi.org/10/f6p8nt>.
- Lin, Zhuofeng, Qi Gong, Chaoming Wu, Jiawen Yu, Tingting Lu, Xuebo Pan, Shaoqiang Lin, et Xiaokun Li. 2012. « Dynamic Change of Serum FGF21 Levels in Response to Glucose Challenge in Human ». *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97 (7): E1224-28. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1132>.

- Lundsgaard, Anne-Marie, Andreas M. Fritzen, Kim A. Sjøberg, Lene S. Myrmel, Lise Madsen, Jørgen F.P. Wojtaszewski, Erik A. Richter, et Bente Kiens. 2017. « Circulating FGF21 in Humans Is Potently Induced by Short Term Overfeeding of Carbohydrates ». *Molecular Metabolism* 6 (1): 22-29. <https://doi.org/10/gf9hmc>.
- Lundsgaard, Anne-Marie, Kim A. Sjøberg, Louise D. Høeg, Jacob Jeppesen, Andreas B. Jordy, Annette K. Serup, Andreas M. Fritzen, et al. 2017. « Opposite Regulation of Insulin Sensitivity by Dietary Lipid Versus Carbohydrate Excess ». *Diabetes* 66 (10): 2583-95. <https://doi.org/10/gbx5xs>.
- Maida, Adriano, Annika Zota, Kim A. Sjøberg, Jonas Schumacher, Tjeerd P. Sijmonsma, Anja Pfenninger, Marie M. Christensen, et al. 2016. « A Liver Stress-Endocrine Nexus Promotes Metabolic Integrity during Dietary Protein Dilution ». *Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3263-78. <https://doi.org/10/f82n7c>.
- Markan, K. R., M. C. Naber, M. K. Ameka, M. D. Anderegg, D. J. Mangelsdorf, S. A. Kliewer, M. Mohammadi, et M. J. Potthoff. 2014. « Circulating FGF21 Is Liver Derived and Enhances Glucose Uptake During Refeeding and Overfeeding ». *Diabetes* 63 (12): 4057-63. <https://doi.org/10/f6p26v>.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, et R. C. Turner. 1985. « Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and Béta-Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man ». *Diabetologia* 28 (7): 412-19. <https://doi.org/10/dbht47>.
- McNulty, Margaret A., Brad A. Goupil, Diana C. Albarado, Teresa Castaño-Martinez, Thomas H. Ambrosi, Spela Puh, Tim J. Schulz, Annette Schürmann, Christopher D. Morrison, et Thomas Laeger. 2020. « FGF21, Not GCN2, Influences Bone Morphology Due to Dietary Protein Restrictions ». *Bone Reports* 12: 100241. <https://doi.org/10/ghntt3>.
- Minuto, Francesco, Antonina Barreca, Gian Franco Adami, Patricia Fortini, Patrizia Del Monte, Franca Cella, Nicola Scopinaro, et Giulio Giordano. 1989. « Insulin-Like Growth Factor-I in Human Malnutrition: Relationship with Some Body Composition and Nutritional Parameters ». *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 13 (4): 392-96. <https://doi.org/10/dst2hg>.
- Morrison, Christopher D., et Thomas Laeger. 2015. « Protein-Dependent Regulation of Feeding and Metabolism ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26 (5): 256-62. <https://doi.org/10/f7chr5>.
- Morrison, Christopher D., Scott D. Reed, et Tara M. Henagan. 2012. « Homeostatic Regulation of Protein Intake: In Search of a Mechanism ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302 (8): R917-28. <https://doi.org/10/f3zrjj>.
- Nadkarni, Nachiket A., Catherine Chaumontet, Dalila Azzout-Marniche, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2013. « The Carbohydrate Sensitive Rat as a Model of Obesity ». Édité par Brenda Smith. *PLoS ONE* 8 (7): e68436. <https://doi.org/10/f5dkrx>.
- O'Sullivan, U., P.D. Gluckman, B.H. Breier, S. Woodall, R.A. Siddiqui, et S.N. McCUTCHEON. 1989. « INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 (IGF-1) IN MICE REDUCES WEIGHT LOSS DURING STARVATION ». *Endocrinology* 125 (5): 2793-94. <https://doi.org/10.1210/endo-125-5-2793>.
- Owen, Bryn M., Xunshan Ding, Donald A. Morgan, Katie Colbert Coate, Angie L. Bookout, Kamal Rahmouni, Steven A. Kliewer, et David J. Mangelsdorf. 2014. « FGF21 Acts Centrally to Induce

- Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure and Weight Loss ». *Cell Metabolism* 20 (4): 670-77. <https://doi.org/10/f6mh6s>.
- Petzke, Klaus J., Cornelia Riese, et Susanne Klaus. 2007. « Short-Term, Increasing Dietary Protein and Fat Moderately Affect Energy Expenditure, Substrate Oxidation and Uncoupling Protein Gene Expression in Rats ». *Journal of Nutritional Biochemistry* 18 (6): 400-407. <https://doi.org/10/bf9xwk>.
- Pezeshki, A., R.C. Zapata, A. Singh, N.J. Yee, et P.K. Chelikani. 2016. « Low Protein Diets Produce Divergent Effects on Energy Balance ». *Scientific Reports* 6 (25145).
- Rahmani, Jamal, Hamed Kord Varkaneh, Cain Clark, Hamid Zand, Hiba Bawadi, Paul M. Ryan, Somaye Fatahi, et Yong Zhang. 2019. « The Influence of Fasting and Energy Restricting Diets on IGF-1 Levels in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Ageing Research Reviews* 53: 100910. <https://doi.org/10/gjv44c>.
- Rathlou, Stephanie von Holstein-, Lucas D. BonDurant, Lila Peltekian, Meghan C. Naber, Terry C. Yin, Kristin E. Claflin, Adriana Ibarra Urizar, et al. 2016. « FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver ». *Cell Metabolism* 23 (2): 335-43. <https://doi.org/10/bbj9>.
- Raubenheimer, D., et S. J. Simpson. 1997. « Integrative Models of Nutrient Balancing: Application to Insects and Vertebrates ». *Nutrition Research Reviews* 10 (01): 151. <https://doi.org/10.1079/NRR19970009>.
- Raubenheimer, David, et Stephen J. Simpson. 2019. « Protein Leverage: Theoretical Foundations and Ten Points of Clarification ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 27 (8): 1225-38. <https://doi.org/10.1002/oby.22531>.
- Recinella, L., S. Leone, C. Ferrante, A. Chiavaroli, C. Di Nisio, S. Martinotti, M. Vacca, L. Brunetti, et G. Orlando. 2017. « Effects of Central Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in Energy Balance ». *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 31 (3): 603-13.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et G. C. Fahey. 1993. « AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet ». *Journal of Nutrition* 123 (11): 1939-51. <https://doi.org/10/ghjkfp>.
- Reeves, Robert D., Linda Dickinson, Jason Lee, Barbara Kilgore, Bill Branham, et M. Joycelyn Elders. 1979. « Effects of Dietary Composition on Somatomedin Activity in Growing Rats ». *The Journal of Nutrition* 109 (4): 613-20. <https://doi.org/10/gmh6g>.
- Sánchez, J., A. Palou, et C. Picó. 2009. « Response to Carbohydrate and Fat Refeeding in the Expression of Genes Involved in Nutrient Partitioning and Metabolism: Striking Effects on Fibroblast Growth Factor-21 Induction ». *Endocrinology* 150 (12): 5341-50. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0466>.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, et D. G. Baskin. 2000. « Central Nervous System Control of Food Intake ». *Nature* 404 (6778): 661-71. <https://doi.org/10/d4szhw>.
- Solon-Biet, Samantha M., Victoria C. Cogger, Tamara Pulpitel, Marika Heblinski, Devin Wahl, Aisling C. McMahon, Alessandra Warren, et al. 2016. « Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework ». *Cell Metabolism* 24 (4): 555-65. <https://doi.org/10/f89gxr>.
- Solon-Biet, Samantha M., Sarah J. Mitchell, Sean C.P. Coogan, Victoria C. Cogger, Rahul Gokarn, Aisling C. McMahon, David Raubenheimer, Rafael de Cabo, Stephen J. Simpson, et David G.

- Le Couteur. 2015. « Dietary Protein to Carbohydrate Ratio and Caloric Restriction: Comparing Metabolic Outcomes in Mice ». *Cell Reports* 11 (10): 1529-34. <https://doi.org/10/gf9zzt>.
- Speakman, John R., et Sharon E. Mitchell. 2011. « Caloric Restriction ». *Molecular Aspects of Medicine, Caloric Restriction*, 32 (3): 159-221. <https://doi.org/10/cvxgbr>.
- Staiger, Harald, Michaela Keuper, Lucia Berti, Martin Hrabě de Angelis, et Hans-Ulrich Häring. 2017. « Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men ». *Endocrine Reviews* 38 (5): 468-88. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00016>.
- Takano, Kazue, Naomi Hizuka, Kazuo Shizume, Yoko Hasumi, et Toshio Tsushima. 1980. « Effect of nutrition on growth and somatomedin A levels in the rat ». *Acta Endocrinologica* 94 (3): 321-26. <https://doi.org/10/ckn94f>.
- Talukdar, Saswata, Bryn M. Owen, Parkyong Song, Genaro Hernandez, Yuan Zhang, Yingjiang Zhou, William T. Scott, et al. 2016. « FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference ». *Cell Metabolism* 23 (2): 344-49. <https://doi.org/10/f8g6r4>.
- Talukdar, Saswata, Yingjiang Zhou, Dongmei Li, Michelle Rossulek, Jennifer Dong, Veena Somayaji, Yan Weng, et al. 2016. « A Long-Acting FGF21 Molecule, PF-05231023, Decreases Body Weight and Improves Lipid Profile in Non-Human Primates and Type 2 Diabetic Subjects ». *Cell Metabolism* 23 (3): 427-40. <https://doi.org/10/f8g77q>.
- Thissen, J. P., L. E. Underwood, D. Maiter, M. Maes, D. R. Clemmons, et J. M. Ketelslegers. 1991. « Failure of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) Infusion to Promote Growth in Protein-Restricted Rats despite Normalization of Serum IGF-I Concentrations ». *Endocrinology* 128 (2): 885-90. <https://doi.org/10.1210/endo-128-2-885>.
- Thissen, Jean-Paul, Jean-Marie Ketelslegers, et Louis E. Underwood. 1994. « Nutritional Regulation of the Insulin-Like Growth Factors ». *Endocrine Reviews* 15 (1): 80-101. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-1-80>.
- Vienberg, S. G., S. H. Jacobsen, D. Worm, L. E. Hvolris, L. Naver, T. Almdal, D. L. Hansen, et al. 2017. « Increased Glucose-Stimulated FGF21 Response to Oral Glucose in Obese Nondiabetic Subjects after Roux-En-Y Gastric Bypass ». *Clinical Endocrinology* 86 (1): 156-59. <https://doi.org/10/f9g3td>.
- Wen, Song, Chaoxun Wang, Min Gong, et Ligang Zhou. 2018. « An Overview of Energy and Metabolic Regulation ». *Science China Life Sciences* 62 (6): 771-90. <https://doi.org/10/gf9r8n>.
- White, B. Douglas, Bin He, Roger G. Dean, et Roy J. Martin. 1994. « Low Protein Diets Increase Neuropeptide Y Gene Expression in the Basomedial Hypothalamus of Rats ». *Journal of Nutrition* 124 (8): 1152-60. <https://doi.org/10/gf9zzc>.

Supplementary Table 1. Primer sequences used for liver RNA analysis.

Forward and reverse primers were designed using primer express software (Applied Biosystems). *Acca*: Acetyl-coA carboxylase α ; *Agrp*: Agouti-related protein precursor; *Cart*: Cocaine and amphetamine Regulated; *Cpt1*: Carnitine palmitoyltransferase 1 α -liver isoform; *Dr1*: Dopamine receptor 1; *Dr2*: Dopamine receptor 2; *Dor*: Opioid receptor (*Oprd1*); *Fas*: Fatty acid synthase; *Fgf21*: fibroblast growth Factor 21; *Gk*: Glucokinase; *Igf-1*: Insulin Growth Factor 1; *Kor*: Opioid receptor; *Lpk*: Liver-pyruvate kinase; *Npy*: Neuropeptide Y; *Pomc*: Proopiomelanocortin precursor; *Rpl13*: Ribosomal Protein L13; *Ucp1*: Uncoupling Protein 1; *Ucp2*: Uncoupling Protein 2; *Ucp3*: Uncoupling Protein 3.

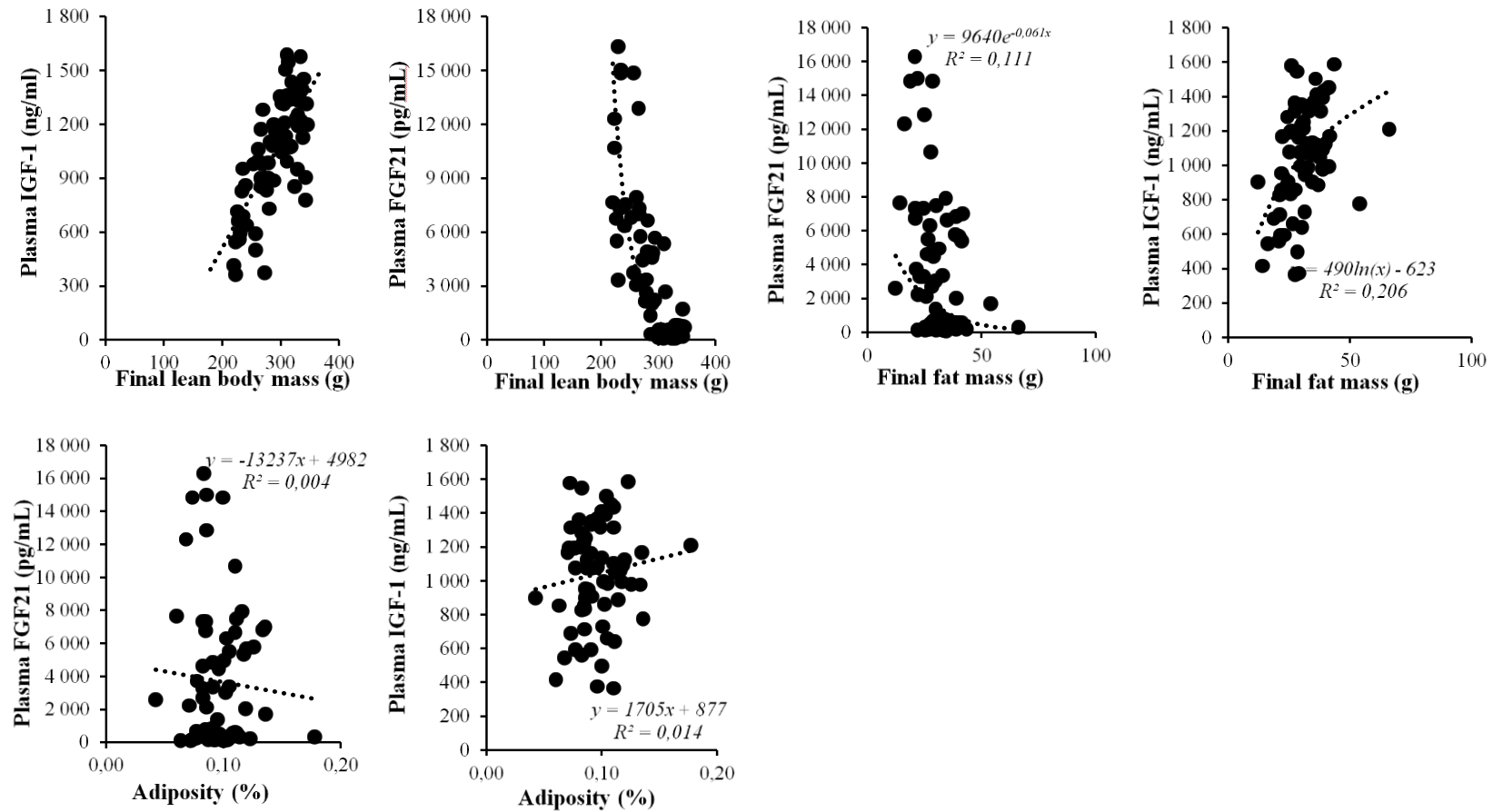
	Forward Primer (5' to 3')	Reverse Primer (3' to 5')
Housekeeping genes		
<i>18s</i>	ACGGAAGGGCACCACCAGGAG	GCACCACCACCCACGAAACG
<i>Rpl13</i>	GGATCCCTCCACCCTATGACA	CTGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
Liver genes		
<i>Acca</i>	TGGTGACAGAGGTACCGAAGTG	CGTAGTGCCCGTTCTGAAACT
<i>Cpt1</i>	TCTCTGGATGCGGTAGAAAAGG	CTCTATATCCCTGTTCCGATTCTGT
<i>Fas</i>	TGCTCCCAGCTGCAG	GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA
<i>Fgf21</i>	CCTGGAGCTCAAAGCCTTGA	AAACTGCAGGCCTCAGGATC
<i>Gk</i>	TTGAGACCCGTTTCGTGTCA	AGGGTCGAAGCCCCAGAGT
<i>Igf-1</i>	TCTGCCAAACTGCAACAAGAAT	AGCCCAGCTTCTCCATCCA
<i>Lpk</i>	TGATGATTGGACGCTGCAA-	GAGTTGGTCGAGCCTTAGTGATC
Hypothalamus genes		
<i>Agrp</i>	TGGTGCCCTTGACCAAAGTT	AATTTCTGCCCCACAGATG
<i>Cart</i>	CCGAGCCCTGGACATCTACTC	AAATACTGACCAGCTCCTTCTCATG
<i>Fgf21</i>	CCTGGAGCTCAAAGCCTTGA	AAACTGCAGGCCTCAGGATC
<i>Npy</i>	GGGAGCCTGAGAAACGGC	CCTGGTGGTGGCATGCAT
<i>Pomc</i>	AGGCCCTTCCCCTAGAGTTCAA	GTCGGCCTTCTCGGTATCC
NAcc genes		
<i>Dr1</i>	GCCCCGAGGCTCCATCT	ACGGCATGAGGGATCAGGTA
<i>Dr2</i>	CCATCAGCATTGACAGGTACACA	CAGTAACTCGGCGCTTGGA
<i>Dor</i>	CGTGCTCGTCATGTTGGAA	AAGGCCAGATTGAAGATGTAGATGT
<i>Kor</i>	GCATTGGCTACTGGCATCA	GACATCCACATCTCCCTGACTT
Brown adipose tissue genes		
<i>Ucp1</i>	CGTACCAAGCTGTGCGATGT	GACCCGAGTCGCAGAAAAGA
<i>Ucp2</i>	TGAAAGCCAACCTCATGACAGA	CAATGACGGTGGTGCAGAAG
<i>Ucp3</i>	GGGATCCTGGAACGTGATGA	TGGAGATTCCCGCAGTACCT

Supplementary Table 2. Body composition of rats according to their PE and CnpE ratios after 3 wk of diet.

Values are mean $\pm$ SEMs, n=5-6, 3 wks. 1 P for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different ($P \leq 0.05$). CnpE ratio: Carbohydrate-non-protein-energy ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.

	3P45Cnp (n=6)	3P75Cnp (n=6)	5P30Cnp (n=6)	5P60Cnp (n=6)	8P45Cnp (n=6)	8P75Cnp (n=6)	15P30Cn P (n=6)	15P60Cn P (n=6)	15P75Cn P (n=5)	30P30Cn P (n=6)	30P45Cn P (n=6)	30P60Cn P (n=5)	P ¹		
													PE ratio	CnpE ratio	PE ratio * CnpE ratio
Liver (g)	6.82 ^a ± 0.185	6.70 ^a ± 0.202	8.34 ^b ± 0.346	8.23 ^b ± 0.218	8.59 ^b ± 0.341	8.48 ^b ± 0.504	11.3 ^c ± 0.332	11.5 ^c ± 0.751	10.2 ^c ± 0.440	11.7 ^c ± 0.434	11.5 ^c ± 0.225	11.0 ^c ± 0.516	<2.00E-16	0.298	0.531
Kidneys (g)	1.44 ^a ± 0.078	1.41 ^a ± 0.028	1.65 ^b ± 0.052	1.55 ^b ± 0.034	1.77 ^b ± 0.033	1.76 ^b ± 0.074	2.03 ^c ± 0.043	2.11 ^c ± 0.081	2.03 ^c ± 0.083	2.20 ^d ± 0.069	2.23 ^d ± 0.058	2.19 ^d ± 0.059	<2.00E-16	0.918	0.581
Pancreas (g)	0.771 ^a ± 0.026	0.864 ^a ± 0.074	0.963 ^{ab} ± 0.081	1.06 ^{ab} ± 0.083	1.20 ^{bc} ± 0.080	1.19 ^{bc} ± 0.088	1.32 ^c ± 0.063	1.31 ^c ± 0.114	1.34 ^c ± 0.121	1.28 ^c ± 0.051	1.24 ^c ± 0.075	1.37 ^c ± 0.083	2.74E-8	0.648	0.893
Spleen (g)	0.339 ^a ± 0.031	0.433 ^a ± 0.018	0.460 ^{ab} ± 0.033	0.490 ^{ab} ± 0.028	0.490 ^b ± 0.41	0.550 ^b ± 0.063	0.728 ^c ± 0.049	0.697 ^c ± 0.034	0.676 ^c ± 0.027	0.772 ^c ± 0.030	0.713 ^c ± 0.017	0.728 ^c ± 0.029	2.00E-15	0.161	0.619
Gastrocnemius muscle (g)	2.59 ^a ± 0.029	2.72 ^a ± 0.074	3.16 ^b ± 0.144	2.97 ^b ± 0.100	3.25 ^b ± 0.064	3.15 ^b ± 0.067	3.43 ^c ± 0.138	3.55 ^c ± 0.081	3.51 ^c ± 0.061	3.47 ^c ± 0.105	3.54 ^c ± 0.075	3.32 ^c ± 0.043	8.75E-14	0.599	0.224
Head (g)	29.9 ^a ± 0.644	30.4 ^a ± 0.749	33.0 ^b ± 1.30	33.1 ^b ± 0.267	35.1 ^b ± 1.04	33.8 ^b ± 0.780	38.4 ^c ± 0.790	37.4 ^c ± 1.02	38.5 ^c ± 0.664	38.0 ^c ± 0.564	37.8 ^c ± 1.06	37.2 ^c ± 0.672	1.02E-13	0.767	0.758
Tail (g)	6.17 ^a ± 0.220	6.36 ^a ± 0.143	6.34 ^a ± 0.327	6.85 ^a ± 0.155	7.51 ^b ± 0.269	7.12 ^b ± 0.170	8.04 ^c ± 0.175	8.05 ^c ± 0.221	7.94 ^c ± 0.112	8.26 ^c ± 0.203	7.87 ^c ± 0.243	7.85 ^c ± 0.144	8.45E-14	0.836	0.162
Limbs (g)	4.67 ^a ± 0.110	4.73 ^a ± 0.112	5.22 ^b ± 0.231	5.04 ^b ± 0.118	5.19 ^{bc} ± 0.069	5.10 ^{bc} ± 0.051	5.39 ^{cd} ± 0.136	5.55 ^{cd} ± 0.189	5.61 ^{cd} ± 0.115	5.67 ^d ± 0.187	5.61 ^d ± 0.116	5.41 ^d ± 0.153	2.15E-7	0.758	0.571
Carcass (g)	109 ^a ± 2.18	112 ^a ± 2.52	127 ^b ± 4.13	129 ^b ± 2.82	143 ^c ± 3.19	138 ^c ± 2.50	153 ^d ± 4.14	150 ^d ± 4.86	155 ^d ± 0.759	154 ^d ± 3.26	152 ^d ± 2.86	147 ^d ± 3.53	<2.00E-16	0.671	0.459
Skin (g)	33.2 ^a ± 0.921	35.8 ^a ± 2.19	38.8 ^a ± 1.35	37.3 ^a ± 0.399	43.2 ^b ± 0.711	44.1 ^b ± 1.45	53.8 ^c ± 1.28	53.5 ^c ± 2.21	49.0 ^c ± 1.50	51.8 ^c ± 1.70	53.2 ^c ± 1.26	50.7 ^c ± 1.93	<2.00E-16	0.701	0.099
Epididymal fat mass (g)	3.56 ^a ± 0.376	3.64 ^a ± 0.136	5.65 ^{ab} ± 0.547	4.47 ^{ab} ± 0.190	4.95 ^{ab} ± 0.472	4.95 ^{ab} ± 0.912	9.06 ^c ± 1.11	7.68 ^c ± 0.778	5.91 ^c ± 0.327	5.64 ^{bc} ± 0.360	6.38 ^{bc} ± 0.874	6.37 ^{bc} ± 0.637	3.09E-6	0.141	0.097
Mesenteric fat mass (g)	3.81 ^a ± 0.430	3.83 ^a ± 0.214	5.90 ^{bc} ± 0.582	4.97 ^{bc} ± 0.334	4.65 ^{ab} ± 0.232	4.03 ^{ab} ± 0.607	6.66 ^c ± 0.711	5.48 ^c ± 0.424	5.09 ^c ± 0.190	4.60 ^{abc} ± 0.366	4.83 ^{abc} ± 0.291	4.72 ^{abc} ± 0.495	0.005	0.114	0.427
Retroperitoneal fat mass (g)	3.80 ^a ± 0.539	4.07 ^a ± 0.657	6.95 ^{bc} ± 0.802	5.49 ^{bc} ± 0.589	5.04 ^{ab} ± 0.678	4.71 ^{ab} ± 1.07	8.79 ^c ± 0.924	8.26 ^c ± 0.864	5.25 ^c ± 0.978	5.21 ^{ab} ± 0.346	5.40 ^{ab} ± 0.662	6.24 ^{ab} ± 0.509	0.005	0.048	0.172
Subcutaneous fat mass (g)	10.0 ^a ± 1.30	11.2 ^a ± 0.644	16.8 ^{bc} ± 1.18	14.7 ^{bc} ± 0.695	14.8 ^{bc} ± 0.786	14.5 ^{bc} ± 1.96	18.6 ^c ± 2.39	17.3 ^c ± 1.40	16.4 ^c ± 0.673	13.7 ^b ± 0.963	14.7 ^b ± 1.25	14.2 ^b ± 0.772	2.98E-4	0.813	0.657

Supplementary Figure 1. Plasma FGF21 and IGF-1 concentrations as a function of fat mass and adiposity. Analysis done by Pearson correlation test. n=5-6, 3 wks.



2.3.2.B. Résultats complémentaires

Composantes de la dépense énergétique responsables de l'augmentation de la dépense énergétique totale chez des rats nourris avec des régimes à faible teneur en protéines.

Méthodes

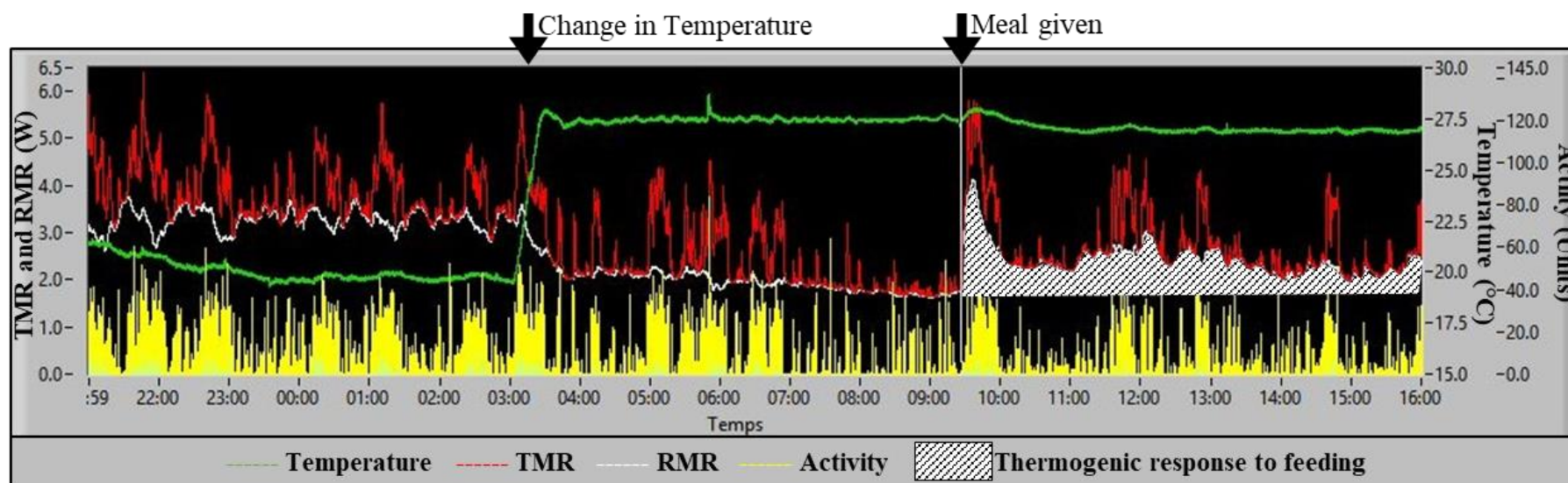
Cette expérience complémentaire avait pour but d'étudier les différentes composantes de la dépense énergétique totale pour comprendre laquelle ou lesquelles étaient impactée(s) avec un régime faible en protéines. En effet, il a été montré dans l'étude principale que la dépense énergétique totale était augmentée lorsque les rats étaient nourris avec des régimes à faibles teneurs en protéines.

Pour cela, l'évolution de la dépense énergétique en réponse à la température ambiante et à l'ingestion d'un repas a été mesurée. Cinq rats nourris avec un régime à 5% de protéines (5P) et cinq rats nourris avec un régime à 15% de protéines (15P) ont été logés à tour de rôle dans une cage de calorimétrie à 18h sans accès à la nourriture. La température de la cage était contrôlée en continue et était initialement régulée à 19-20 °C par un système Peltier refroidissant l'air autour de la cage. A 3h (soit 8 heures après le début des mesures), la température était automatiquement régulée à 27 °C (correspondant à la thermoneutralité) grâce à un système de chauffage enveloppant la cage. Les niveaux de dépense énergétique totale, de dépense énergétique de repos et d'activité ont été comparés entre 20 °C et 27 °C pour évaluer le coût de la régulation thermique.

Durant la deuxième partie de ces enregistrements, la thermogénèse alimentaire a aussi été mesurée. Ainsi, à 9h (soit bien après le changement de température), un repas test de 40 kJ a été introduit dans la cage, et l'enregistrement des échanges respiratoires a été poursuivi jusqu'à 17h. La thermogénèse alimentaire a été calculée comme l'augmentation induite par l'ingestion du repas test de la dépense énergétique de repos à partir du niveau avant le repas.

La mesure continue des échanges respiratoires et de l'activité motrice spontanée a permis de suivre les changements à court terme de la dépense énergétique totale et de repos, et de mesurer précisément les changements induits par la température et l'alimentation. Une capture d'écran d'un enregistrement individuel est présentée dans la **Figure 1**.

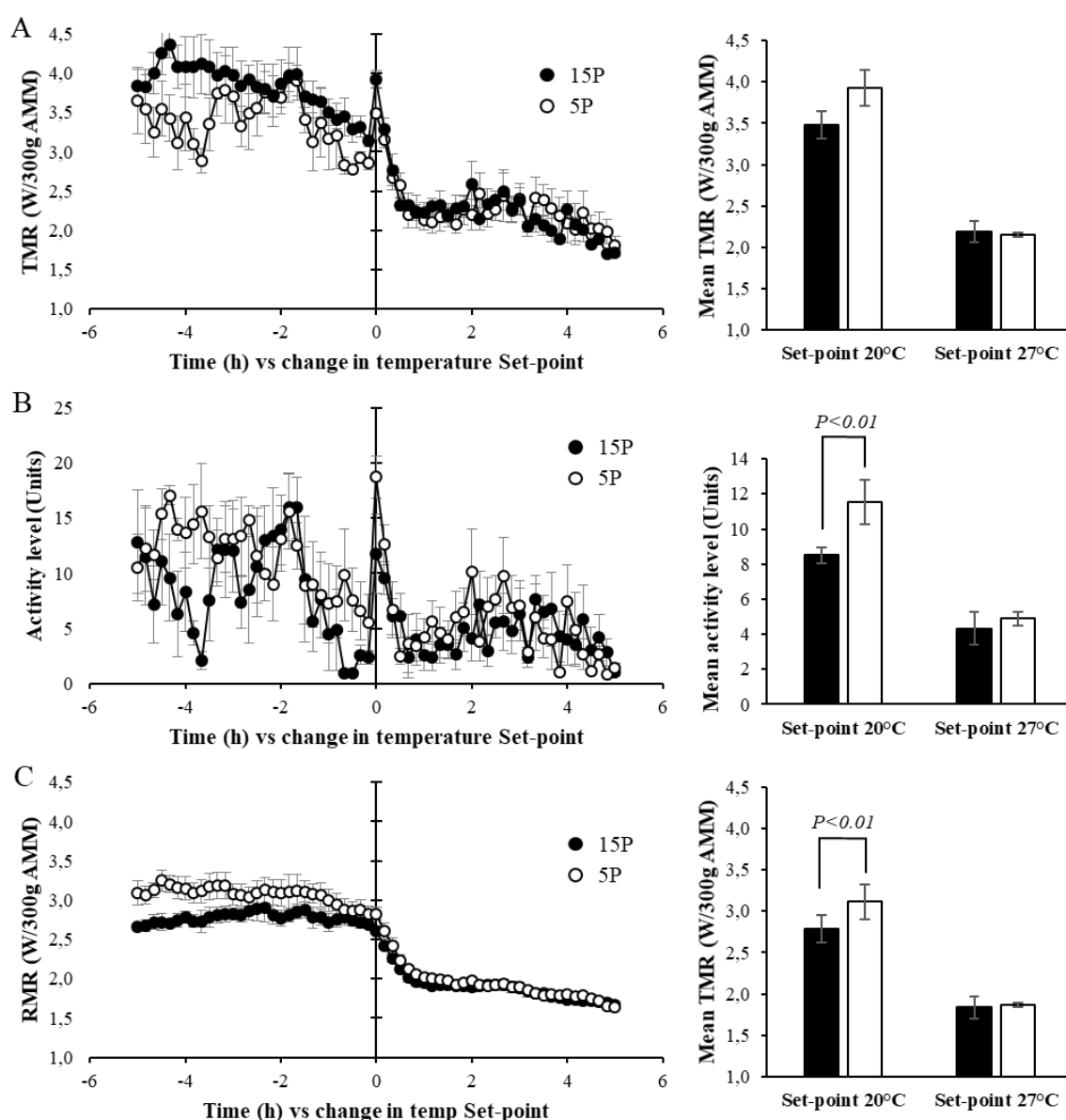
Figure 1. Exemple d'enregistrement individuel par calorimétrie indirecte de la dépense énergétique totale (TMR) et de la dépense énergétique de repos (RMR). Les données sont présentées en parallèle des mesures de température et d'activité. L'ensemble permet de mesurer précisément les changements induits par la température et l'alimentation (marqué par les flèches).



Résultats principaux

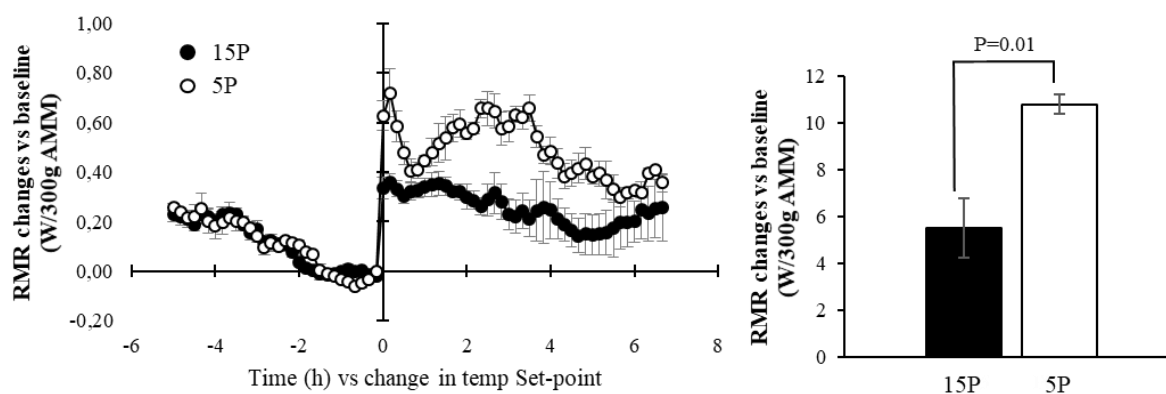
L'évolution moyenne de la température de la cage, de la dépense énergétique totale (TMR), du niveau d'activité et de la dépense énergétique de repos (RMR) pendant la transition de 20 °C à 27 °C est présentée dans la **Figure 2**. Le passage à 27 °C a diminué la TMR, l'activité et la RMR chez les rats nourris à 15P et 5P. À 27 °C, aucune différence n'a été observée entre les groupes. À 20 °C, le niveau d'activité et la RMR étaient plus élevés dans le groupe 5P que dans le groupe P15. En conséquence, la diminution de la RMR induite par l'augmentation de la température de la cage a également eu tendance à être plus élevée dans le groupe 5P que dans le groupe 15P ($-40 \pm 2\%$ vs $-35 \pm 1\%$). Malgré un niveau d'activité plus élevé, les différences de TMR n'étaient pas plus importantes que les différences de RMR, car le coût de l'activité était légèrement plus faible dans le groupe 5P que dans le groupe 15P ($0,060 \pm 0,005$ vs $0,073 \pm 0,008$ W/unité d'activité, $P=0,20$).

Figure 2. Evolution de la dépense énergétique totale (TMR), du niveau d'activité et de la dépense énergétique de repos (RMR) pendant le changement de température de 20 °C à 27 °C. Les moyennes de chacun de ces paramètres ont été comparées par ANOVA (paramètre ~ niveau de protéines * température) et par test post-hoc ($P \leq 0.05$).



La thermogénèse postprandiale a été mesurée à thermoneutralité pour éviter toute interférence avec la thermorégulation. L'ingestion du repas test de 40 kJ (soit 5P soit 15P) induisait une thermogénèse deux fois plus élevée dans le groupe 5P que dans le groupe 15P (respectivement $27,02 \pm 1,1\%$ contre $13,8\% \pm 3,1\%$ des calories ingérées) (**Figure 3**).

Figure 3. Evolution de la thermogénèse postprandiale suite à l'ingestion d'un régime faible en protéines (5P ou normo-protéique (15P)). Elle a été calculée comme étant l'augmentation induite par l'ingestion du repas test de la dépense énergétique de repos (RMR) à partir du niveau avant le repas. La moyenne a été comparée par ANOVA (paramètre ~ niveau de protéine) et par test post-hoc ($P \leq 0.05$).



Conclusion

Cette étude complémentaire indique que le niveau plus élevé de dépense énergétique mesuré chez les rats sous un régime faible en protéines résulte d'un coût de régulation thermique légèrement plus élevé ainsi que d'une thermogénèse postprandiale plus élevée. L'ensemble de ces réponses induirait une augmentation de la dépense énergétique totale de 15 à 20 % dans des conditions de vie habituelles, ce qui est proche de ce qui a été mesuré par l'étude du bilan énergétique dans l'étude principale.

Nous pouvons tout de fois nuancer le résultat concernant le coût de la régulation thermique. Il semble en effet que la différence entre 15P et 5P est plus importante en début d'expérience que vers la fin, avant le changement de température (**Figure 2C**). Cette différence pourrait être due au résidu de thermogénèse alimentaire, car les rats étaient mis à jeun au début des mesures, et pas en amont. La différence de thermorégulation entre 15P et 5P à 20°C ne semble alors pas complètement certaine.

Ces résultats complémentaires donneront lieu à l'écriture d'un article supplémentaire.

2.3.3. Etude 3 - D'après les concentrations plasmatiques de FGF21 et la consommation spontanée de protéines en conditions de choix, 15% de protéines semblent être insuffisant pour les rats

Contexte et objectifs de l'étude

Le besoin en protéines a été déterminé à 10-15% d'énergie. Cependant, sous condition d'auto-sélection alimentaire (« *dietary self-selection* » DSS), il a été montré que les rats ingèrent 25-30% d'énergie sous forme de protéines. Ce qui peut s'expliquer par le fait que les acides aminés qui composent les protéines sont catabolisés pour alimenter le métabolisme énergétique, et les protéines participent donc avec les lipides et les glucides au contrôle du métabolisme énergétique.

FGF21 est décrit comme le principal facteur qui signale l'adéquation des niveaux d'apport protéique. Dans l'article 1 (**Page 59**), nous avons rapporté que sous DSS, les rats régulaient FGF21 à des concentrations inférieures à celles mesurées dans le groupe témoin nourri avec un régime à 15% de protéines. Cette observation nous a conduit à émettre l'hypothèse que si un taux de protéines de 15% dans le régime alimentaire était effectivement suffisant pour assurer l'homéostasie protéique, il était peut-être inférieur au taux de protéines nécessaire pour assurer une homéostasie énergétique optimale.

L'objectif de cette étude était de mesurer les changements dans la prise alimentaire, le poids corporel, la composition corporelle et les concentrations de FGF21 et d'IGF-1 dans une première expérience chez des rats nourris avec des régimes contenant 8, 15, 30, 40 ou 50% de protéines. Puis, dans une deuxième expérience, l'objectif était de déterminer si les concentrations de FGF21 mesurées chez des rats nourris avec un régime standard contenant 15% de protéines étaient relatives à la consommation spontanée de protéines sous DSS.

Méthodes

Deux groupes de rats Wistar mâles adultes ont été utilisés dans cette étude, dans le but de :

- Déterminer les changements dans la prise alimentaire, la composition corporelle et les concentrations plasmatiques de FGF21 et d'IGF-1 chez les rats nourris avec des régimes à 8, 15, 30, 40 ou 50% de protéines par énergie (**Expérience 3 – Page 52**)
- Déterminer si les niveaux de FGF21 mesurés chez les rats étaient liés à leur consommation spontanée de protéines. Les rats ont été nourris avec un régime à 15% de protéines, et ont ensuite pu choisir entre un régime purement protéique et un régime sans protéine. (**Expérience 4 – Page 53**)

Les analyses statistiques ont été effectuées principalement par des tests ANOVA et des tests de corrélation.

Résultats principaux

Dans le premier groupe, un régime 15P semblait entraîner une croissance similaire à celle observée avec les régimes 30P. Cependant, le régime 15P ne permet pas une progression optimale de la composition corporelle en raison d'une tendance à fixer plus de graisse et d'énergie dans l'organisme. Les concentrations plasmatiques variables et plus élevées de FGF21 dans le régime 15P par rapport au 30P ($P=4,75 \times 10^{-6}$) suggèraient un déficit d'apport protéique.

Dans le deuxième groupe, après avoir été nourris avec un régime à 15% de protéines, le passage sous DSS avec un régime 100P et un régime sans protéine a réduit drastiquement les concentrations plasmatiques de FGF21. Ces rats en choix passaient alors d'un ratio protéines/énergie (PE) de 15% (imposé) à un ratio PE d'environ 27% (choisi). Nous nous sommes donc intéressés au lien possible entre les concentrations de FGF21 sous régime P15 et le ratio PE sélectionné. D'après nos résultats, il n'y avait pas de corrélation entre ces deux paramètres ($P=0,350$).

Conclusion

Un régime à 15% de protéines permet une prise de poids maximale, mais ne semble pas permettre une évolution optimale de la composition corporelle dans la mesure où il tend à favoriser la fixation d'une quantité de masse grasse plus importante que celle observée avec les régimes hyperprotéinés. Un certain nombre d'individus semblent en effet plus sensibles à l'obésité lorsqu'ils sont nourris avec un régime riche en glucides. Les niveaux de FGF21 plasmatique dans le régime à 15% étaient très variables et en moyenne plus élevés que dans les régimes hyperprotéinés. Ce résultat suggère que FGF21 signale un déficit d'apport en protéines chez ces individus. D'autres études sont nécessaires pour déterminer si la variabilité des concentrations plasmatiques de FGF21 est liée à la variabilité individuelle de la tendance à prendre de la masse grasse lors de ce même régime.

L'absence de corrélation entre les niveaux de FGF21 sous régime à 15% de protéines et les niveaux d'apport protéique mesurés chez les mêmes individus sous DSS suggère que les niveaux de FGF21 sous régime à 15% ne semblent pas être représentatifs des besoins individuels en protéines.

Manuscrit de l'article 3

Le manuscrit est en cours de révision dans American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.

Plasma FGF21 concentrations and spontaneous self-selection of protein suggest that 15% protein in the diet may not be enough for male adult rats

Josephine Gehring, Dalila Azzout-Marniche, Catherine Chaumontet, Claire Gaudichon, Patrick C. Even

Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE. UMR PNCA, 75005, Paris, France

Corresponding author: Joséphine Gehring, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, 75005, Paris, France. josephine.gehring@agroparistech.fr

Sources of support: This study was supported by the Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) and by the research unit Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions: J.G. and P-C.E. designed and conducted research; J.G., D.A-M, C.C., C.G and P-C.E. analyzed data and drafted the original manuscript. J.G. and P-C.E. have primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final version.

Abbreviations: CnpE ratio: Carbohydrate-to-Non-Protein-Energy ratio; FGF21: Fibroblast Growth Factor 21; IGF-1: Insulin Growth Factor 1; LBM: Lean Body Mass; PC ratio: Protein-to-Carbohydrate ratio; PE ratio: Protein-to-Energy ratio; Pox: Protein Oxidation; TEE: Total Energy Expenditure.

Abstract

Protein requirement has been determined at 10-15% energy. Under dietary self-selection, rats ingest 25-30% energy as protein and regulate FGF21 (a hormone signaling protein deficiency) to levels lower than those measured with a 15% protein (15P) diet. Our hypothesis is that if a 15P diet was indeed sufficient to ensure protein homeostasis, it is probably a too low protein level to ensure optimal energy homeostasis. Adult male Wistar rats were used in this study. The first objective was to determine the changes in food intake, body composition and plasma FGF21 and IGF-1 concentrations in rats fed 8P, 15P, 30P, 40P or 50P diets. The second was to determine whether the FGF21 levels measured in the rats were related to spontaneous protein intake. Rats were fed a 15P diet and then allowed to choose between a protein diet and a protein-free diet. Food intake and body weight were measured throughout the experiments. Body composition was determined at different experimental stages. Plasma samples were collected to measure FGF21 and IGF-1 concentrations. A 15P diet appears to result in higher growth than that observed with the 30P, 40P and 50P diets. However, the 15P diet probably does not provide optimal progression of body composition owing to a tendency of 15P rats to fix more fat and energy in the body. The variable and higher concentrations of FGF21 in the 15P diet suggest a deficit in protein intake, but this does not appear to be a parameter reflecting the adequacy of protein intake relative to individual protein requirements.

Key words. Dietary self-selection; Protein intake; High-protein diet; Fibroblast growth factor 21; Insulin growth factor 1.

New & Noteworthy

Under dietary self-selection, rats choose to ingest 25-30% of energy as protein, a value higher than the protein requirement (10-15%). According to our results, this higher spontaneous intake reflects the fact that rats fed a 15% protein diet, compared to high-protein diets, tend to bind more fat and have higher concentrations of FGF21, a hormone signalling protein deficiency. A 15% protein diet appears to be sufficient for protein homeostasis, but not for optimal energy homeostasis.

Introduction

Protein requirements for humans have been established at 0.8 g/kg/d, which corresponds to about 10-15% energy intake (FAO/WHO/UNU Expert Consultation 1985). This value is considered to ensure, with a good margin of safety, the protein requirements that allow renewal of body proteins. However, the amino acids that make up proteins are all eventually catabolized to fuel energy metabolism. In this context, in combination with carbohydrates and lipids, these amino acids participate in the control of hormonal secretions and regulate the use of energy substrates. The amino acids also contribute to the regulation of body weight and fat mass. Protein-rich diets seem to have the potential to reduce food intake and limit fat mass gain in the long term, especially in obese subjects (Johnstone et al. 2008; Skov et al. 1999). In addition, in our hands, about 30% of rats fed a 15% protein diet develop a visceral obesity (Azzout-Marniche et al. 2019; Nadkarni et al. 2013), a phenomenon that is not observed in rats fed diets containing 30 to 50% protein (Jean et al. 2001).

The most recent data suggest that the hormone Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) is the main factor that signals adequacy of protein intake levels (Hill et al. 2019; 2018; Laeger et al. 2014). FGF21 increases when protein intake levels decrease, and this increase becomes exponential when intake levels fall below those required for nitrogen balance. This increase in FGF21 concentrations can induce behavioral adaptations (e.g. search for additional protein sources), as well as metabolic adaptations that allow the organism to reduce the deleterious consequences of a reduction in protein intake levels (Lin, Liu, et Hu 2017). Therefore, FGF21 has profound effects on metabolic homeostasis, which may be therapeutically targeted for the treatment of human disease (Markan et Potthoff 2016).

We recently reported that under dietary self-selection conditions, rats ingest more protein than the 10-15% required and regulate FGF21 at lower concentrations than those measured in the control group fed a 15% protein diet (Gehring et al. 2021) and further showed that this large protein intake occurred despite the fact that the protein diet was less preferred than the fat-carbohydrate diet (Makarios-Lahham et al. 2004). We moreover showed that FGF21 concentrations are also lower in rats fed a high protein diet (30%) compared to the same control group. This observation led us to hypothesize that while a 15% protein level in the diet was indeed sufficient to ensure protein homeostasis, it may have been lower than the protein level required to ensure optimal energy homeostasis due to a low protein-to-carbohydrate (PC) ratio. Indeed, one result from the analysis of protein intake levels in self-selecting rats is that rather than defending a given protein intake, these animals tended to defend a PC ratio of 60-80%, much higher than the 20-30% ratio that prevails in reference diets for rats and humans (Gehring et al. 2021; Even, Gehring, et Tomé 2021). In this context, some experiments have indeed shown that increasing the PC ratio in the human diet can improve certain metabolic parameters (Devkota et Layman 2011).

The purpose of this study was to measure changes in food intake, body weight, body composition, and FGF21 and IGF-1 concentrations in a first experiment with rats fed diets containing 8, 15, 30, 40 and 50% protein levels. Then, in a second experiment, the goal was to determine whether FGF21 concentrations measured in control rats fed a standard diet containing 15% protein were relative to spontaneous protein consumption under dietary self-selection conditions.

General materials and methods

Animals and housing

The experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609 EEC) regarding the care and use of laboratory animals and were approved by the French Ethical Committee (APAFIS#16996).

Seven-week-old male rats (215-240 g) of the Wistar RccHan strain were used (ENVIGO, Indianapolis, United States). A total of 59 rats was used: 35 for Experiment 1, and 24 for Experiment 2 (details of both experiments are given in the following paragraphs). Our choices of group size were based on the variability of measured parameters according to studies previously conducted in our laboratory. After one week of adaptation to laboratory conditions (temperature 24°C ± 1°C, humidity 60%, 12/12 L/D cycle lights on at 08:00), the rats were singly housed in Plexiglass cages bedded with wood shavings, and randomly assigned to one of the experimental diets according to the study design.

Experimental diets and pellet preparation

In this study, three types of diets were used: protein diet, protein-free diet and composite diet (**Table 1**). The protein diet, named 100P, was composed of protein only. The protein-free diet was composed of 60% carbohydrates (by energy) and 40% lipids. This ratio is referred to as the carbohydrate-to-non-protein-energy (CnpE) ratio; this protein-free diet was named 60Cnp. The composite diets were a mixture of proteins, carbohydrates and lipids, and named according to their protein-to-energy (PE) ratio in the form xxP (**Table 1**).

The food pellets were prepared twice a week from dry powders manufactured at the unit Sciences de l'Animal et de l'Aliment de Jouy-en-Josas - Equipe Régimes à Façon (Jouy-en-Josas, France). Proteins were whole milk proteins LR 85F (Armor Protein, Nantes, France), carbohydrates were corn starch (Roquette, Lestrem, France) and sucrose (Eurosucré, Paris, France), and lipids were soy oil (Bailly SA, Aulnay-sous-Bois, France). All diets were complemented with minerals and vitamins according to AIN-93 requirements (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). The powders were mixed with the necessary amount of water to make a consistent dough and then molded into pellets sufficient for three days of feeding. Before being given to the rats, the pellets were left to dry at room temperature for three days. The diets and water were provided ad libitum.

Table 1. Composition and energy content of tested diets.

	100P	60Cnp	8P45Cnp	8P75Cnp	15P	30P	40P	50P
Whole milk protein (g/kg)	957	-	101	80.9	166	319	416	507
Corn starch (g/kg)	-	620	472	629	507	402	334	272
Sucrose (g/kg)	-	100	76.0	101	81.7	64.7	53.9	43.8
Soy oil (g/kg)	-	183	254	92.3	149	117	98.6	80.2
Mineral compound AIN-93M (g/kg)	31.9	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin compound AIN-93Vx (g/kg)	9.11	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose (g/kg)	45.6	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Choline chloride (g/kg)	2.10	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30
Energy (kJ/g)	15.0	18.4	19.8	16.1	17.4	16.7	16.4	16.0
PE ratio (%)	100	-	8.00	8.00	15.0	30.0	40.1	50.0
CnpE ratio (%)	-	60.0	46.7	76.2	61.6	61.7	62.7	62.7
PC ratio (%)	-	-	18.7	11.2	29.0	69.0	109	163
Carbohydrate-energy ratio (%)	-	60.0	42.9	70.2	52.4	43.2	36.9	30.7
Fat-energy ratio (%)	-	40.0	49.0	21.9	32.7	26.8	23.1	19.2

Energy and macronutrient intake

Diet intake (g) was measured twice per week and was converted to kJ according to the energy content of the diet and after correction for the pellet water content (**Table 1**). Water content at the time of weighing was calculated from the initial dilution of the pellets corrected for water evaporation measured from weight changes of reference pellets.

Body weight, body composition, energy and protein balance

Body weight (g) was measured twice per week throughout the experiments. At the end of the studies, the rats were deeply anesthetized with isoflurane, blood was collected from the vena cava until cardiac arrest and the rats were immediately decapitated to ensure death. Final body composition was measured by dissection and weighing the main tissues and organs. Lean body mass (LBM) was computed as body weight minus fat mass. Adiposity was calculated as total fat mass divided by body weight. Initial body composition was measured by MRI, performed at the Small Animal Imaging Platform of Paris-Descartes University (Paris, France). These measurements, along with differences between final fat mass and LBM (measured during dissection), allowed us to determine the changes in these parameters during the course of the study. Energy retained in the body was computed from the gain in fat mass and LBM, assuming 32.2 kJ for 1 g of fat and 7.6 kJ for 1 g of LBM (Hall 2008). Food efficiency was computed as energy retained in the body divided by energy intake (kJ/kJ). Total energy expenditure (TEE) (kJ) was computed as the difference between energy intake and energy retained. Protein oxidation (Pox) was computed as the difference between protein intake (kJ) and protein retained in the body (kJ), assuming that protein amounted to 25% of LBM.

Biochemistry

Plasma FGF21 and IGF-1 were measured in plasma from blood (0.5 mL) collected at the tail vein in EDTA tubes in the morning (10:00-12:00) in rats that had not been previously fasted. Blood was centrifuged (5000 g, 15 min, 4°C) and the plasma stored at -20°C until assayed. Plasma FGF21 and IGF-1 were assayed by ELISA tests using commercial kits from BioVendor (Mouse/Rat FGF-21 ELISA RD291108200R) and Alpco (Mouse/Rat IGF-1 ELISA 22-IG1MS-E01).

Statistical Analysis

Statistical tests were performed using RStudio software (2015; Integrated Development for R, RStudio, Inc.; Boston, USA). Significance of P values was set at 0.05.

The intergroup comparisons are represented by boxplot graphs, and were performed by one-way ANOVA (Experiment 1) or two-way ANOVA tests with repeated measurements (Experiment 2) followed by a post-hoc Bonferroni test when a significant effect was observed. As part of the validation of hypotheses of ANOVA tests, the normalization of the distribution of values for each parameter was tested by the Shapiro-Wilk test and, when necessary, adjusted by the Box and Cox transformation before statistical comparisons. If the homogeneity hypothesis (verified by a Bartlett test) was also rejected, comparisons were made with a non-parametric ANOVA test (Kruskal-Wallis test) and multiple comparisons with a Wilcoxon test. In the case of repeated measures ANOVAs, the hypothesis of sphericity was also checked by a Mauchly test and the necessary corrections applied.

Correlation analyses were performed with Excel and significance of correlations between parameters was assessed using the Pearson's correlation test or Spearman's correlation coefficient for the non-linear correlations.

Experiment 1: High-protein impact on body composition, energy intake and plasma FGF21 and IGF-1 concentrations

Experimental procedure of experiment 1

For three weeks, rats were fed four different composite diets in which the PE ratio increased from 15 to 50%, named 15P, 30P, 40P and 50P (**Table 1**). The PE ratios were increased at the expense of both carbohydrate and lipid in order that, by energy, the CnpE ratio remained constant at 60%. For sake of comparison and discussion, a group of rats fed an 8% protein diet (8P, n=12) was included in the analysis. The group was brought in from another still-unpublished experiment concerning adaptation to low-protein diets. In this group, half of the rats were fed an 8P diet with a CnpE ratio of 45% (8P45Cnp), and the other half with a CnpE ratio of 75% (8P75Cnp). Mean CnpE ratio in the group was thus 60%. Since preliminary statistical analysis showed that the CnpE ratio affected only total energy intake, the CnpE ratios of the 8P-fed rats was not considered for the other parameters. Energy intake and weight

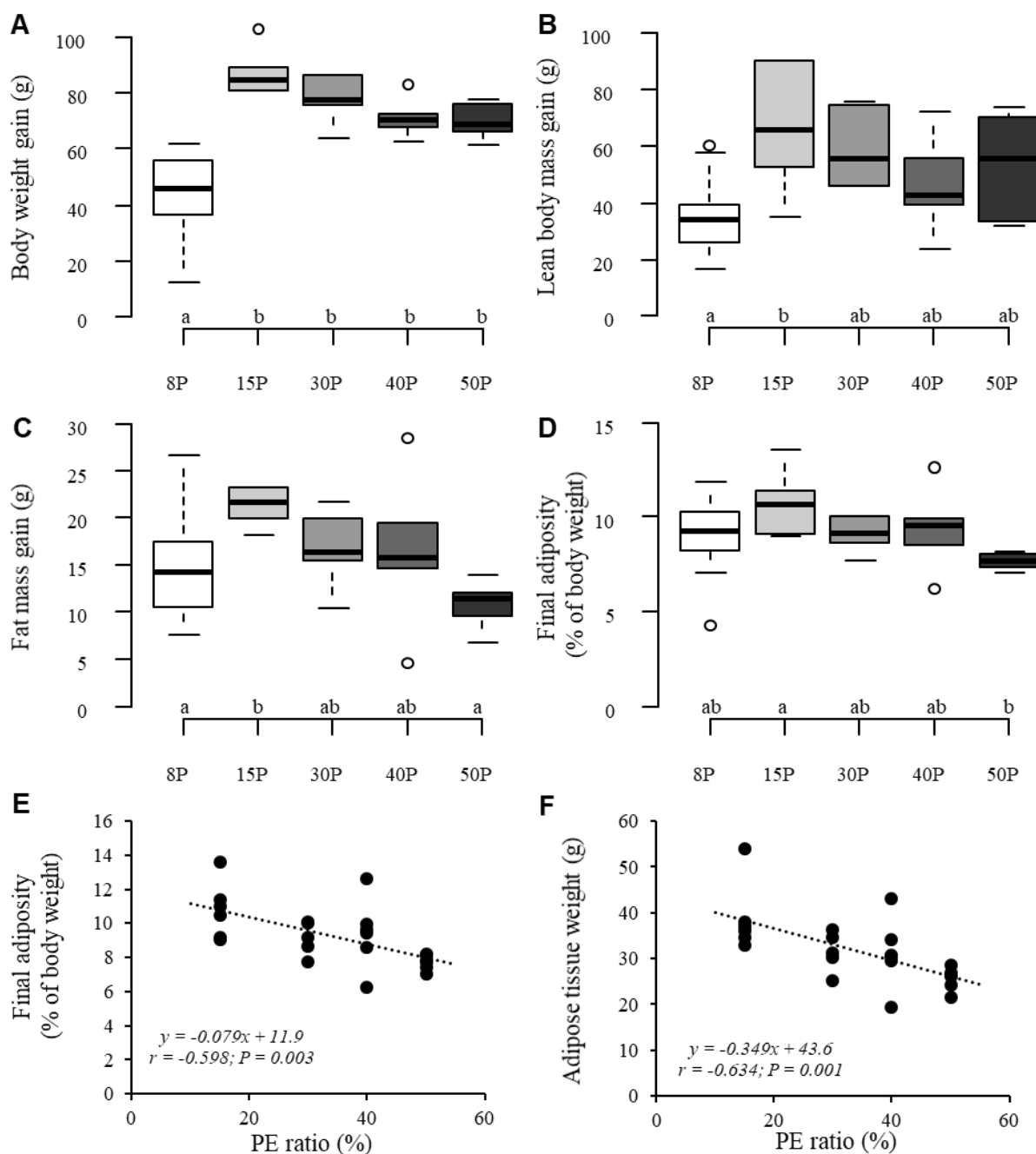
gain were measured throughout the experiment. At the end of the experiment (after three weeks), plasma FGF21 and IGF-1 concentrations were measured, as well as final body composition by dissection (see general method section). Initial body composition of rats in this experiment was estimated from a database built up in our research group. It consisted of a reference group of nine rats of the same strain delivered by the same provider and housed under the same conditions. Mean body weight of this reference group was 267.9 ± 2.2 g, in adequation with 267.1 ± 5.9 g of rats of this study.

Results

Evolution of body weight and body composition

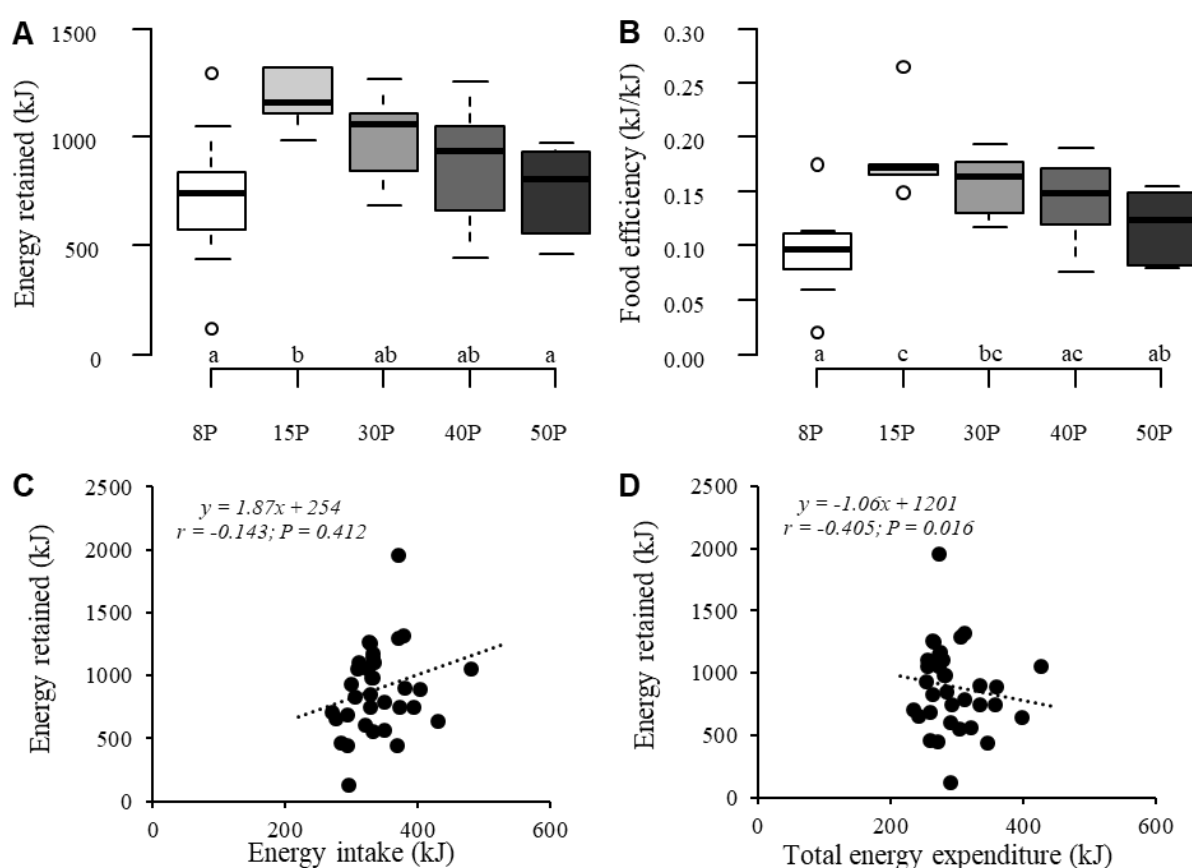
Initial body weight was similar in all groups (general mean = 266 g; ANOVA - $P = 0.455$; Data not shown). Body weight gain was impaired in the 8P-fed rats (**Figure 1A**). Evolution of body composition during the study showed that the deficit in weight gain in the 8P-fed rats was primarily a deficit in LBM gain (**Figure 1B**). Specifically, 8P-fed rats had lower liver (ANOVA - $P = 0.001$), kidney (ANOVA - $P < 0.001$) and skin (ANOVA - $P = 4.91e-5$) weights, but preserved carcass mass (ANOVA - $P = 0.238$) (Data not shown). Fat mass gain was highest in 15P-fed rats and significantly higher than in the 8P and 50P-fed rats (**Figure 1C**), but the adiposity level was not different between groups (**Figure 1D**). We nevertheless observed a negative correlation between the adiposity level and the dietary protein content (i.e. PE ratio) in the groups fed the 15P, 30P, 40P and 50P diets, showing that increasing dietary protein content from 15% to 50% reduced adiposity (**Figure 1E and 1F**).

Figure 1. Body weight gain (g) (A), LBM gain (g) (B), fat mass gain (g) (C), final adiposity level (%) (D) of rats fed 8P, 15P, 30P, 40P and 50P diets for 3 wk; and correlation between PE ratio (%) and adiposity level (%) (E) or adipose tissue weight (g) (F) (Experiment 1, n=5-6). The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests. Values that do not share the same letter are significantly different. PE ratio effect: (A) $P=5.16 \times 10^{-8}$; (B) $P=0.006$; (C) $P=0.022$; (D) $P=0.066$. Correlations between parameters was assessed using the Pearson's correlation coefficient ($P \leq 0.05$). LBM: Lean Body Mass; PE ratio: Protein-to-Energy ratio.



Energy retained in the body was highest in 15P-fed rats and decreased as dietary protein content increased from 15% to 50% ($r = -0.37$, $P < 0.01$), so that 50P-fed rats retained significantly less energy than 15P-fed rats (**Figure 2A**). Energy retained in the body was also significantly lower in 8P-fed rats than in 15P-fed rats. Food efficiency was lowest in the 8P-fed rats, highest in 15P-fed ones, and also decreased progressively as the dietary protein content increased from 15% to 50% (**Figure 2B**). The energy fixed in the body was not correlated to energy intake or total energy expenditure (TEE) (**Figure 2C and 2D**). Effects on bone growth were estimated from tail and limb weights, and showed no difference between groups (ANOVA - $P_{\text{tail}} = 0.132$ and $P_{\text{limb}} = 0.285$; Data not shown).

Figure 2. Energy retained in the body (kJ) (A) and food efficiency (kJ/kJ) (B) of rats fed 8P, 15P, 30P, 40P and 50P diets for 3 wk; and correlation between energy retained (kJ) (C), TEE (kJ) (D) or food efficiency (kJ/kJ) (E) (Experiment 1, $n=5-6$). The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests. Values that do not share the same letter are significantly different. PE ratio effect: (A) $P=0.006$; (B) $P=5.67e-4$. Lines represent the correlation between the parameters and the PE ratio. Correlations between parameters was assessed using the Pearson's correlation coefficient ($P \leq 0.05$). PE ratio: Protein-to-Energy ratio; TEE: Total Energy Expenditure.

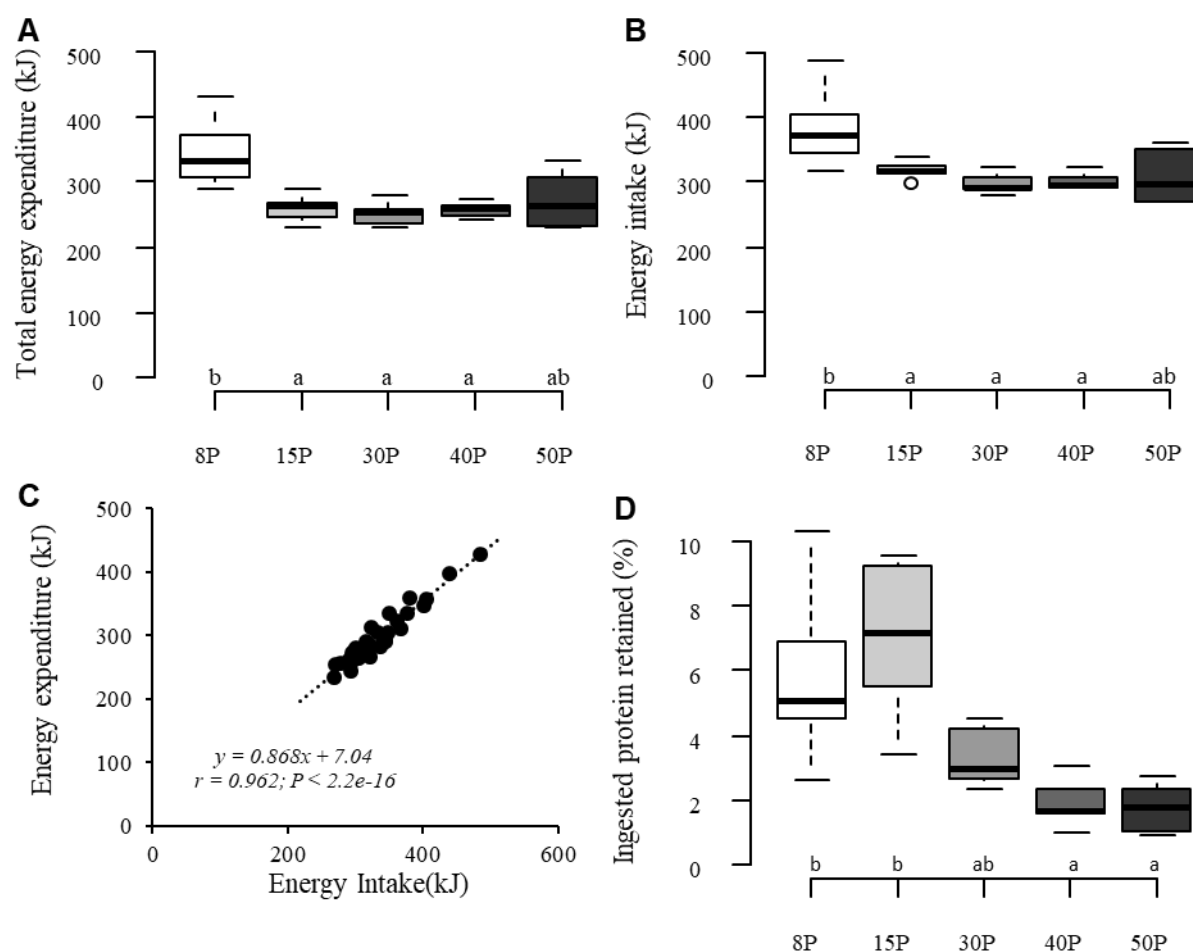


Energy expenditure, energy and protein intake

TEE and energy intake were both higher in 8P-fed rats than in the other groups (**Figure 3A and 3B**) and correlated closely (**Figure 3C**). Analysis within groups showed that the percentage of the ingested

protein retained in the body was larger in the 8P (~5%) and 15P-fed rats (~7%) compared to the 30P (~3%), 40P (~2%) and 50P-fed rats (~2%) (**Figure 3D**).

Figure 3. TEE (kJ) (A), energy intake (kJ) (B), correlation between energy intake (kJ) and TEE (kJ) (C), correlation between protein intake (kJ) and Pox (kJ) (D) and part of the ingested protein retained in the body (%) of rats fed 8P, 15P, 30P, 40P and 50P diets for 3 wk (Experiment 1, n=5-6). The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests. Values that do not share the same letter are significantly different. PE ratio effect: (A) $P=3.31e-4$; (B) $P=5.64e-4$; (D) $P=5.17e-5$. Correlations between parameters was assessed using the Pearson's correlation coefficient ($P \leq 0.05$). Pox: Protein Oxidation; TEE: Total Energy Expenditure.

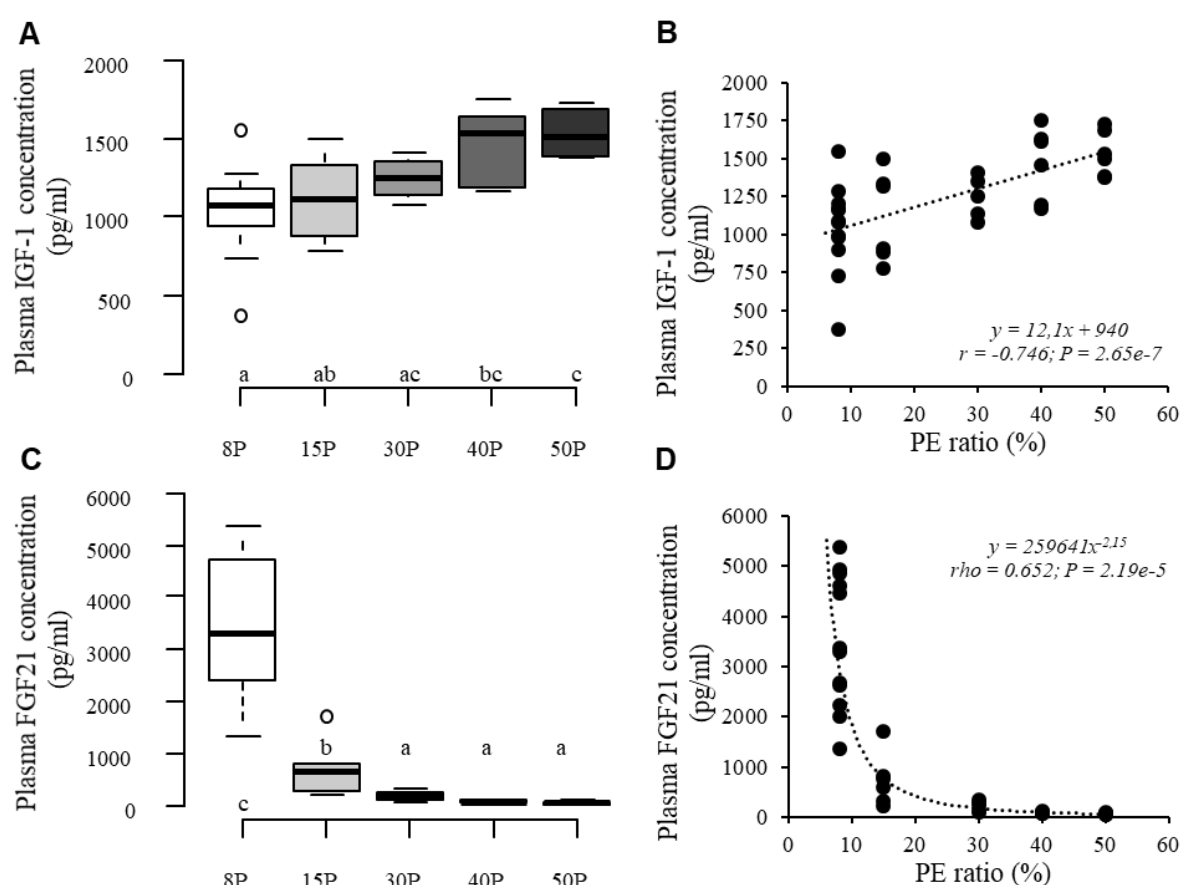


Plasma IGF-1 and FGF21 concentrations

Plasma IGF-1 concentrations were higher in 40P and 50P-fed rats than 8P and 15P-fed rats (~+40%), with 30P-fed rats having an intermediary value (**Figure 4A**). Overall, plasma IGF-1 increased as a linear function of the dietary protein content (**Figure 4B**). FGF21 concentrations were strongly increased in 8P-fed rats but were also significantly higher in 15P-fed rats than in 30P, 40P and 50P-fed rats (**Figure 4C**). FGF21 concentrations evolved as a power function of the dietary protein level (**Figure 4D**). The intragroup variability of FGF21 values, measured as the ratio between standard deviation and mean, was also higher in 15P-fed rats than in the other groups (0.72 vs 0.48 in 8P-fed rats, and 0.33 on average in

30P, 40P and 50P-fed rats). Except between plasma FGF21 and body weight gain ($\rho=-0.414$, $P=0.013$), there were no correlation between plasma FGF21 or IGF-1 concentrations and body weight gain (IGF-1: $r=0.352$, $P=-0.173$), fat mass gain (FGF21: $\rho=-0.217$, $P=0.208$; IGF-1: $r=0.252$, $P=0.145$), LBM gain (FGF21: $\rho=0.203$, $P=0.240$; IGF-1: $r=-0.118$, $P=0.498$) or food efficiency (FGF21: $\rho=-0.173$, $P=0.321$; IGF-1: $r=0.137$, $P=0.431$) (Data not shown).

Figure 4. Plasma IGF-1 concentrations (pg/mL) (A) and its correlation with PE ratio (%) (B); and plasma FGF21 concentrations (pg/mL) (C) and its correlation with PE ratio (%) (D) of rats fed 8P, 15P, 30P, 40P and 50P diets for 3 wk (Experiment 1, $n=5-6$). The diet effects were tested by 1-way ANOVA ($P\leq 0.05$) and post-hoc tests. Values that do not share the same letter are significantly different. PE ratio effect: (A) $P=0.001$; (C) $P=4.75e-6$. Correlations between parameters was assessed using the Pearson's correlation coefficient ($P\leq 0.05$). FGF21: Fibroblast Growth Factor 21; IGF-1: Insulin Growth Factor 1; PE ratio: Protein-to-Energy ratio.



Transition

The results of this first experiment show that in adult rats, a protein content of 8% in the diet was not sufficient to ensure optimal growth, and that a level of 15% appeared to ensure a slightly higher growth than observed when protein intake was increased to 30, 40 and 50%. However, behind this apparently optimal growth, there was also a tendency for 15P-rats to fix more fat and more energy in the body than

30P, 40P and 50P-rats. We also observed more variable and overall higher plasma FGF21 concentrations in 15P than in 30P 40P and 50P-fed rats, suggesting that the 15P diet induced a slight but significant signal of protein deprivation, if assuming that FGF21 is a signal of protein deprivation. Accordingly, in our previously published studies, we observed that rats allowed to self-select between a protein and a protein-free diet usually selected about 30% protein by energy (Gehring et al. 2021; Makarios-Lahham et al. 2004). We also reported that the adiposity of rats fed a 15P diet was larger than that of rats fed a 30P diet (Gehring et al. 2021; Makarios-Lahham et al. 2004). In this context, the intensity of the FGF21 response and/or the sensitivity of rats to circulating concentrations of FGF21 could play an important role in the long-term evolution of body weight and body composition of the 15P-fed rats, as already suggested by the protein leverage hypothesis (Hill et Morrison 2019; Simpson et Raubenheimer 2005). The goal of the second experiment was therefore to test the hypothesis that the generally higher concentrations and higher variability of plasma FGF21 concentrations in 15P-fed rats could be an indicator of dietary protein content adequacy at the individual level. To this end, we investigated the evolution of protein intake and FGF21 concentrations when 15P-fed rats were subsequently allowed to self-select between a pure-protein and a protein-free diet.

Experiment 2: Relationship between FGF21 concentrations under 15P diet and the protein intake level under dietary self-selection

Experimental procedure of experiment 2

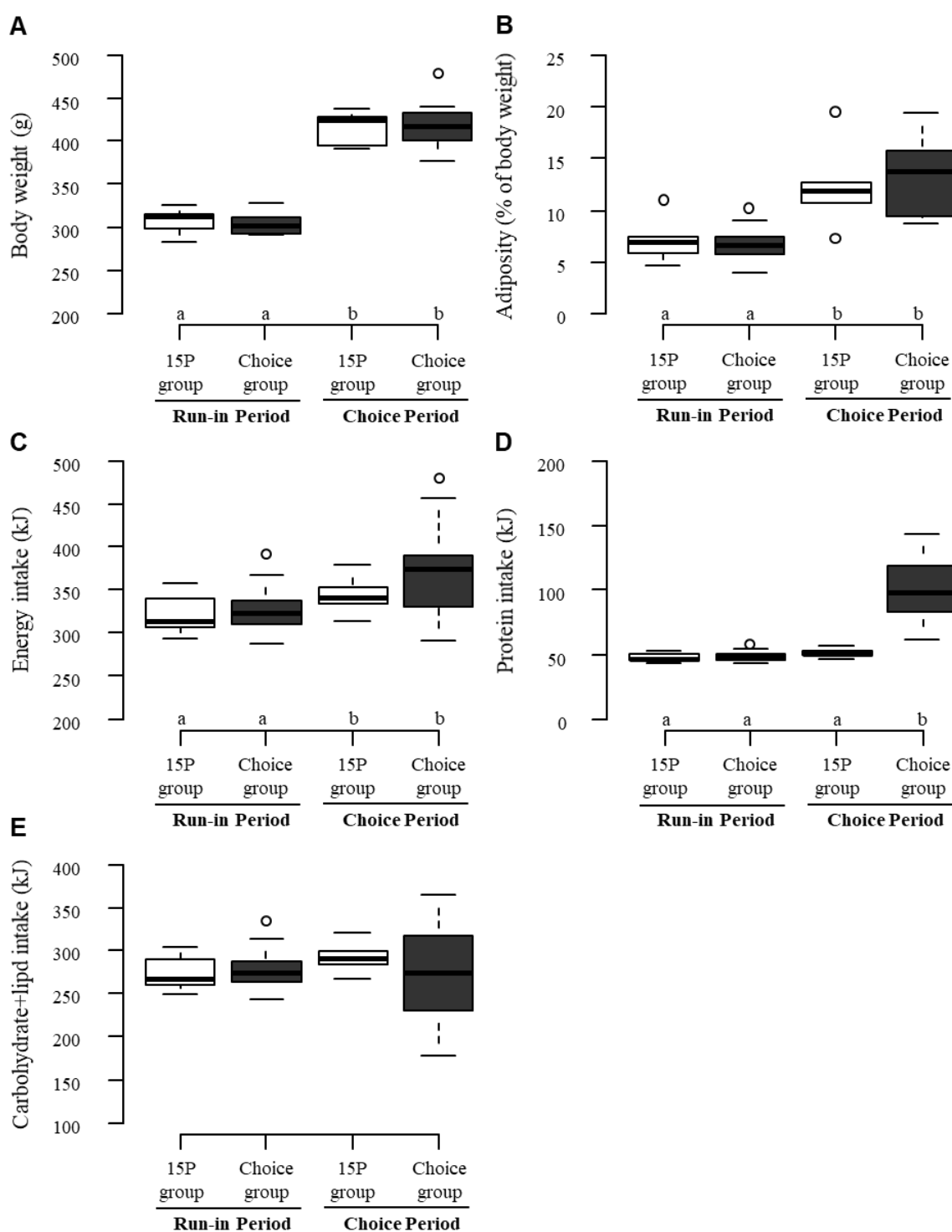
Two groups of rats were used: a control group (n=6) continuously fed the 15P diet for five weeks; and a test group (n=18) fed the 15P diet for two weeks (run-in period) and subsequently allowed to self-select between the 100P and the 60Cnp diets for three weeks (choice period). Thus, regardless of the protein content chosen, the CnpE ratio remained constant at 60% as in the 15P composite diets. Moreover, this group had the possibility to select protein independently from energy. Energy intake and weight gain were measured throughout the experiment. Body composition was measured by IRM at the end of the run-in period, and by dissection at the end of the choice period (see general method section). Plasma FGF21 and IGF-1 concentrations were measured three times: at the end of the run-in period, at the beginning of the choice period, and at the end of the choice period.

Results

Evolution of body weight and body composition

Both groups had the same weight at the end of the run-in period and at the end of the choice period (**Figure 5A**). Adiposity was also similar in both groups at all stages of the experience (**Figure 5B**). Thus, access to self-selection did not modify growth and body composition.

Figure 5. Body weight (g) (A), adiposity level (%) (B), energy intake (kJ) (C), protein intake (kJ) (D) and carbohydrate+lipid intake (kJ) (E) of rats fed 15P diet (control group) or in self-selecting condition (choice group) according to stage of the study (run-in or choice period) (Experiment 2, n=6-18). The run-in period lasted two weeks, then the selection period lasted three weeks. Effects were tested by 2-way ANOVA with repeated measurements ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests. (A) Group effect: $P=0.792$, Period effect: $P=4.30e-20$, Group*Period effect: $P=0.899$; (B) Group effect: $P=0.845$, Period effect: $P=3.09e-13$, Group*Period effect: $P=0.122$; (C) Group effect: $P=0.165$, Period effect: $P=0.001$, Group*Period effect: $P=0.336$; (D) Group effect: $P=6.74e-4$, Period effect: $P=4.79e-9$, Group*Period effect: $P=7.31e-5$; (E) Group effect: $P=0.604$, Period effect: $P=0.689$, Group*Period effect: $P=0.448$.



Energy intake and protein intake

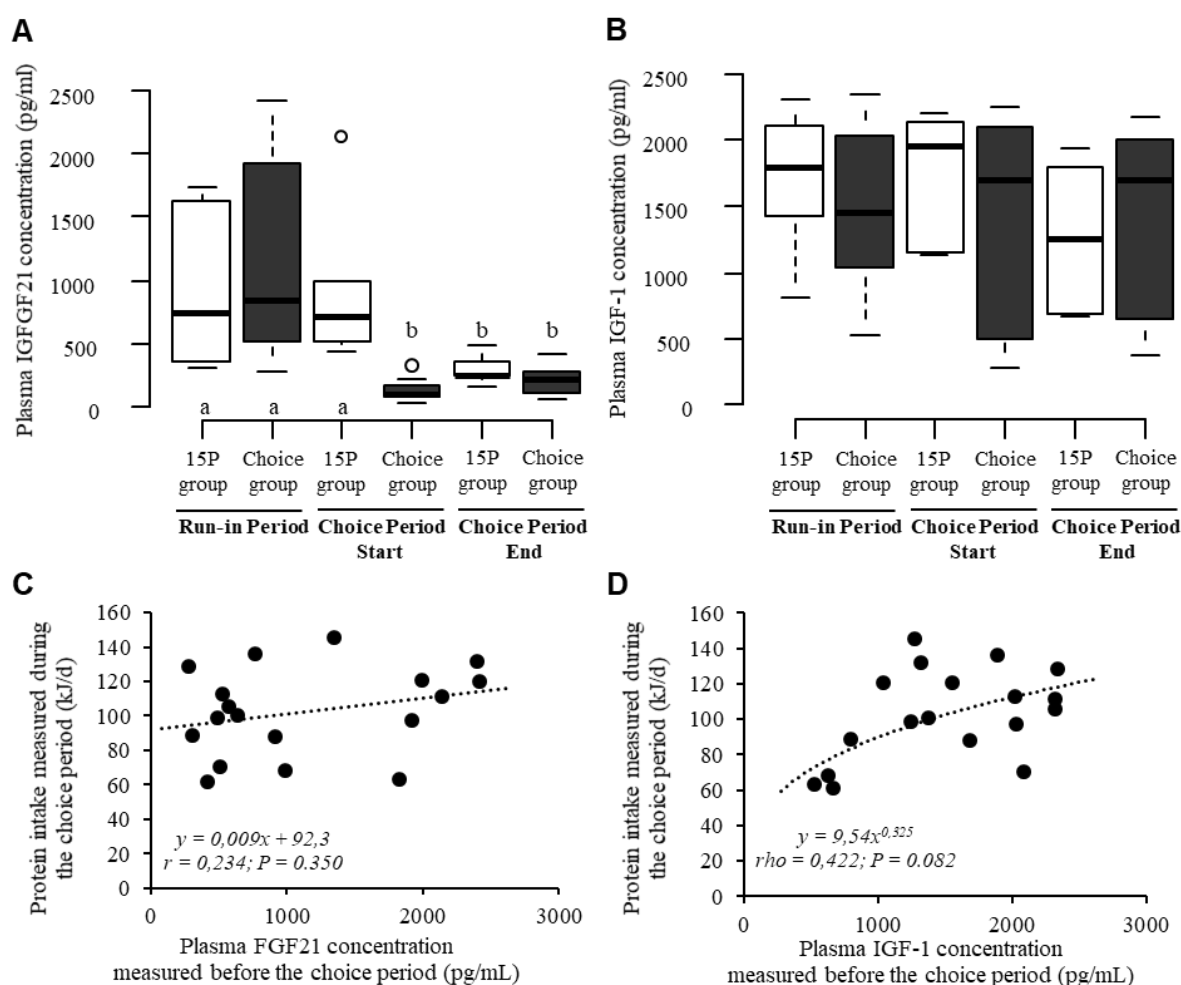
Energy intake was the same in both groups during the run-in period (**Figure 5C**). During the choice period, total energy intake was marginally larger in self-selecting rats. This increase resulted from a strong and significant increase in protein intake (**Figure 5D**) that raised the PE ratio from 15.0% to 26.7%, while intake of the protein-free diet was not changed (**Figure 5E**). This increase in the PE ratio with no change in protein-free diet consumption under the choice condition resulted in a change in the PC ratio, equal to 65.2 ± 6.0 .

Plasma FGF21 and IGF-1 concentrations

During the run-in period, plasma FGF21 and IGF-1 concentrations were similar in both groups (**Figure 6A and 6B**) and were similar to those measured in Experiment 1 regarding their means and their large dispersion. At the beginning of the choice period, FGF21 concentrations had not changed in the 15P control group but had drastically decreased in the self-selecting rats (**Figure 6A**) to concentrations equivalent to those measured in the 40P and 50P-fed rats of Experiment 1. At the end of the choice period, FGF21 concentrations remained very low in the self-selecting rats, but had also significantly decreased in rats maintained on the 15P diet (**Figure 6A**). In contrast, self-selection did not affect plasma IGF-1 concentrations at all (**Figure 6B**).

We did not observe any correlation between plasma FGF21 concentrations during the run-in period and protein intake during the choice period ($P=0.350$; **Figure 6C**). In the same way, we observed no correlation between plasma IGF-1 concentrations during the run-in period and protein intake during the choice period ($P=0.082$; **Figure 6D**). These results showed that there was no relationship between plasma FGF21 or IGF-1 in 15P-fed rats and their subsequent protein intake during self-selection. spontaneous protein consumption under dietary self-selection conditions.

Figure 6. Plasma FGF21 (A) and IGF-1 (B) concentrations (pg/mL) of rats fed 15P diet (control group) or under self-selecting conditions (choice group) according to stage of the study (run-in or choice period); and, only in choice group, correlation between protein intake measured during the choice period (kJ/d) and plasma FGF21 (C) or IGF-1 (D) concentrations (pg/mL) measured during the run-in period. The run-in period lasted two weeks, then the selection period lasted three weeks. During run-in period both groups of rats were fed the 15P diet. Effects were tested by 2-way ANOVA with repeated measurements ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests. Correlations between parameters was assessed using the Pearson's correlation coefficient ($P \leq 0.05$). FGF21: Fibroblast Growth Factor 21; IGF-1: Insulin Growth Factor 1. (A) Group effect: $P=0.112$, Period effect: $P=1.48e-5$, Group*Period effect: $P=1.97e-2$; (B) Group effect: $P=0.485$, Period effect: $P=0.537$, Group*Period effect: $P=0.562$.



Discussion

The first experiment showed that 15% protein in the diet was sufficient to ensure weight gain and lean body mass growth comparable to the growth observed with 30, 40 and 50% protein diets in adult rats, but that even 8% was low enough to induce a significant growth deficit. At first glance, these results suggest that 15% is the optimal level of protein intake. However, the high plasma FGF21 concentrations in some individuals and their tendency to fix more fat suggest that their protein intake may not have been optimal. To test this hypothesis, we investigated the relationship between FGF21 concentrations

under the 15P diet and the level of protein intake under dietary self-selection. The second experiment showed that self-selecting rats almost doubled their level of protein intake and drastically reduced their plasma FGF21 concentrations. This suggests that for most of these rats, protein intake under 15P was not optimal, and that plasma FGF21 concentrations signaled this deficiency. We observed no correlation between FGF21 or IGF-1 concentrations under 15P and the level of protein intake under self-selection. Numerous studies carried out in rats, but also in various omnivorous animal species including humans, have reached a consensus that 10-15% protein in the diet of an adult individual is necessary and sufficient to ensure optimal growth, although this value may fluctuate according to variations in physiological and environmental conditions (Even, Gehring, et Tomé 2021). The food intake, body weight and composition data from this study are in line with previous findings, in that optimum growth was obtained at 15% protein and was not improved by increasing the protein content of the diet. On the other hand, a very clear growth deficit was observed in rats fed an 8% protein diet. However, although we observed the highest weight gain with the 15P diet, analysis of the parallel changes in LBM and fat mass showed a tendency for rats on this diet to accumulate more fat. This could eventually translate into higher fat mass and adiposity levels, particularly in individuals more prone to obesity. We have previously reported that approximately one-third of rats fed the same 15P diet as used in this study for six weeks developed visceral obesity (Azzout-Marniche et al. 2019; Catherine Chaumontet et al. 2015; Nadkarni et al. 2013), a phenomenon not found when the rats were fed a diet containing 30% protein or more (Jean et al. 2001). Indeed, some associations have been suggested between protein intake levels, FGF21 concentrations and predisposition to obesity. For instance, Dulloo and Jacquet reported that low-protein overfeeding revealed susceptibility to obesity in humans (Dulloo et Jacquet 1999). More generally, the protein leverage hypothesis suggests that regulation of protein intake prevails over regulation of energy intake, and therefore, reducing dietary protein content has the potential to induce overfeeding and body-weight gain (Hill et Morrison 2019). In addition, it has been suggested that individual predisposition to weight gain over time can be assessed by 24 h overfeeding with a low-protein diet and measurement of plasma FGF21 concentrations. This is because individuals with a blunted FGF21 response have a thrifty metabolism and are at risk for future weight gain (Vinales et al. 2019). The marked variability in FGF21 concentrations observed in 15P-fed rats in this study may also reflect such a relationship between plasma FGF21 concentrations and predisposition to obesity, either because of a higher requirement for protein intake to regulate energy metabolism or because of insufficiently sensitive FGF21 secretion to low protein intake. We therefore wanted to verify whether there was a correlation between FGF21 concentrations under 15P and the amount of protein ingested under self-selection. This question was based on the hypothesis that the higher the concentrations of FGF21 under 15P, the higher the protein requirements of the individual, and therefore the higher the level of protein ingestion under self-selection.

Under self-selection conditions, rats increased their protein intake up to 27.4% by energy, a value in close agreement with previously published data by our group and others (Gehring et al. 2021; Makarios-Lahham et al. 2004; Musten, Peace, et Anderson 1974; Leibowitz et al. 1991; Jean et al. 2002). Interestingly, the PE ratio resulted in a high protein-to-carbohydrate (PC) ratio (65.0%), also in line with values previously observed in mature rats (Makarios-Lahham et al. 2004; Mayer et al. 1951; Theall, Wurtman, et Wurtman 1984; Yokogoshi, Theall, et Wurtman 1986; Azzout-Marniche et al. 2016). This result is also in accordance with our hypothesis that self-selecting rats may regulate the PC ratio, rather than the PE ratio (Gehring et al. 2021; Even, Gehring, et Tomé 2021). Contrary to our expectation, we observed no correlation between the selected protein intake and the FGF21 concentrations measured under 15P. If we assume that protein intake during self-selection reflected the optimal level sought by rats, plasma FGF21 concentrations under 15P therefore did not anticipate individual protein requirements. In contrast, in all rats, irrespective of their FGF21 concentration under 15P and protein intake during self-selection, FGF21 concentrations were significantly reduced to a mean value of 131 ± 17.7 pg/L. This is an intermediate value between that observed in rats in the first experiment under 30P (216 ± 45.9 pg/L) and 40P (86.5 ± 8.55 pg/L) diets. Consequentially, this result can be interpreted as all rats under self-selection consumed the necessary and sufficient amounts of protein to reduce plasma FGF21 concentrations to very low values.

On the other hand, we observed that the low plasma FGF21 concentrations induced by self-selection remained low throughout the choice period in the self-selecting rats. However, at the end of the choice period, rats maintained on the 15P diet also had significantly reduced plasma FGF21 concentrations. This large decrease could indicate that at this stage (i.e. at 12 weeks of age), the slower growth of the rats reduced the protein requirements and allowed the 15P diet to cover the growth requirements. In previous self-selection experiments, various authors have reported that dietary self-selection varied with age. Some observed that protein intake increased from weaning to puberty (Leibowitz et al. 1991), but we are not aware of studies indicating that the selected PE ratios decreased with age (Leibowitz et al. 1991; Jean et al. 2002; Richter, Holt Jr., et Barelare Jr. 1938). In the present study, we also did not observe that the selected PE ratio decreased during the three weeks of self-selection in self-selecting rats. Taken together, these results suggest that plasma FGF21 concentrations signal adequacy of protein intake but are probably not the only signal that drives protein ingestion.

The first experiment allowed us to quantify with fairly good accuracy the proportion of ingested proteins retained in the body. In principle, this proportion is zero in an adult that has completed its growth, since the LBM remains constant over time. In a continuously growing animal, some of the proteins provided by the diet are fixed in the organism to ensure continuing growth of LBM, but this fraction is very limited compared to the quantities of amino acids provided by the diet. As a result, we indeed observed that only 2 to 5-6% of ingested protein was retained to support LBM growth. In this context, all rats on 15P to 50P diets were able to maintain similar growth in LBM. Logically, to sustain this growth, rats on

15P had to allocate a greater proportion of their protein intake (5-6%). However, rats on 8P showed a significant deficit in LBM growth. It appeared surprising that these rats continued to oxidize ~95% of their protein intake at the expense of LBM growth. Indeed, oxidation of only 90% instead of 95% of the ingested protein would have allowed normal LBM growth. This result suggests that either protein turnover allows only partial recycling of amino acids released by body protein catabolism, or that the use of amino acids as energy substrates was privileged over LBM growth.

In the context of the first hypothesis, the decrease in protein turnover induced by low-protein diets to limit catabolism would also consequentially limit the capacity to integrate amino acids provided by the diet into body proteins. Classically observed adaptations, such as decreased insulin concentrations and decreased GH and IGF-1 concentrations, may underlie this mechanism (Gannon et Nuttall 2006; Levine, Suarez, et Brandhorst 2014; C. Chaumontet, Azzout-Marniche, et Blais 2019). In the second hypothesis, when protein intake is limiting, amino acids in the catabolic pathways would be oriented to maintain a high PE ratio. Reasons for the high PE ratio requirement in catabolic pathways are beyond the scope of this study. Nevertheless, the role of amino acids as a slow and continuous source of glucose to reduce blood glucose variations, and their fundamental anaplerotic role in the maintenance of the Krebs cycle can be considered the origin of the important role of the PE ratio in energy regulation. The amounts of protein ingested under free choice conditions, on average 30% of total energy intake (Gehring et al. 2021; Even, Gehring, et Tomé 2021; Makarios-Lahham et al. 2004; Musten, Peace, et Anderson 1974; Pol et den Hartog 1966), suggest that the optimal PE ratio may be around this value.

If energy regulation mechanisms allow at best only 95% recovery of dietary protein intake for protein synthesis, that rats on the 15P diet are already at this maximum level of recovery, and that lean mass growth is already significantly reduced under 8P, confirm that in young adult rats, the 15P diet is close to the lower limit for maintaining optimal LBM growth. Furthermore, this value is already too low to ensure an optimal PE ratio in energy production. Hence the trend observed in this study and in some of our previous work demonstrated a greater gain in fat mass with the 15P diet than with the 30P diet (Jean et al. 2001).

Analysis of protein and energy intake in the second experiment also revealed that some of the rats only slightly increased their protein ingestion levels during self-selection. In these rats, FGF21 concentrations nevertheless decreased significantly. This observation suggests that in addition to the amount of protein ingested, the pattern of ingestion may have played an important role in the evolution of FGF21 concentrations. In previous studies, we have shown that self-selecting rats ingest protein in a precise manner throughout the day (Makarios-Lahham et al. 2004; Jean et al. 2002; Larue-Achagiotis et al. 1992), and prefer to ingest the protein and protein-free diets in separate meals (more than 10 minutes apart). Thus, it appears that the ability to adapt the protein intake pattern over time may play an important role in the mechanisms that led to a highly significant decrease in circulating FGF21 concentrations in the rats in this study.

Conclusion

In conclusion, a 15% protein diet allows for maximum weight gain, but does not appear to allow for optimal body composition evolution insofar as it tends to promote the fixation of a higher fat mass than that observed with high-protein diets, particularly in a number of individuals who appear to be more susceptible to obesity when fed a high-carbohydrate diet. FGF21 hormone levels on the P15 diet were highly variable and on average higher than on the high-protein diets, suggesting that FGF21 signals a protein intake deficit in these individuals. Further studies are needed to determine whether the variability in plasma FGF21 concentrations on the P15 diet is related to individual variability in the propensity to gain fat on the same diet. In the meantime, the lack of correlation between FGF21 levels in rats fed the P15 diet and protein intake levels measured in the same individuals under choice conditions suggests that FGF21 levels in rats fed the P15 diet do not appear to be representative of individual protein requirements.

Acknowledgments

The authors thank Morgane Dufay for her precious help in the maintenance of rats during the study.

References

- Azzout-Marniche, Dalila, Tristan Chalvon-Demersay, Grégory Pimentel, Catherine Chaumontet, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2016. « Obesity-Prone High-Fat-Fed Rats Reduce Caloric Intake and Adiposity and Gain More Fat-Free Mass When Allowed to Self-Select Protein from Carbohydrate:Fat Intake ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310 (11): R1169-76. <https://doi.org/10/gf9zzv>.
- Azzout-Marniche, Dalila, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Nadezda Khodorova, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2019. « High Pancreatic Amylase Expression Promotes Adiposity in Obesity-Prone Carbohydrate-Sensitive Rats ». *Journal of Nutrition* 149 (2): 270-79. <https://doi.org/10/gjs4jp>.
- Chaumontet, C., D. Azzout-Marniche, et A. Blais. 2019. « Low-Protein and Methionine, High Starch Diets Increase Energy Intake and Expenditure, Increase FGF21, Decrease IGF-1, and Has Little Effect on Adiposity in Mice ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 316 (5): R486-501. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00316.2018>.
- Chaumontet, Catherine, Dalila Azzout-Marniche, Anne Blais, Tristan Chalvon-Dermersay, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2015. « Rats Prone to Obesity Under a High-Carbohydrate Diet have Increased Post-Meal CCK mRNA Expression and Characteristics of Rats Fed a High-Glycemic Index Diet ». *Frontiers in Nutrition* 2. <https://doi.org/10/gg33z2>.
- Devkota, Suzanne, et Donald K Layman. 2011. « Increased Ratio of Dietary Carbohydrate to Protein Shifts the Focus of Metabolic Signaling from Skeletal Muscle to Adipose ». *Nutrition & Metabolism* 8 (1): 13. <https://doi.org/10/dd332m>.
- Dulloo, A.G., et J. Jacquet. 1999. « Low protein overfeeding - a tool to unmask susceptibility to obesity in humans ». *International Journal of Obesity* 23 (11): 1118-21. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801110>.
- Even, Patrick C., Joséphine Gehring, et Daniel Tomé. 2021. « What Does Self-Selection of Dietary Proteins in Rats Tell Us about Protein Requirements and Body Weight Control? » *Obesity Reviews*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/obr.13194>.
- FAO/WHO/UNU Expert Consultation. 1985. « Energy and Protein Requirements ». World Health Organization Technical Report 724. Geneva, Switzerland: World Health Organization. <http://www.fao.org/3/aa040e/aa040e00.htm>.
- Gannon, M.C., et F.Q. Nuttall. 2006. « Control of Blood Glucose in Type 2 Diabetes without Weight Loss by Modification of Diet Composition ». *Nutrition & Metabolism* 3 (16). <https://doi.org/10.1186/1743-7075-3-16>.
- Gehring, Josephine, Dalila Azzout-Marniche, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2021. « Rats Self-Select a Constant Protein-to-Carbohydrate Ratio Rather Than a Constant Protein-to-Energy Ratio and Have Low Plasma FGF21 Concentrations ». *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10/gjn7nq>.
- Hall, Kevin D. 2008. « What is the Required Energy Deficit per unit Weight Loss? » *International Journal of Obesity* 32 (3): 573-76. <https://doi.org/10/btwjqd>.

- Hill, Cristal M., Hans-Rudolf Berthoud, Heike Münzberg, et Christopher D. Morrison. 2018. « Homeostatic Sensing of Dietary Protein Restriction: A Case for FGF21 ». *Frontiers in Neuroendocrinology* 51: 125-31. <https://doi.org/10/gfh76x>.
- Hill, Cristal M., Thomas Laeger, Madeleine Dehner, Diana C. Albarado, Blaise Clarke, Desiree Wanders, Susan J. Burke, et al. 2019. « FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism ». *Cell Reports* 27 (10): 2934-2947.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.022>.
- Hill, Cristal M., et Christopher D. Morrison. 2019. « The Protein Leverage Hypothesis: A 2019 Update for Obesity ». *Obesity* 27 (8): 1221-1221. <https://doi.org/10/gf9wmz>.
- Jean, Clémentine, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Christiane Larue-Achagiotis. 2002. « Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet ». *Physiology & Behavior* 76 (1): 65-73. <https://doi.org/10/d46sg2>.
- Jean, Clémentine, Sophie Rome, Véronique Mathé, Jean-François Huneau, Najat Aattouri, Gilles Fromentin, Christiane Larue Achagiotis, et Daniel Tomé. 2001. « Metabolic Evidence for Adaptation to a High Protein Diet in Rats ». *Journal of Nutrition* 131 (1): 91-98. <https://doi.org/10/ghd2cw>.
- Johnstone, Alexandra M., Graham W. Horgan, Sandra D. Murison, David M. Bremner, et Gerald E. Lobley. 2008. « Effects of a High-Protein Ketogenic Diet on Hunger, Appetite, and Weight Loss in Obese Men Feeding Ad Libitum ». *American Journal of Clinical Nutrition* 87 (1): 44-55. <https://doi.org/10/gf4pt5>.
- Laeger, Thomas, Tara M. Henagan, Diana C. Albarado, Leanne M. Redman, George A. Bray, Robert C. Noland, Heike Münzberg, et al. 2014. « FGF21 Is an Endocrine Signal of Protein Restriction ». *Journal of Clinical Investigation* 124 (9): 3913-22. <https://doi.org/10/f6f43c>.
- Larue-Achagiotis, Christiane, C. Martin, P. Verger, et J. Louis-Sylvestre. 1992. « Dietary Self-Selection vs. Complete Diet: Body Weight Gain and Meal Pattern in Rats ». *Physiology & Behavior* 51 (5): 995-99. <https://doi.org/10/fkfc3k>.
- Leibowitz, Sarah F., Dolores J. Lucas, Karen L. Leibowitz, et Yuliya S. Jhanwar. 1991. « Developmental Patterns of Macronutrient Intake in Female and Male Rats from Weaning to Maturity ». *Physiology & Behavior* 50 (6): 1167-74. <https://doi.org/10/ctrw6j>.
- Levine, M.E., J.A. Suarez, et S. Brandhorst. 2014. « Low Protein Intake Is Associated with a Major Reduction in IGF-1, Cancer, and Overall Mortality in the 65 and Younger but Not Older Population ». *Cell Metabolism* 19 (3): 407-17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.006>.
- Lin, Xiaolong, Yuan Bo Liu, et Huijun Hu. 2017. « Metabolic Role of Fibroblast Growth Factor 21 in Liver, Adipose and Nervous System Tissues ». *Biomedical Reports* 6 (5): 495-502. <https://doi.org/10/gf9hmb>.
- Makarios-Lahham, Lina, Suzanne M. Roseau, Gilles Fromentin, Daniel Tome, et Patrick C. Even. 2004. « Rats Free to Select between Pure Protein and a Fat-Carbohydrate Mix Ingest High-Protein Mixed Meals during the Dark Period and Protein Meals during the Light Period ». *Journal of Nutrition* 134 (3): 618-24. <https://doi.org/10/gf9zzf>.
- Markan, Kathleen R., et Matthew J. Potthoff. 2016. « Metabolic Fibroblast Growth Factors (FGFs): Mediators of Energy Homeostasis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 53: 85-93. <https://doi.org/10/gjs4j5>.

- Mayer, Jean, Margaret M Dickie, Margaret W Bates, J J Vitale, Myron Usdinl, et Jorgen M Birkeland. 1951. « Free Selection of Nutrients by Hereditarily Obese Mice ». *Science* 113: 2. <https://doi.org/10/d4zr3z>.
- Musten, B., D. Peace, et G. H. Anderson. 1974. « Food intake regulation in the weanling rat: self-selection of protein and energy ». *Journal of Nutrition* 104 (5): 563-72. <https://doi.org/10/ghjkfn>.
- Nadkarni, Nachiket A., Catherine Chaumontet, Dalila Azzout-Marniche, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Patrick C. Even. 2013. « The Carbohydrate Sensitive Rat as a Model of Obesity ». Édité par Brenda Smith. *PLoS ONE* 8 (7): e68436. <https://doi.org/10/f5dkrx>.
- Pol, G., et C. den Hartog. 1966. « The Dependence on Protein Quality of the Protein to Calorie Ratio in a Freely Selected Diet and the Usefulness of Giving Protein and Calories Separately in Protein Evaluation Experiments ». *British Journal of Nutrition* 20 (4): 649-61. <https://doi.org/10/dtrq7c>.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et G. C. Fahey. 1993. « AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet ». *Journal of Nutrition* 123 (11): 1939-51. <https://doi.org/10/ghjkfp>.
- Richter, C. P., L. E. Holt Jr., et B. Barelare Jr. 1938. « Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by the self-selection method ». *American Journal of Physiology* 122: 734-44. <https://doi.org/10/ggsg2d>.
- Simpson, S. J., et D. Raubenheimer. 2005. « Obesity: The Protein Leverage Hypothesis ». *Obesity Reviews* 6 (2): 133-42. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2005.00178.x>.
- Skov, A. R., S. Toubro, B. Rønn, L. Holm, et A. Astrup. 1999. « Randomized Trial on Protein vs Carbohydrate in Ad Libitum Fat Reduced Diet for the Treatment of Obesity ». *International Journal of Obesity* 23 (5): 528-36. <https://doi.org/10/dm8wgj>.
- Theall, Cynthia L., Judith J. Wurtman, et Richard J. Wurtman. 1984. « Self-Selection and Regulation of Protein:Carbohydrate Ratio in Foods Adult Rats Eat ». *Journal of Nutrition* 114 (4): 711-18. <https://doi.org/10/ggsgz2>.
- Vinales, Karyne L., Brittany Begaye, Clifton Bogardus, Mary Walter, Jonathan Krakoff, et Paolo Piaggi. 2019. « FGF21 Is a Hormonal Mediator of the Human “Thrifty” Metabolic Phenotype ». *Diabetes* 68 (2): 318-23. <https://doi.org/10/gd972r>.
- Yokogoshi, Hidehiko, Cynthia L. Theall, et Richard J. Wurtman. 1986. « Selection of Dietary Protein and Carbohydrate by Rats: Changes with Maturation ». *Physiology & Behavior* 36 (5): 979-82. <https://doi.org/10/bddqnm>.

2.3.4. Etude 4 - L'auto-sélection des protéines est accrue chez les rats nourris avec des régimes à indice glycémique élevé, ce qui réduit l'augmentation postprandiale de la glycémie

Contexte et objectifs de l'étude

Sous condition d'auto-sélection alimentaire (« *dietary self-selection* » DSS), les rats ont tendance à ingérer plus de protéines que la quantité considérée comme suffisante pour préserver l'équilibre azoté (~15% de l'énergie). De nombreuses études ont rapporté que les rats sous DSS peuvent ingérer jusqu'à 30 à 50% de l'énergie totale sous forme de protéines. Il a été démontré que le ratio protéines/énergie (PE) sélectionné sous DSS est un paramètre ajusté et modifié en réponse à différentes conditions environnementales ou physiologiques, mais aussi à des paramètres alimentaires tels que la qualité des protéines ou la quantité et la qualité des glucides et des lipides dans le régime sans protéine. Par conséquent, les rats ont tendance à ajuster le ratio PE pour réguler le ratio protéines/glucides (PG) entre 60-80%. Dès lors que l'apport protéique atteint 15% et couvre les besoins protéiques, l'excès d'apport protéique semble voué à être utilisé comme substrat énergétique, et à établir un ratio PG qui induirait une régulation optimale du métabolisme énergétique. Ainsi, la réponse comportementale sous DSS, induisant des ratios PE et PG élevés, semble présenter des avantages métaboliques, en particulier une moindre dépendance de l'organisme vis-à-vis du métabolisme du glucose. Notre hypothèse était alors que si les protéines sont ingérées à la place du glucose pour un meilleur contrôle de la glycémie, alors les ratios PE et PG sélectionnés seraient plus faibles lorsque l'indice glycémique (IG) de la source de glucides est bas. A notre connaissance, aucune étude n'a mesuré si le ratio PE sous DSS changeait avec des régimes à IG variables.

L'objectif principal de cette étude était d'examiner si les ratios PE et PG sélectionnés sous DSS sont modifiés par l'IG des régimes sans protéine proposés en parallèle d'un régime purement protéique. Les effets sur les modifications de la glycémie et de l'insulinémie induits par le repas ont également été comparés entre l'ingestion d'un régime à 15% de protéines, d'un régime à 30%, et lorsque les protéines sont données avant les glucides et les lipides. Nous avons également étudié les changements dans l'oxydation des glucides et des lipides induits par l'ingestion de repas à 15% et 30% de protéines.

Méthodes

Trois groupes de rats mâles Wistar ont été utilisés (**Expérience 5 – Page 55**) :

- Un premier groupe a eu le choix pendant 1 semaine entre un régime 100P et un régime sans protéine standard (CF-St). Ils ont ensuite eu le choix pendant 3 semaines entre un régime 100P et l'un des régimes sans protéine à IG variable (CF-St, CF-Sacc riche en saccharose, CF-I supplémenté en inuline ou CF-HF riche en lipides).
- Un second groupe a été nourri pendant 2 semaines avec un des 8 régimes composites, composé de 15% de protéines (niveau équivalent au besoin) ou 30% de protéines (niveau de choix), et l'un des quatre mélanges sans protéine à IG variable.
- Un troisième groupe a été soumis pendant 2 semaines à un choix entre un régime 100P et l'un des quatre régimes sans protéine à IG variable.

Les analyses statistiques ont été effectuées principalement par des tests ANOVA et des tests de corrélation.

Résultats principaux

Dans le premier groupe de rats sous DSS, choisissant durant la phase 1 entre un régime 100P et un régime sans protéine standard, le ratio PE sélectionné était en moyenne de 32%. En phase 2, lorsque le choix comprenait l'un des 4 régimes sans protéine à IG variables, le ratio PE diminuait de 7% avec le régime supplémenté en inuline et de 12% avec le régime gras ($P=1,02e-4$), tous deux étant des régimes à IG faible. Concernant le ratio PG, dans la phase 1, il semble qu'il était moins stable que dans les études précédentes puisqu'il variait de 29% à 102%, mais restait en moyenne égal à 60%. Dans la phase 2, il augmentait de 3% avec le régime riche saccharose et diminuait de 6 avec le riche en graisse et de 19% avec le supplémenté en inuline ($P=8,46e-6$).

Les tests de tolérance au repas (MTT) ont montré que la glycémie était plus faible chez les rats nourris avec les repas 30P par rapport aux 15P, mais n'ont pas montré de différence d'insulinémie. Lorsque l'on compare les MTT de rats nourris avec des repas 30P et ceux avec des repas 30P où les protéines étaient données 15 min avec le mélange de glucides et de lipides, nous constatons qu'il n'y avait pas de différence de glycémie, mais qu'il y avait une plus forte sécrétion d'insuline notamment avec les régimes à IG bas (riche en graisse, supplémenté en inuline).

Les mesures de thermogénèse alimentaire ont mis en évidence que les régimes 15P induisaient un pic d'oxydation des glucides plus élevé que les régimes 30P. De plus, l'effet thermique des régimes 30P était plus faible que celui des 15P.

Dans le dernier groupe, l'analyse des séquences alimentaires sous DSS a montré que les régimes sans protéine à IG variables n'avaient aucun effet sur l'apport énergétique total, le nombre de repas ou la taille des repas. Les rats mangeaient préférentiellement pendant la nuit, en particulier avec les régimes riches en saccharose et supplémenté en inuline. A part sous régimes riche en saccharose, l'ensemble des rats préféraient ingérer les régimes 100P et sans protéine dans des repas séparés. Enfin, les rats mangent préférentiellement des protéines après le mélange de glucides et les lipides lorsque le mélange était riche en saccharose ou en graisse.

Conclusion

Cette étude réaffirme le fait que dans des conditions d'auto-sélection, les rats choisissent de consommer jusqu'à 30% de l'énergie sous forme de protéines, ce qui est bien plus élevé que le besoin en protéines (10-15%). Comme nous l'avions supposé, il est apparu que ce niveau de sélection est réduit lorsque l'IG du régime sans protéine est réduit. Les résultats des tests de tolérance au repas et des mesures de calorimétrie indirecte ont montré qu'un régime à 30% de protéines, par rapport à un régime à 15% de protéines, induisait une réduction de la glycémie et du pic d'oxydation du glucose lorsque le régime avait un IG élevé. De plus, à un ratio PE égal à 30%, la prise séquentielle des régimes protéinés et sans protéine a augmenté la sécrétion d'insuline en réponse à l'ingestion de régimes à faible IG.

Manuscrit de l'article 4

Self-selection of protein is increased in rats fed high-glycemic index diets, which reduces postprandial increase in blood glucose

Josephine Gehring, Dalila Azzout-Marniche, Catherine Chaumontet, Claire Gaudichon, Patrick C. Even

Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE. UMR PNCA, 75005, Paris, France

Corresponding author: Joséphine Gehring, Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, 75005, Paris, France. josephine.gehring@agroparistech.fr

Sources of support: This study was supported by the Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) and by the research unit Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA).

Conflicts of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions: The authors' contributions were as follows: DA-M, JG, and P-CE designed research; CC, DA-M, JG, and P-CE conducted research; JG, and P-CE analysed data; JG, CC, DA-M, CG, and P-CE drafted the original manuscript; JG and P-CE have primary responsibility for final content; and all authors read and approved the final manuscript.

Abbreviations: CnpE ratio: Carbohydrate-to-non-protein-Energy ratios; DSS: Dietary Self-Selection; Gox: Glucose oxidation; Lox: Lipid oxidation; MTT: Meal Tolerance Test; PC ratio: Protein-to-Carbohydrate ratio; PE ratio: Protein-to-Energy ratio; RMR: Resting Metabolic Rate; SEM: Standard Error of the Mean; TEF: Thermic Effect of Food.

Keywords: Dietary self-selection; protein intake; meal tolerance test; glycemia; insulinemia; meal pattern; thermic effect of food.

Introduction

Under dietary self-selection (DSS) conditions, i.e. when macronutrients are presented separately, rats tend almost systematically to ingest more protein than the amount considered a sufficient to preserve nitrogen balance (~15% of energy) (FAO/WHO/UNU Expert Consultation 1985). Many previous studies have reported that rats on DSS can ingest as much as 30% to 50% of total energy as protein (Musten, Peace, et Anderson 1974; Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Castonguay, Kaiser, et Stern 1986; Collier, Leshner, et Squibb 1969; Even, Gehring, et Tomé 2021; Gehring et al. 2021). Some authors suggested that selection of a high protein-to-energy (PE) ratio was rather the effect of a “non-selection” phenomenon, i.e. that protein intake was poorly controlled as long as it remained below toxic levels (e.g. ~50%). However, the selected PE ratio under DSS has been shown to be a parameter adjusted and defended in response to different environmental (temperature) (Donhoffer et Vonotzky 1947; Leshner, Collier, et Squibb 1971) or physiological (age, pregnancy, lactation) (Musten, Peace, et Anderson 1974; Thouzeau 1995; Cohen et Woodside 1989; Tribe 1955) conditions, but also to dietary parameters such as protein quality (Kishi et al. 1982; Henry et Rerat 1963; Ashley et Anderson 1975) (i.e. low-quality protein leads to higher protein consumption) or the amount and quality of carbohydrate and fat in the protein-free diet (Chee, Romsos, et Bergen 1981; Romsos, Chee, et Bergen 1982). For instance, in a previous study (Gehring et al. 2021), we showed that the selected PE ratio of rats selecting between a protein diet and a protein-free diet increased from 20% to 35% when the carbohydrate content of the protein-free diet protein increased from 30% to 70%. This adjustment in protein intake led to regulation of a constant protein-to-carbohydrate (PC) ratio rather than a constant PE ratio. Therefore, this result, together with those reported in other studies, suggest that self-selecting rats adjust the PE ratio to regulate a PC ratio between 60% and 80% (Makarios-Lahham et al. 2004; Gehring et al. 2021; Chee, Romsos, et Bergen 1981; Pol et den Hartog 1966). It is therefore tempting to consider that, once protein intake has reached 15% and is sufficient to cover protein requirements, excess protein intake is bound to be used as an energy substrate and to establish a PC ratio that would induce optimal regulation of energy metabolism. This contribution to energy metabolism then controls energy intake and appears to be responsible for favorable metabolic effects (Richter, Holt Jr., et Barelare Jr. 1938). Thus, the spontaneous behavioral response of rats on DSS, inducing high PE and PC ratios, also appears to have metabolic benefits (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Larue-Achagiotis et al. 1992; Rieth et Larue-Achagiotis 1997), in particular, less dependence on glucose metabolism. This benefit has been tentatively attributed to the fact that increasing the proportion of protein in the diet at the expense of carbohydrate would increase glucagon levels, reduce the postprandial increase in glucose oxidation and decrease lipid oxidation (Rieth et Larue-Achagiotis 1997; Jean et al. 2002; Devkota et Layman 2011; Chaumontet et al. 2015; Acheson et al. 2011), and thus delay and finally limit the development of the metabolic syndrome.

The fact that the PC ratio established by self-selecting rats is such high suggest that, when they have the possibility, rats tend to avoid ingesting too much carbohydrate and ingest protein, not for nitrogen, but for energy instead of carbohydrate. The effects of protein ingestion on insulin secretion and blood glucose levels are fairly complex (Ranawana et al. 2013) and depend largely on whether protein is ingested alone or in combination with glucose and in this later case, if protein is given in addition to glucose or in exchange with glucose. If we try to summarize the complex array of published data, protein given alone induces insulin secretion (Fajans et al. 1967; Mary C. Gannon et al. 2010; F. Q. Nuttall et al. 1991), but less than glucose, and does not increase blood glucose (Berger et al. 1966; Krezowski et al. 1986; Rabinowitz et al. 1966). When given in combination with glucose, insulin secretion may be larger than observed with glucose alone when protein is added to glucose (van Loon et al. 2000; Frank Q Nuttall et al. 1984; M. C. Gannon et al. 1988), but not when it is exchanged with glucose, and in all case, the postprandial rise in blood glucose is lower than when glucose is given alone (Krezowski et al. 1986; Frank Q Nuttall et al. 1984; Frid et al. 2005). Therefore, high-protein diets would reduce the postprandial incursion in blood glucose. In addition, it seems that the insulin response to a mixture of glucose and protein depend on the quantity of protein and the sequence of ingestion (Akhavan et al. 2010; Moghaddam, Vogt, et al. 2006), being different if the protein is given before or together with glucose.

The hypothesis of the present study was that, if proteins are ingested in place of glucose for a better control of blood glucose, then the PE and PC ratios selected under DSS conditions would be lower when the glycemic index of the carbohydrate source is low. Indeed, in the majority of the DSS studies in which rats selected high PE ratios, the carbohydrate content of the protein-free diet was high, and the carbohydrate source was in most cases glucose, sucrose, corn starch or various mixtures of these components that have a high glycemic index. Inversely, the PE ratio (but not the PC ratio) was lower when the protein-free diet was lower in carbohydrate and higher in fat. Such observations would indicate that in DSS, protein intake is indeed adjusted to optimize postprandial changes in glucose and lipid oxidation to prevent excess fat deposition. To our knowledge, no studies however measured if the PE ratio under DSS changed with diets with various glycemic index.

The main objective of this study was to investigate whether the PE and PC ratios selected in DSS are modified by the glycemic index of the protein-free diets offered alongside the protein diet. We also investigated whether, as suggested in our previous studies (Makarios-Lahham et al. 2004; Gehring et al. 2021), protein is preferably ingested separately and before carbohydrate and fat ingestion. The effects on meal-induced changes in blood glucose and insulin levels were also compared between ingestion of a 15% protein diet (required level), a 30% protein diet (selected level in the DSS), and when protein is given before the protein-free meal as function on the glycemic index of the diet. We also studied changes in glucose and lipid oxidation induced by ingestion of 15% and 30% protein meals with different glycemic indices.

General materials and methods

Animals and housing

The experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609 EEC) regarding the care and use of laboratory animals and were approved by the area Ethics Committee (APAFIS#16996). 108 male rats (7-week-old, 215-240 g) of the Wistar RccHan strain were used (ENVIGO, Gannat, France). Upon arrival to the laboratory, they were housed by groups of five during one week to adapt to the laboratory conditions (temperature 22°C ± 1°C, humidity 60%, 12/12 L/D cycle lights on at 08:00), and were fed a standard laboratory. The rats were then singly housed in Plexiglas cages bedded with wood shavings and fed the various semi-synthetic diets used in the study. Body weight (g) was measured twice a week throughout the experiments.

Composition of diets and pellet preparation

Three types of diet were used in the experiments (**Table 1**). A protein diet, named 100P, was composed exclusively by proteins. Four protein-free diets were composed by a carbohydrates-fats (CF) mix (**Table 1**): one consisting of a mixture of 85% carbohydrate (mainly starch) and 15% fat (CF-St) based on AIN-93 recommendations (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993); one based on the CF-St diet composition but in which part of the starch was substituted by sucrose (CF-Sacc); one also based on CF-St diet with inulin supplementation (CF-I); and one high-fat (HF) mix consisting of a mixture of 45% carbohydrates and 55% fat (CF-HF). CF-St diet corresponds to our standard diet, CF-Sacc diet to our high glycemic index diet, and CF-I to our low glycemic diets. Inulin belongs to a class of carbohydrates known as fructans, whose administration lowers blood glucose (Kaur et Gupta 2002). We also added a high-fat mix (CF-HF), which we know has a low glycemic index and induces a lower selected PE ratio than low-fat diets (Gehring et al. 2021). At last, eight composite diets were composed by proteins (15% or 30% by energy) and one of the CF mix, and then named as: 15P-St, 15P-Sacc, 15P-I, 15P-HF, 30P-St, 30P-Sacc, 30P-I and 30P-HF (**Table 1**). The food pellets were prepared twice per week from dry powders manufactured at the unit Sciences de l'Animal et de l'Aliment de Jouy-en-Josas - Equipe Régimes à Façon (Jouy-en-Josas, France). Proteins were whole milk proteins LR 85F (Armor Protein, Nantes, France), carbohydrates were corn starch (Roquette, Lestrem, France) and sucrose (Eurosucrer, Paris, France), and lipids were soy oil (Bailly SA, Aulnay-sous-bois, France). All the diets were complemented with minerals and vitamins according to the AIN-93 requirements (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). The powders were mixed with the necessary amount of water to make a consistent dough and then formed into pellets sufficient for three days of feeding. The pellets were left to dry at room temperature for three days before being given to the rats. The diets and water were provided ad libitum.

Table 1. Composition and energy content of tested diets.

	Protein-free diets				Protein diet	Composite diets							
	CF-St	CF-I	CF-Sacc	CF-HF	100P	15P-St	30P-St	15P-I	30P-I	15P-Sacc	30P-Sacc	15P-HF	30P-HF
Lait (LR85 F) (g/kg)	-	-	-	-	911	140	291	132	274	144	293	184	346
Amidon (g/kg)	730	690	339	528	-	622	493	588	466	269	213	423	327
Saccharose (g/kg)	118	111	509	85.0	-	100	79.4	94.7	75.0	450	356	68.1	52.7
Huile soja (g/kg)	55.0	52.0	55.0	290	-	40.0	40.0	37.8	37.8	40.0	40.0	228	176.3
Sels Minéraux (g/kg)	35.0	35.0	35.0	35.0	31.9	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamines (g/kg)	10.0	10.0	10.0	10.0	9.1	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose (g/kg)	50.0	50.0	50.0	50.0	45.6	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Inuline (g/kg)	-	50.0	-	-	-	-	-	50.0	50.0	-	-	-	-
Choline (g/kg)	2.30	2.30	2.30	2.30	2.10	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30	2.30
Energy (kJ/g)	15.3	14.5	15.7	21.0	14.3	15.0	15.0	14.2	14.2	15.4	15.3	19.5	18.3

Meal tolerance test

Meal tolerance tests (MTT) were performed in the late morning (starting at ~10:00) and afternoon in rats previously fasted for 16 hours since the previous day. A first blood sample was taken in the fasting state (T0') 30 minutes before the ingestion of the test meal calibrated according to the experiments (see experiment descriptions below). Visual inspection allowed to verify that the meal was ingested within 30 minutes. Blood samples were then taken at T60', T120', T180', T240' and T360'. Blood was collected from the tail vein using a needle previously soaked in heparin, put in ice-cold heparinized tubes and centrifuged for 15 min at 4400 rpm (4°C) within 30 minutes. The plasma was then stored at -20°C until the insulin assay performed by ELISA using a commercial kit from ALPCO (80-INSRT-E01). Blood glucose was measured immediately on a drop of blood using an automated analyzer (Life-Scan; One Touch Vita).

Thermic effect of food measured by indirect calorimetry

Measurements of meal-induced changes in glucose and lipid oxidation were performed in condition similar to those used for measurement of blood glucose and insulin, except that the rats were housed in a cage connected to an indirect calorimetry system described in detail in previous publications (Even, Mokhtarian, et Pele 1994; Even et Nadkarni 2012; Even et al. 1991). Accordingly, the rats were housed in the calorimetry cage at 18:00 hours, one hour before light off, with water but no food and were kept overnight in the calorimetry cage. The next morning, at 09:00 the test meal calibrated according to the experiments (see experiment descriptions below) was introduced into the cage and the rats maintained in the calorimetry cage until 17:00. During the experiment, oxygen consumption (VO₂), carbon dioxide production (VCO₂), and motor activity were measured at 2sec. interval to perform a precise analysis of the relationship between changes in oxygen consumption (VO₂), carbon dioxide production (VCO₂) and activity level (Act), and the variations VO₂ and VCO₂ specifically due to activity were removed by Kalman filtering (Even, Mokhtarian, et Pele 1994; Even et Nadkarni 2012; Even et al. 1991). This

process permitted to precisely compute the changes VO_2 and VCO_2 specifically due to changes in the intensity of resting metabolism induced by ingestion of the test-meal without artefact due to the Act level. Resting rates of metabolism (rMR), glucose oxidation (rGox) and lipid oxidation (rLox) were computed from resting VO_2 and resting VCO_2 using standard stoichiometric equations, and assuming that protein oxidation was not significantly increased by activity and was proportional to the dietary protein content. Mean rMR, rGox and rLox during the 3 hours before ingestion of the test-meal were used as baseline values to calculate the changes induced on rMR, rGox and rLox by ingestion of the test-meal.

Meal pattern measurement

In DSS conditions, rats were housed singly for 2 day in cylindrical Plexiglas cages equipped with two weighed food cups (one for 100P diet and one for the protein-free diet) to monitor meal pattern (sensitivity < 0.1g). Food cups were connected to a data acquisition unit plugged into a computer programmed to record data every 10s. The amount of food ingested was converted into kJ (**Table 1**). Two types of meals were defined as follows: “single meals” during which rats ingested a single diet, either the 100P or the protein-free diet, and “mixed meals” during which rats ingested both diets separated by an interval of less than 10 minutes (Castonguay, Kaiser, et Stern 1986). Meal pattern were analyzed to report total meal number, meal size, number of single and mixed meals, and, within mixed meals, the sequence of ingestion of the 100P and protein-free diets.

Experiments

Protein self-selection as a function of the glycemic index of the various diets

The first experiment was performed on 40 rats singly housed, divided into 4 groups of 10. During 1 week (Phase 1), all rats had the choice between 100P and CF-St diets. Then in Phase 2, lasting 3 weeks, the rats were given a choice between 100P diet and one of the four protein-free diets (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) depending on their group. Phase 1 allowed us to correct the food intake data measured in Phase 2, since they may be subject to individual variability. Two MTTs were performed during Phase 2 to study the evolution of glycemia and insulinemia in response to: (i). ingestion of a single 31.5 kJ meal of the various protein-free diets (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) and (ii). ingestion of the same protein-free meals preceded 15 minutes before by ingestion of a 13.5 kJ 100P meal (thus 30% of the energy was provided by this protein meal). This sequence of ingestion (100P then protein-free diet) and establishment of a 30% PE ratio was defined in agreement with the average spontaneous protein intake of rats self-selecting rats reported in a study using the same dietary model (Gehring et al. 2021). This second MTT was then named “30P sequential”.

Effect of choice level (30P) versus requirement level (15P) in relation to glycemic index

Eight groups of 6 rats were fed during 2 weeks with one of the composite diets (**Table 1**), composed with 15% protein (requirement level) or 30% protein (choice level), and one of the four CF mix (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF). In the first week, MTT was performed with a composite meal, according to each group, calibrated at 45 kJ, identical to the sum of the 100P and protein-free meals given in Experiment 1. Thermic effect of the different composite diets was measured by indirect calorimetry during the second week, with similar calibrated meals than for MTTs.

Meal pattern under dietary self-selection

Four groups of 5 rats were subjected for 2 weeks to a choice between 100P diet and one of the four protein-free diets (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) depending on their group. During the second week, the meal pattern of each rat was measured.

Statistical Analysis

Statistical tests were performed using RStudio software (2015; Integrated Development for R, RStudio, Inc.; Boston, USA) and a P-value of $P \leq 0.05$ was considered as significant.

Insulin and blood glucose concentrations measured during MTT were plotted as a function of time. For each type of MTT, time and CF diet (CF-St, CF-Sacc, CF-I and CF-HF) were taken as factors, and differences between groups were analyzed by 2-way ANOVA with repeated measurements. The areas under the curves (AUC) were also determined, represented by boxplot and compared by 1-way ANOVA. Thermogenic response to feeding (TEF), glucose oxidation (Gox) and lipid oxidation (Lox) were plotted as a function of time. Peak rate of Gox, cumulative Gox and TEF were represented by boxplot and analyzed by 2-way ANOVA with PE ratio (15P and 30P) and CF mix (CF-St, CF-Sacc, CF-I and CF-HF) as factors.

Under DSS, the PE and PC ratios selected by rats during Phase 2 were compared by ANCOVA in which CF diet was considered as a factor, and PE and PC ratios selected in Phase 1 as covariates. Correlation analyses were performed between PE or PC ratios and AUC-glucose measured during MTT in response to ingestion of only protein-free meal, and significance of correlations was assessed using the Pearson's correlation test.

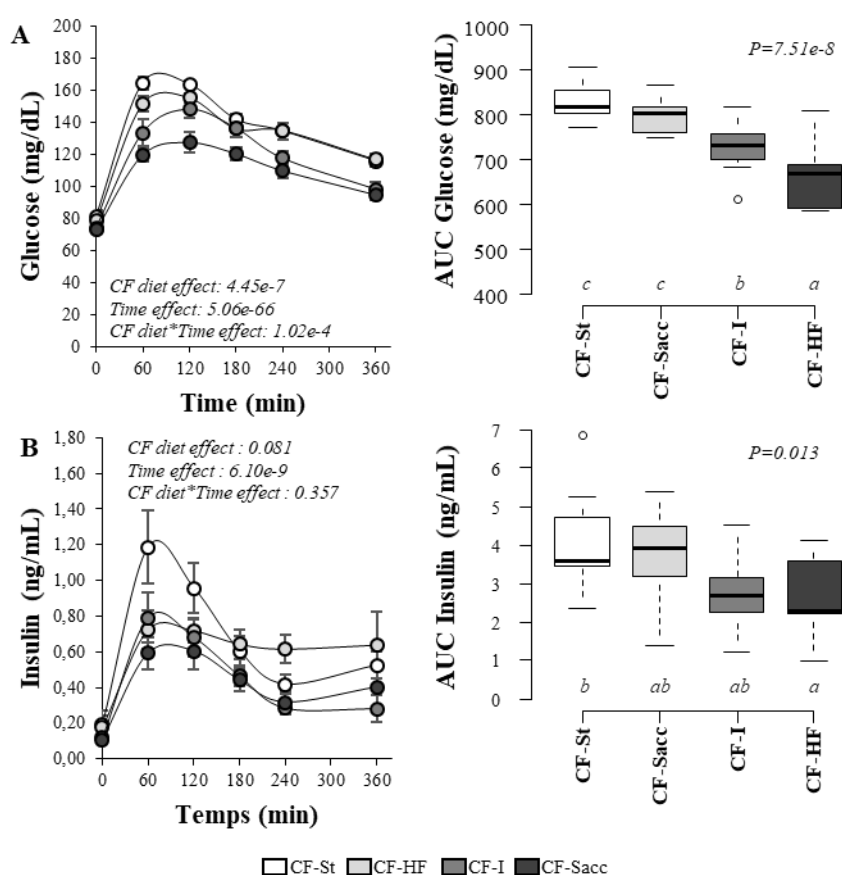
Finally, the parameters of meal pattern were described in a table (means $\pm$ standard error of the mean (SEM)) and compared by 1-way ANOVA (parameter ~ diet). The proportions (% day intake, % mixed meal, % mixed meals starting with the protein diet, and % single protein meals) were compared one by one with a t-test to a theoretical value of 50% corresponding to a random effect. All ANOVA tests with significant effects were followed by Bonferroni post hoc tests.

Results

Glucose and insulin response to ingestion of the various protein-free meals

In response to ingestion of the protein-free meals (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF), the increase in blood glucose levels were significantly lower following ingestion of the CF-I and CF-HF meals than after the CF-St and CF-Sacc meals (**Figure 1A**). However, there were no significant difference between control CF-St and CF-Sacc meals, which indicated that replacement of a significant proportion of starch with sucrose did not increase the glycemic the index. The postprandial rise in plasma insulin also tended to be lower after the CF-HF and CF-I meals than after the CF-St and CF-Sacc meal but the difference was significant only between the CF-St and CF-HF meals (**Figure 1B**).

Figure 1. Comparison of the glucose and insulin responses of ingestion of protein-free diets alone (CF-St, CF-Sacc, CF-I and CF-HF). CF diet and time effects on glucose and insulin concentrations were tested by ANOVA with repeated measurements ($P \leq 0.05$). CF diet effect on AUC was tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). $n=10$. AUC: Areas under the curves; CF: Carbohydrates-fats.



Responses to ingestion of 15P or 30P meals with the various protein-free mix

Glucose and insulin responses

When the protein content of the composite diets was 15%, corresponding to the requirement level, blood glucose responses to meal ingestion were significantly lower after ingestion of the 15P-HF meals than after ingestion of the 15P-St, 15P-Sacc and 15P-I meals (**Figure 2A**). The insulin responses were variable within each group and were highest in response to the 15P-Sacc meals lowest with the 15P-HF meals (**Figure 2B**).

When the protein content of the mixed meals was 30%, corresponding to the choice level, the difference in blood glucose responses to meal ingestion were not different between groups (**Figure 2C**). This was due to the fact that the post-meal increase in blood glucose was lower following ingestion of the 30P-St, 30P-Sacc and 30P-I meals than after ingestion of the respective 15P meals while the glucose response was not different between the 15P-HF and 30P-HF meals (**Figure 3A, C, E and G**). The insulin responses still showed large individual variability which prevented the lower mean insulin responses to the 30P-I and 30P-HF meal to reach significance (**Figure 2D**). Within each group, the insulin response was not significantly different after ingestion of the 15P and 30P meals (**Figure 3B, D, F and H**).

Ingestion of a protein meal 15 minutes before ingestion of the protein-free meal, creating a sequential 30P meal, induced postprandial increases in blood glucose that were very similar between groups (**Figure 2E**), and similar to the responses observed after ingestion of the mixed 30P meals (**Figure 3A, C, E and G**). The rises in plasma insulin did not reveal any more differences between groups (**Figure 2F**) because the insulin responses increased significantly after ingestion of the sequential 30P-I and 30P-HF meals but not after ingestion of the sequential 30P-St and 30P-Sacc meals (**Figure 3B, D, F and H**). Summary, the 15P-HF meals induced lower blood glucose and insulin response than the 15P-St, 15P-Sacc and 15P-I meals. The difference in the blood glucose response was reduced in response to the 30P meals and vanished completely in response to the sequential 30P meals primarily because the glucose response of the 30P-St, 30P-Sacc and 30P-I meals was reduced. In contrast, the insulin response was increased after ingestion of the sequential 30P-I and 30P-HF meals as compared to the response observed with the respective 30P meals.

Figure 2. Comparison of the glucose and insulin responses of ingestion of 15P, 30P and 30P sequential meals according to the CF mix (CF-St, CF-Sacc, CF-I and CF-HF). CF mix and time effects on glucose and insulin concentrations were tested by ANOVA with repeated measurements ($P \leq 0.05$). CF mix effect on AUC was tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). $n=6-10$. AUC: Areas under the curves; CF: Carbohydrates-fats; “15P”: ingestion of composite meals with 15% protein by energy (15P-St, 15P-Sacc, 15P-I or 15P-HF); “30P”: ingestion of composite meals with 30% protein by energy (30P-St, 30P-Sacc, 30P-I or 30P-HF); “30P” seq.: ingestion of a protein meal 15 min before ingestion of a protein-free (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) meal and protein corresponding to 30% of energy.

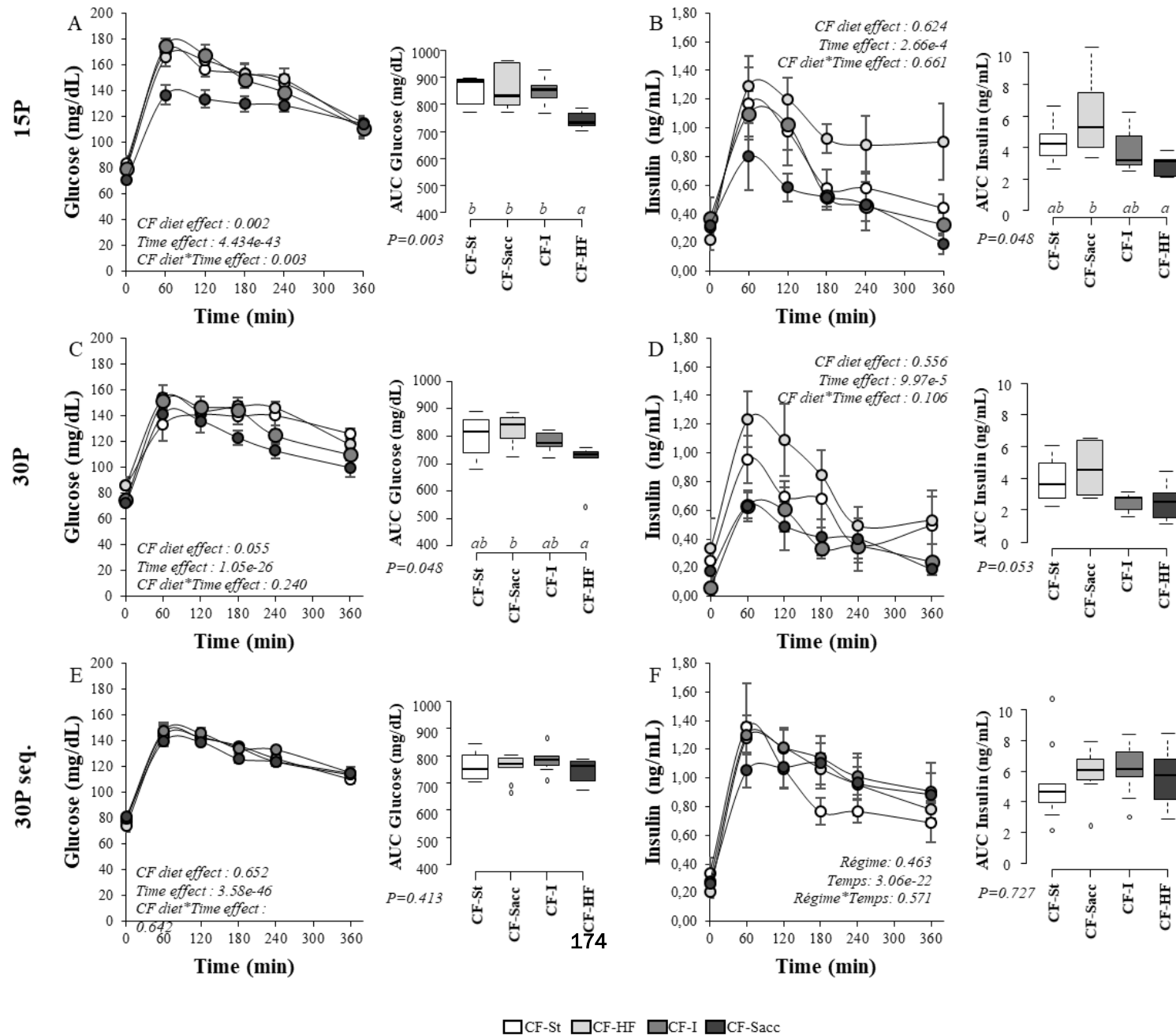
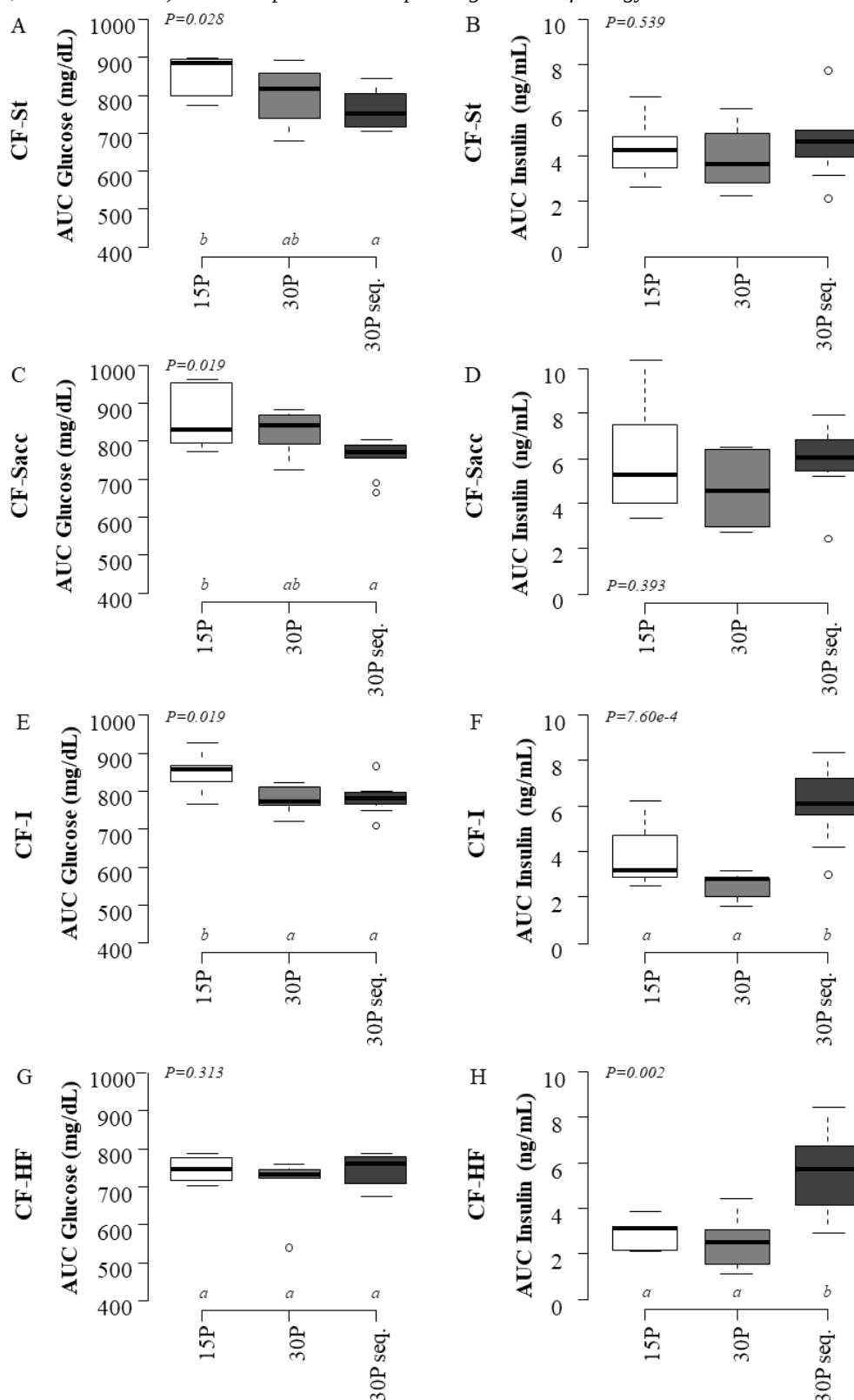


Figure 3. Comparison of AUC-glucose and AUC-insulin according to ingestion of 15P, 30P and 30P sequential meals and to the CF mix (CF-St, CF-Sacc, CF-I and CF-HF). Type of MTT effect was tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). $n=6-10$. AUC: Areas under the curves; CF: Carbohydrates-fats; “15P”: ingestion of composite meals with 15% protein by energy (15P-St, 15P-Sacc, 15P-I or 15P-HF); “30P”: ingestion of composite meals with 30% protein by energy (30P-St, 30P-Sacc, 30P-I or 30P-HF); “30P” seq.: ingestion of a protein meal 15 min before ingestion of a protein-free (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) meal and protein corresponding to 30% of energy.



Glucose oxidation, lipid oxidation and thermogenic response measured

Indirect calorimetry was used to measure the changes in the rates of glucose and lipid oxidation, and the overall thermogenic response to meal ingestion between 15P and 30P composite diets.

The increase in Gox and the decrease in Lox were larger after ingestion of the 15P-St and 15P-Sacc meals than after ingestion of the 15P-I meals (**Figure 4A and B**). This result shows that while inulin supplementation does not significantly reduce postprandial blood glucose elevation after ingestion of a 15P meal, it does have the ability to decrease postprandial peak Gox compared with 15P-St and 15P-Sacc (**Figure 5A**). In line with the reduced increase in blood glucose and plasma insulin previously observed, ingestion of the 15P-HF meals induced the lowest changes in Gox and Lox. However, the cumulative increase in Gox measured over 6 hours was not different after ingestion of the various 15P-St, 15P-Sacc and 15P-I meals (**Figure 5B**), showing that the main effect of the replacement of starch by sucrose or inulin supplementation was to affect the post meal glucose oxidation kinetic without affecting overall glucose oxidation. On the other hand, since the increases in Gox and the decreases in Lox were strongly symmetrical in all groups, the overall thermogenic response to meal ingestion was similar with the 4 diets (**Figure 4C and 5C**).

No differences in the meal-induced changes in Gox and Lox were observed after ingestion of the 30P-St, 30P-Sacc and 30P-I meals (**Figure 4D-E and 5A**), primarily because the Gox and Lox changes induced by the 30P-St and 30P-Sacc meals were of lower amplitude than after ingestion of the respective 15P diets while the response was only marginally reduced for the 30P-I meals (**Figure 5A and 6A-F**). The Gox and Lox response to ingestion of the 30P-HF meals was also similar to the response observed after ingestion of the 15P-HF meals (**Figure 6G-H**) and remained significantly lower than those observed after ingestion of the 30P-St, 30P-Sacc and 30P-I meals (**Figure 6A**). The thermogenic response to ingestion of the 30P meals was also not different between groups (**Figure 4F and 5C**).

The response kinetics to the various 15P and 30P meals (**Figure 4C, 4F, 6C**) showed that the thermogenic response to the 30P meals was globally lower than the thermogenic response to the 15P meals. Indeed, when the thermogenic response of all 15P meals were pooled and compared to the thermogenic responses of all 30P meals (**Figure 6D**), the mean increases in rMR after ingestion of the 15P meals remained above the increase after ingestion of the 30P meals throughout the 6 hours of measurement.

Figure 4. Changes in glucose oxidation, lipid oxidation and thermogenic effect of food: CF mix effect (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF). CF: Carbohydrates-fats; “15P”: ingestion of composite meals with 15% protein by energy (15P-St, 15P-Sacc, 15P-I or 15P-HF); “30P”: ingestion of composite meals with 30% protein by energy (30P-St, 30P-Sacc, 30P-I or 30P-HF).

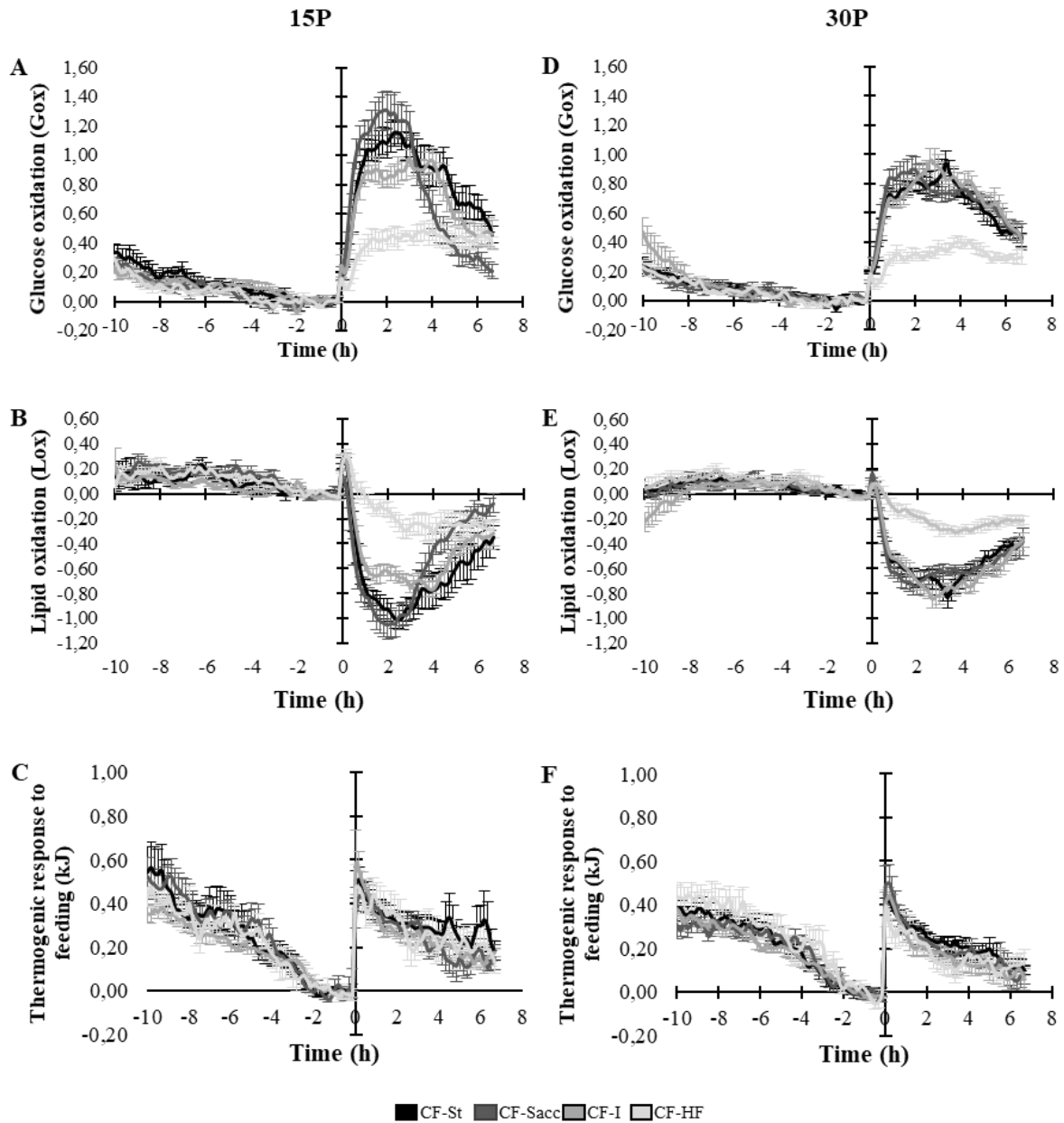


Figure 5. Peak rate of glucose oxidation, cumulative glucose oxidation, thermogenic response to feedings and meal-induced changes in RMR according to protein level (15P or 30P) and CF mix (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF). CF mix and protein level (PE ratio) effect were tested by 2-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). $n=6$. AUC: Areas under the curves; CF: carbohydrates-fats; “15P”: MTT with ingestion of composite meals with 15% protein by energy (15P-St, 15P-Sacc, 15P-I or 15P-HF); “30P”: MTT with ingestion of composite meals with 30% protein by energy (30P-St, 30P-Sacc, 30P-I or 30P-HF).

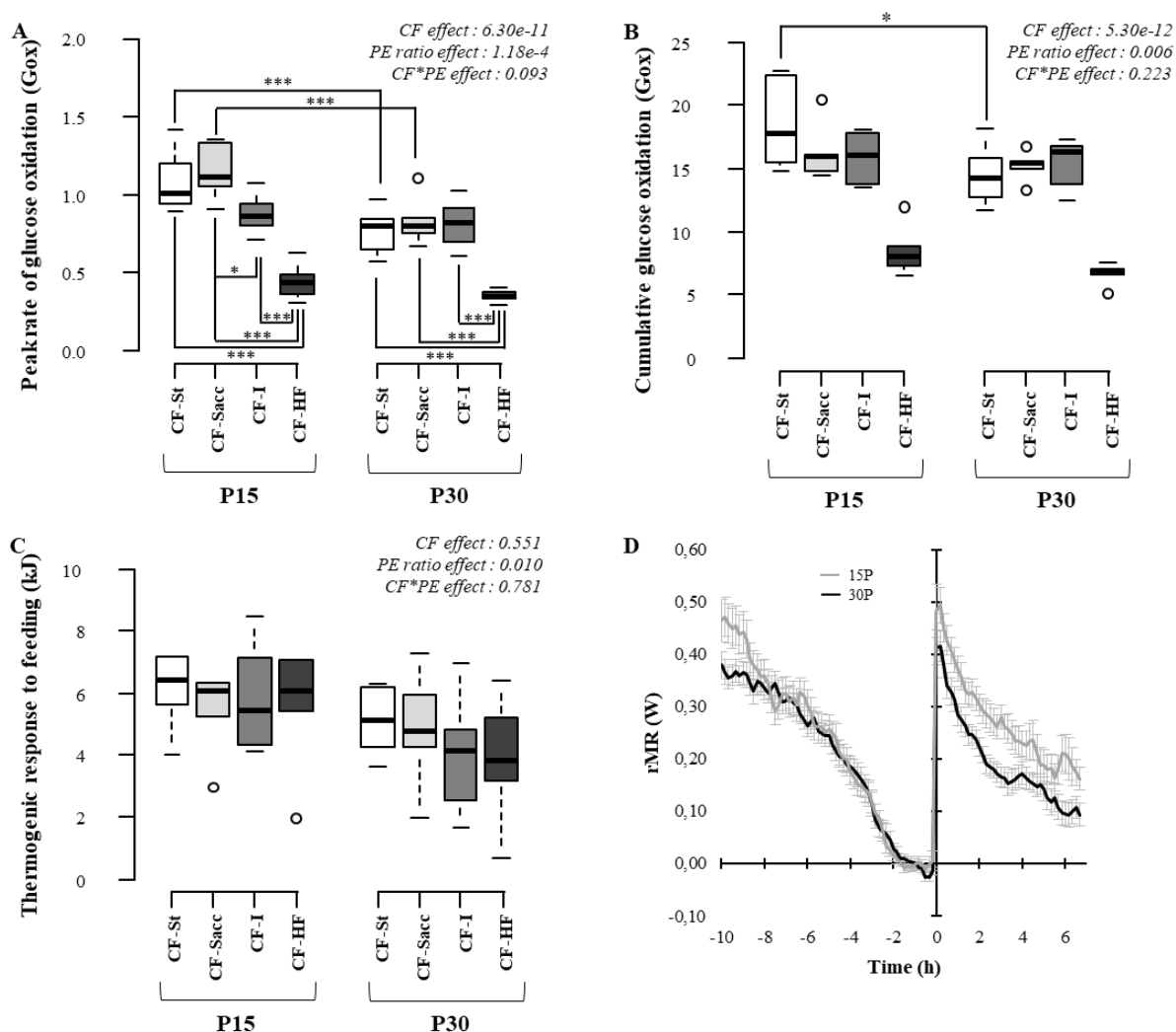
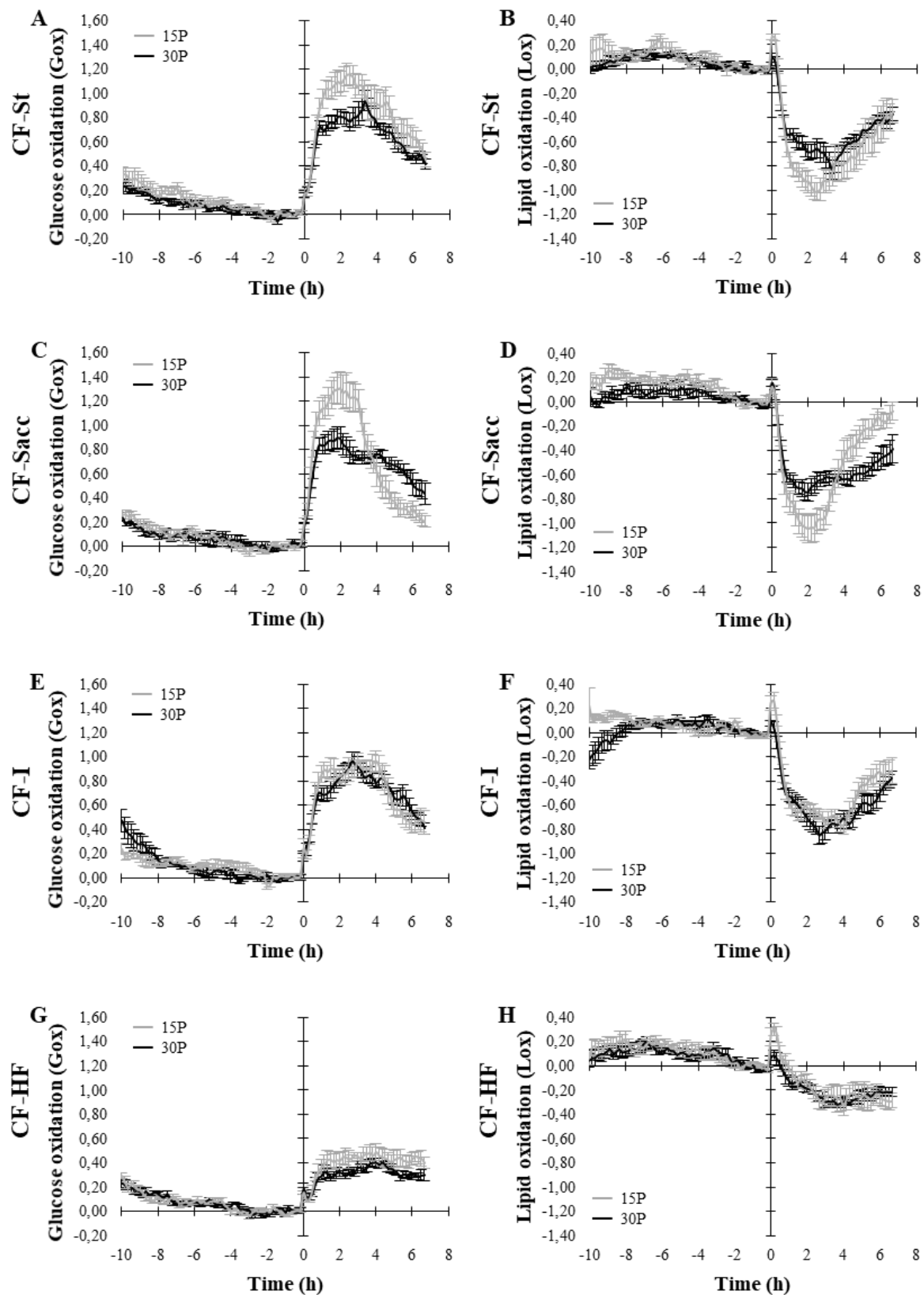


Figure 6. Changes in glucose oxidation, lipid oxidation and thermogenic effect of food according to each CF mix (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF): protein level effect (15P or 30P). CF: Carbohydrates-fats; “15P”: ingestion of composite meals with 15% protein by energy; “30P”: ingestion of composite meals with 30% protein by energy.



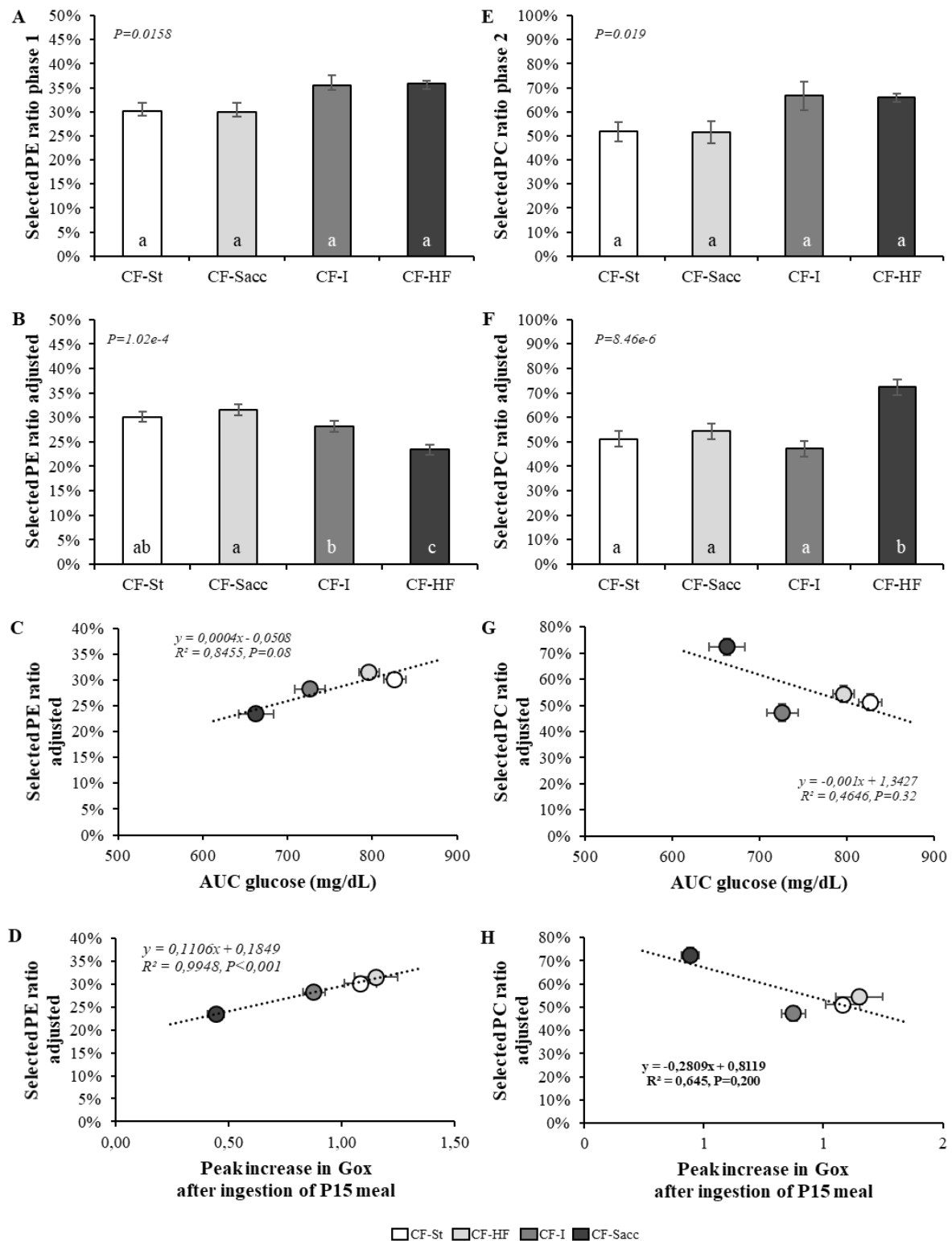
Protein choice according to the glycemic index and peak increase in glucose oxidation

Under DSS, during Phase 1, all rats had the choice between 100P and CF-St diets, and then during Phase 2, they had the choice between 100P diet and one of the four protein-free diets (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) depending on their group.

During Phase 1, all rats individually selected PE ratio ranging from 22.2% to 45.4% with a mean value of $32.2 \pm 0.9\%$. According to the groups, rats in the CF-I ($35.6 \pm 2.1\%$) and CF-HF ($35.9 \pm 0.6\%$) groups tended to consume slightly more protein than the CF-St ($30.2 \pm 1.6\%$) and CF-Sacc ($30.0 \pm 1.9\%$) groups (**Figure 7A**). However, the post-hoc test did not reveal any significant differences between the groups. To remove noise due to interindividual variability in protein selection, the means of the PE ratios measured in phase 2 were adjusted using the PE ratios measured in phase 1 as covariates. During Phase 2, analysis showed that rats in the CF-St and CF-Sacc groups did not change their selected PE ratio, while the rats in the CF-I group reduced their PE ratio by 7.35% and those in the CF-HF diet reduced their PE ratio by 12.5% (**Figure 7B**). This leads to a significant effect of the protein-free diets on protein selection, especially of the CF-HF diet inducing a significantly lower PE ratio than all other diets, and the CF-I diet inducing a lower PE ratio than the CF-Sacc diet. Furthermore, these decreases tended to correlate, although not significantly, with the AUC-glucose measured during MTT in response to ingestion of only protein-free meals (**Figure 7C**). However, it correlated significantly with the peak increase in Gox measured after ingestion of the 15P meals (**Figure 7D**).

During Phase 1, all rats selected PC ratio ranging from 28.8% to 101.6% with a mean value of $57.6 \pm 1.8\%$. As for the PE ratio, according to the groups, rats in the CF-I ($66.6 \pm 5.9\%$) and CF-HF ($65.9 \pm 1.7\%$) groups tend to have a slightly higher PC ratio than the CF-St ($51.8 \pm 3.9\%$) and CF-Sacc ($51.6 \pm 4.7\%$) groups, but also the post-hoc test did not reveal any significant differences between the groups (**Figure 7E**). During Phase 2 (using PC ratios measured in Phase 1 as covariates), rats in the CF-St groups did not change their selected PC ratio, while rats in the CF-Sacc increased their PC ratio by 2.85%, in CF-HF group by 6.46% and those in the CF-I diet reduced their PC ratio by 19.4% (**Figure 7F**). However, this only leads to a significant difference between the PC ratio in the CF-HF group compared with all other groups. PC ratios did not correlate with the AUC-glucose measured during MTT in response to ingestion of only protein-free meals (**Figure 7G**) and with the peak increase in Gox measured after ingestion of the 15P meals (**Figure 7H**).

Figure 7. Evolution of PE and PC ratios with the glycemic index of the protein-free diet (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF). A, B, E and F: CF diet effect was tested by 1-way ANOVA ($P \leq 0.05$) and post-hoc tests (values with different letter are significantly different). C, D, G and H: correlation was tested by Pearson test. $n=10$. AUC: Areas under the curves; CF: Carbohydrates-fats; PC ratio: Protein-to-carbohydrate ratio; PE ratio: Protein-to-energy ratio.



Meal pattern according to the glycemic index

Meal pattern analysis during DSS showed that protein-free diets (CF-St, CF-Sacc, CF-I, or CF-HF) had no effect on total energy intake, number of meals, or meal size (**Table 2**). Energy intake during day was also not impacted by protein-free diets, but during night it seemed to be lower in the CF-I and CF-HF groups than in CF-St and CF-Sacc groups. The rats preferentially ate during night as the percentage of total energy intake during the day was less than 50%, specifically in the CF-Sacc and CF-I groups. Concerning protein diet (100P) intake, all rats, except those in the CF-HF group, preferred to consume protein during the night. Finally, the protein-free diets were also preferred during the night in the CF-Sacc and CF-I groups.

Table 2. Energy intakes and meal pattern under dietary self-selection with a choice between a protein diet and a protein-free diet (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF). Values are mean $\pm$ SEMs, $n=5$. ¹ P are for ANOVA test. Means with different letters within a line are statistically different ($P \leq 0.05$). CF: Carbohydrates-fats

	CF-St	CF-Sacc	CF-I	CF-HF	P^1
Total energy intake (kJ/d)	304 $\pm$ 35.4	285 $\pm$ 17.9	248 $\pm$ 14.4	279 $\pm$ 24.9	0.464
Day total energy intake (kJ)	95.4 $\pm$ 11.1	44.4 $\pm$ 8.81	61.61 $\pm$ 5.02	104 $\pm$ 38.3	0.083
Night total energy intake (kJ)	208 $\pm$ 37.5 ^a	240 $\pm$ 12.4 ^a	186 $\pm$ 12.0 ^a	175 $\pm$ 15.82 ^a	0.047
% day total intake	33.3 $\pm$ 6.85	15.3 $\pm$ 2.34*	25.0 $\pm$ 1.66*	34.3 $\pm$ 11.2	0.080
% day protein diet intake	14.0 $\pm$ 6.28*	8.06 $\pm$ 1.76*	5.38 $\pm$ 5.38*	33.4 $\pm$ 13.4	0.227
% day protein-free diet intake	44.2 $\pm$ 12.3	16.8 $\pm$ 2.98*	29.9 $\pm$ 2.56*	33.1 $\pm$ 10.7	0.131
Meal number	15.3 $\pm$ 1.56	13.9 $\pm$ 1.09	18.0 $\pm$ 2.21	14.0 $\pm$ 0.82	0.226
Meal size (kJ)	31.1 $\pm$ 5.31	31.8 $\pm$ 5.12	20.2 $\pm$ 1.69	21.8 $\pm$ 1.25	0.078
% mixed meals	6.89 $\pm$ 2.56*	34.0 $\pm$ 8.75 ^b	18.6 $\pm$ 2.15 ^{ab} *	11.4 $\pm$ 5.93 ^{ab} *	0.031
% mixed meals starting with the protein diet	37.5 $\pm$ 23.9	10.8 $\pm$ 4.14*	47.9 $\pm$ 20.5	3.3 $\pm$ 3.3*	0.399
% single protein meals	39.6 $\pm$ 6.89	55.1 $\pm$ 7.71	36.7 $\pm$ 4.20*	42.0 $\pm$ 1.38*	0.162

The rats in the CF-St, CF-I and CF-HF groups preferred to ingest 100P and protein-free diets in separate meal (**Table 2**), as the percentage of mixed meals was significantly lower than 50% in contrast to the CF-Sacc group, which had no preference between single or mixed meal. When mixed meal occurred, the sequence of ingestion 100P diet then protein-free diet was significantly smaller than 50% only in the rats in the CF-Sacc and CF-HF groups, showed that they preferentially ate protein after the consumption of protein-free diet, so after carbohydrate and fat. Finally, concerning the single meals (either 100P diet or protein-free diet), we can see that CF-I and CF-HF rats had a slight preference for the consumption of single protein-free meal.

Discussion

This study reaffirms the fact that in self-selection conditions, rats choose to consume up to 30% of energy as protein, much higher than the protein requirement (10-15%). As we hypothesized, it appeared that this selection level is reduced when the glycemic index of the protein-free diet is reduced. Results of meal tolerance tests and indirect calorimetry measurements showed that a 30% protein diet, as compared to a 15% protein diet, induced a reduction in blood glucose and peak glucose oxidation when the diet had a high glycemic index. In addition, at a PE ratio equal to 30%, the sequential intake of the protein and protein-free diets, as it happens under dietary self-selection conditions, increased insulin secretion in response to ingestion of low glycemic index diets.

Protein intakes, insulin secretion and blood glucose

We first assessed the differences in the glycemic index of the protein-free diets. Our results showed that ingestion of CF-I meals reduced the glycemic response compared to CF-St and CF-Sacc meals. In addition, the peak increase in the rate of glucose oxidation (Gox) was lower after ingestion of the 15P-I meals than after ingestion of the 15P-St and 15P-Sacc meals. Therefore, addition of inulin decreased the glycemic index of the diets. On the other hand, most probably because of its lower carbohydrate content, the CF-HF meals had the lowest glycemic index and the 15P-HF meals induced the lowest increases in the rate of Gox. In contrast, the replacement of starch by sucrose, in the CF-Sacc diet did not increase the blood glucose response in MTT as compared to CF-St control diet. This lack of effect may be explained by the fact that sucrose is half glucose and half fructose, and blood fructose was not measured by the automated analyser. Thus, as mentioned by Theytaz et al., there must have been a significant increase in blood fructose levels with sucrose ingestion (Theytaz et al. 2014), which we did not measure. However, indirect calorimetry measurements showed that post-meal increase in carbohydrate oxidation (glucose + fructose) tended to increase then decrease more sharply after the CF-Sacc meals than after the CF-St meals.

The MTT studies also showed that increasing the protein level of the composite diets from 15% to 30% decreased the post meal increase in blood glucose, but unlike other studies (Ranawana et Kaur 2013; Moghaddam, Vogt, et Wolever 2006), we did not observe difference in insulin secretion in response to ingestion of the 15P and 30P diets. The 30P diets also decreased the peak rates of Gox as compared to those observed after ingestion of the 15P-St and 15P-Sacc diets, but not after ingestion of the 15P-I and 15P-HF diets after which the increase in Gox was smoother. Finally, sequencing the ingestion of the protein and protein-free diets (30P sequential) tended to stimulate insulin secretion in response to ingestion of the 30P-I and 30P-HF diets, but this increase did not affect blood glucose levels. The majority of studies that have investigated the relationship between protein and insulin using either composite diets (van Loon et al. 2000; Frank Q Nuttall et Billington 1984; M. C. Gannon et al. 1988) or protein before carbohydrate (Akhavan et al. 2010), we chose to compare these two modes of ingestion.

Dietary self-selection

We analyzed the meal pattern of rats self-selecting between the 100P diet and the various protein-free diets (CF-St, CF-Sacc, CF-I or CF-HF) to test: I. the hypothesis that the selected PE ratio would be higher when the glycemic index of the protein-free diet is higher; II. if the rats would prefer to separate or mix ingestion of the 100P and protein-free diets; III. if they would prefer to ingest the 100P diet before the protein-free diet in the case of mixed meals.

High level of protein consumption

As already observed in studies with dietary self-selection (DSS) models (Musten, Peace, et Anderson 1974; Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Castonguay, Kaiser, et Stern 1986; Collier, Leshner, et Squibb 1969; Even, Gehring, et Tomé 2021; Gehring et al. 2021), the rats in choice consume a high level of protein (~32%). This value corresponds to approximately two times the protein requirement (15%), which represents a very significant increase. We have shown in a previous study with the same type of choice (100P protein diet + protein-free diets with various carbohydrate contents) that this level of protein consumption was controlled and linked to the level of carbohydrates in the protein-free diet. We reproduced this result in our study, since the rats having the choice between a 100P protein diet and a CF-HF protein-free diet selected the lowest PE ratio. The establishment of high PE ratio appear to have beneficial effects on energy metabolism. Indeed, when the level of ingested protein (i.e. corresponding to the protein requirement) has fulfilled the essential functions in protein metabolism, the excess of protein consumption and more specifically the excess of amino acid is used as energy substrate. This use of protein balances the use of fat and carbohydrates, and appears to have health benefits (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Even, Gehring, et Tomé 2021; Larue-Achagiotis et al. 1992; Rieth et Larue-Achagiotis 1997; Richter, Holt Jr., et Barelare Jr. 1938). In this study, beneficial effects on glycemic response were demonstrated, as explained in the previous paragraph. There is in addition a reducing effect on the overall thermic effect of diet and on the oxidation of carbohydrates by diets which contain 30% protein, corresponding to the chosen level, compared to 15%. This inhibition with 30% protein then reduces the effect of high glycemic index diets on carbohydrate oxidation. However, no decrease in cumulative lipid oxidation was observed, contrary to the results of some studies which show an inhibition of lipid oxidation (Rieth et Larue-Achagiotis 1997; Jean et al. 2002; Devkota et Layman 2011; Chaumontet et al. 2015; Acheson et al. 2011). However, the peak inhibition measured between 1 and 3 hours after the meal was significantly lower on the 30P diet than on the 15P diet. The 30% protein diets therefore significantly attenuate the intensity of meal-induced lipid oxidation.

We wanted to explore this relation between protein and carbohydrates by investigating at the effect of glycemic index variation in the protein-free diet on spontaneous protein intake. As we hypothesized, protein intake in DSS models was significantly higher with a high glycemic index diet compared to a

lower (decreased by 7.35% in CF-I group, and by 12.5% in CF-HF group). As shown in the previous paragraph, this adaptation of protein intake to the glycemic index of the diet has a real interest in the regulation of the response to carbohydrate ingestion. This is indeed one of the explanations most often advanced by studies on protein choices.

Concerning the PC ratio, our hypothesis is that the PE ratio varies according to different parameters, especially in relation to the proposed diets under DSS, to allow maintaining a constant PC ratio of 70% and that rats therefore preferentially regulate the PC ratio rather than the PE ratio. This has indeed been shown by several studies (Azzout-Marniche et al. 2016; Gehring et al. 2021; Chee, Romsos, et Bergen 1981; Romsos, Chee, et Bergen 1982; Richter, Holt Jr., et Barelare Jr. 1938). However, the PC ratios in our study, although on average within this range (~60%), showed a large variability (28-101%). This tends to refute our hypothesis of a stable PC ratio. The regulations established under DSS then seem more complex.

Meal pattern under self-selection conditions

Besides adjusting the amount of protein consumed, DSS models offer the possibility for rats to consume macronutrients when they want and therefore when and, in the order, they need. We (Makarios-Lahham et al. 2004; Azzout-Marniche et al. 2016; Gehring et al. 2021; Jean et al. 2002) as well as other studies (Miller et al. 1994; Konkle et al. 2003) had already shown that rats would prefer to separate protein and carbohydrate intakes and mix protein and fat intakes. In this study, we can see that rats consumed significantly more meals with P100 and CF-Sacc (31.8%) compared to CF-St (6.89%). Thus, rats preferred to mix protein and carbohydrates when the glycemic index of the protein-free diet was higher. We did not show a difference between the CF-St and CF-HF groups, since in both groups, the rats preferred to separate the protein and the protein-free diet regardless of the amount of carbohydrate and fat. The choice consumption measurements also revealed that CF-Sacc and CF-HF preferred ingesting proteins after the protein-free diet, and other groups (CF-St and CF-I) had no preference for ingesting proteins before or after. This result was in line with those of previous studies (Makarios-Lahham et al. 2004; Jean et al. 2002; Konkle et al. 2003), where food pattern measurements under choice conditions showed that rats preferred to consume proteins after carbohydrates and fats. Our MTT studies, using 30P sequential meal (protein meal ingested 15 min before protein-free meal) confirmed the importance of this ingestion sequence. Indeed, the insulin secretion was higher compared to composite 30P meal and could also attenuate the effect of carbohydrate. Finally, it is notable that main intakes were done during night. A result also found for the consumption of the 100P diet and the protein-free diet. This result is consistent with previous studies with DSS models (Makarios-Lahham et al. 2004; Gehring et al. 2021; Larue-Achagiotis et al. 1992; Tempel et al. 1989; Miller et al. 1994). The potential beneficial effects of how macronutrients are consumed remain unexplored. However, this study has shown an effect of the separation or not of proteins and carbohydrates on insulin secretion.

Conclusion

The results of this study reaffirm the fact that optimal protein intake is well above the required level. Protein choice fluctuates with the quality of carbohydrates, as under dietary self-selection it is higher when the glycemic index of the diet is high. This high selected level of protein balances the effects of carbohydrate consumption on the body by lowering blood sugar. Consumption of protein before carbohydrate induces an increase in insulin secretion, showing that these benefits are exacerbated by separate consumption of protein and carbohydrate.

Acknowledgments

The authors thank Morgane Dufay for her precious help in the maintenance of rats during the study.

References

- Acheson, K. J., A. Blondel-Lubrano, S. Oguey-Araymon, M. Beaumont, S. Emady-Azar, C. Ammon-Zufferey, I. Monnard, S. Pinaud, C. Nielsen-Moennoz, et L. Bovetto. 2011. « Protein Choices Targeting Thermogenesis and Metabolism ». *American Journal of Clinical Nutrition* 93 (3): 525-34. <https://doi.org/10/bpv8mj>.
- Akhavan, Tina, Bohdan L. Luhovyy, Peter H. Brown, Clara E. Cho, et G. Harvey Anderson. 2010. « Effect of Premeal Consumption of Whey Protein and Its Hydrolysate on Food Intake and Postmeal Glycemia and Insulin Responses in Young Adults ». *American Journal of Clinical Nutrition* 91 (4): 966-75. <https://doi.org/10/c4nw2t>.
- Ashley, David V. M., et G. Harvey Anderson. 1975. « Food Intake Regulation in the Weanling Rat: Effects of the Most Limiting Essential Amino Acids of Gluten, Casein, and Zein on the Self-Selection of Protein and Energy ». *Journal of Nutrition* 105 (11): 1405-11. <https://doi.org/10/gf9zx7>.
- Azzout-Marniche, Dalila, Tristan Chalvon-Demersay, Grégory Pimentel, Catherine Chaumontet, Nachiket A. Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, et Patrick C. Even. 2016. « Obesity-Prone High-Fat-Fed Rats Reduce Caloric Intake and Adiposity and Gain More Fat-Free Mass When Allowed to Self-Select Protein from Carbohydrate:Fat Intake ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310 (11): R1169-76. <https://doi.org/10/gf9zzv>.
- Berger, S., et N. Vongaraya. 1966. « Insulin Response to Ingested Protein in Diabetes ». *Diabetes* 15 (5): 303-6. <https://doi.org/10/gmmwrz>.
- Castonguay, T. W., L. L. Kaiser, et J. S. Stern. 1986. « Meal pattern analysis: artifacts, assumptions and implications ». *Brain Research Bulletin* 17 (3): 439-43. <https://doi.org/10/cnbgrg>.
- Chaumontet, Catherine, Patrick C. Even, Jessica Schwarz, Angélique Simonin-Foucault, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Dalila Azzout-Marniche, et Daniel Tomé. 2015. « High Dietary Protein Decreases Fat Deposition Induced by High-Fat and High-Sucrose Diet in Rats ». *British Journal of Nutrition* 114 (8): 1132-42. <https://doi.org/10/f7vfp4>.
- Chee, Kew M., Dale R. Romsos, et Werner G. Bergen. 1981. « Effect of Dietary Fat on Protein Intake Regulation in Young Obese and Lean Mice ». *Journal of Nutrition* 111 (4): 668-77. <https://doi.org/10/gf9zx8>.
- Cohen, Leslie R., et Barbara C. Woodside. 1989. « Self-Selection of Protein during Pregnancy and Lactation in Rats ». *Appetite* 12 (2): 119-36. <https://doi.org/10/dk2sng>.
- Collier, George, Alan I. Leshner, et Robert L. Squibb. 1969. « Self-Selection of Natural and Purified Dietary Protein ». *Physiology & Behavior* 4 (1): 83-86. <https://doi.org/10/cq7fdw>.
- Devkota, Suzanne, et Donald K Layman. 2011. « Increased Ratio of Dietary Carbohydrate to Protein Shifts the Focus of Metabolic Signaling from Skeletal Muscle to Adipose ». *Nutrition & Metabolism* 8 (1): 13. <https://doi.org/10/dd332m>.
- Donhoffer, Sz., et J. Vonotzky. 1947. « The Effect of Environmental Temperature on Food Selection ». *American Journal of Physiology* 150 (2): 329-33. <https://doi.org/10/ggsgzn>.
- Even, Patrick C., Joséphine Gehring, et Daniel Tomé. 2021. « What Does Self-Selection of Dietary Proteins in Rats Tell Us about Protein Requirements and Body Weight Control? » *Obesity Reviews*, 1-15. <https://doi.org/10.1111/obr.13194>.

- Even, Patrick C., Asghar Mokhtarian, et Agnes Pele. 1994. « Practical Aspects of Indirect Calorimetry in Laboratory Animals ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 18 (3): 435-47. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)90056-6).
- Even, Patrick C., et Nachiket A. Nadkarni. 2012. « Indirect Calorimetry in Laboratory Mice and Rats: Principles, Practical Considerations, Interpretation and Perspectives ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303 (5): R459-476. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00137.2012>.
- Even, Patrick C., Edith Perrier, Jean-Luc Aucouturier, et Stylianos Nicolaïdis. 1991. « Utilisation of the Method of Kalman Filtering for Performing the On-Line Computation of Background Metabolism in the Free-Moving, Free-Feeding Rat ». *Physiology & Behavior* 49 (1): 177-87. <https://doi.org/10/btsfzs>.
- Fajans, S. S., J. C. Floyd, R. F. Knopf, et F. W. Conn. 1967. « Effect of Amino Acids and Proteins on Insulin Secretion in Man ». *Recent Progress in Hormone Research* 23: 617-62. <https://doi.org/10/gmmwsr>.
- FAO/WHO/UNU Expert Consultation. 1985. « Energy and Protein Requirements ». World Health Organization Technical Report 724. Geneva, Switzerland: World Health Organization. <http://www.fao.org/3/aa040e/aa040e00.htm>.
- Frid, Anders H., Mikael Nilsson, Jens Juul Holst, et Inger M. E. Björck. 2005. « Effect of Whey on Blood Glucose and Insulin Responses to Composite Breakfast and Lunch Meals in Type 2 Diabetic Subjects ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 82 (1): 69-75. <https://doi.org/10/gmmws4>.
- Gannon, M. C., F. Q. Nuttall, B. J. Neil, et S. A. Westphal. 1988. « The Insulin and Glucose Responses to Meals of Glucose plus Various Proteins in Type II Diabetic Subjects ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 37 (11): 1081-88. <https://doi.org/10/fvf5rn>.
- Gannon, Mary C., et Frank Q. Nuttall. 2010. « Amino Acid Ingestion and Glucose Metabolism--a Review ». *IUBMB Life* 62 (9): 660-68. <https://doi.org/10/cts9rk>.
- Gehring, Josephine, Dalila Azzout-Marniche, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, et Patrick C Even. 2021. « Rats Self-Select a Constant Protein-to-Carbohydrate Ratio Rather Than a Constant Protein-to-Energy Ratio and Have Low Plasma FGF21 Concentrations ». *Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10/gjn7nq>.
- Henry, Y, et A Rerat. 1963. « Variations de la consommation spontanée d'énergie en fonction de la nature et de la quantité des matières azotées chez le rat en croissance ». *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*.
- Jean, Clémentine, Gilles Fromentin, Daniel Tomé, et Christiane Larue-Achagiotis. 2002. « Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet ». *Physiology & Behavior* 76 (1): 65-73. <https://doi.org/10/d46sg2>.
- Kaur, Narinder, et Anil K. Gupta. 2002. « Applications of Inulin and Oligofructose in Health and Nutrition ». *Journal of Biosciences* 27 (7): 703-14. <https://doi.org/10/c75j3j>.
- Kishi, Kyoichi, Kyoko Rikimaru, Yoshiko Matsumoto, Fujiko Shizuka, et Goro Inoue. 1982. « Constancy of Net Protein Intake in Rats on Self-Selection Regimen with Proteins of Various Qualities. » *Japanese Journal of Physiology* 32 (6): 959-70. <https://doi.org/10/bgx3hq>.

- Konkle, A. T. M., K. B. Sreter, S. L. Baker, et C. Bielajew. 2003. « Chronic Paroxetine Infusion Influences Macronutrient Selection in Male Sprague-Dawley Rats ». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 74 (4): 883-90. <https://doi.org/10/bjbvmx>.
- Krezowski, P A, F Q Nuttall, M C Gannon, et N H Bartosh. 1986. « The effect of protein ingestion on the metabolic response to oral glucose in normal individuals ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 44 (6): 847-56. <https://doi.org/10/gmbk58>.
- Larue-Achagiotis, Christiane, C. Martin, P. Verger, et J. Louis-Sylvestre. 1992. « Dietary Self-Selection vs. Complete Diet: Body Weight Gain and Meal Pattern in Rats ». *Physiology & Behavior* 51 (5): 995-99. <https://doi.org/10/fkfc3k>.
- Leshner, Alan I., George H. Collier, et Robert L. Squibb. 1971. « Dietary Self-Selection at Cold Temperatures ». *Physiology & Behavior* 6 (1): 1-3. <https://doi.org/10/d78n4v>.
- Loon, L. J. van, W. H. Saris, H. Verhagen, et A. J. Wagenmakers. 2000. « Plasma Insulin Responses after Ingestion of Different Amino Acid or Protein Mixtures with Carbohydrate ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 72 (1): 96-105. <https://doi.org/10/gmmwsz>.
- Makarios-Lahham, Lina, Suzanne M. Roseau, Gilles Fromentin, Daniel Tome, et Patrick C. Even. 2004. « Rats Free to Select between Pure Protein and a Fat-Carbohydrate Mix Ingest High-Protein Mixed Meals during the Dark Period and Protein Meals during the Light Period ». *Journal of Nutrition* 134 (3): 618-24. <https://doi.org/10/gf9zzf>.
- Miller, Gary D., Brian J. Hrupka, Dorothy W. Gietzen, Quinton R. Rogers, et Judith S. Stern. 1994. « Rats on a Macronutrient Self-Selection Diet Eat Most Meals From a Single Food Cup ». *Appetite* 23 (1): 67-78. <https://doi.org/10/bgxcrt>.
- Moghaddam, Elham, Janet A. Vogt, et Thomas M. S. Wolever. 2006. « The Effects of Fat and Protein on Glycemic Responses in Nondiabetic Humans Vary with Waist Circumference, Fasting Plasma Insulin, and Dietary Fiber Intake ». *The Journal of Nutrition* 136 (10): 2506-11. <https://doi.org/10/gmmwtc>.
- Musten, B., D. Peace, et G. H. Anderson. 1974. « Food intake regulation in the weanling rat: self-selection of protein and energy ». *Journal of Nutrition* 104 (5): 563-72. <https://doi.org/10/ghjkfn>.
- Nuttall, F. Q., et M. C. Gannon. 1991. « Plasma Glucose and Insulin Response to Macronutrients in Nondiabetic and NIDDM Subjects ». *Diabetes Care* 14 (9): 824-38. <https://doi.org/10/cts63v>.
- Nuttall, Frank Q, et Charles Billington. 1984. « Effect of Protein Ingestion on the Glucose and Insulin Response to a Standardized Oral Glucose Load ». *Diabetes Care* 7 (5): 6. <https://doi.org/10/bjzcwm>.
- Pol, G., et C. den Hartog. 1966. « The Dependence on Protein Quality of the Protein to Calorie Ratio in a Freely Selected Diet and the Usefulness of Giving Protein and Calories Separately in Protein Evaluation Experiments ». *British Journal of Nutrition* 20 (4): 649-61. <https://doi.org/10/dtrq7c>.
- Rabinowitz, D, T J Merimee, R Maffezzoli, et J A Burgess. 1966. « Patterns of Hormonal Release after Glucose, Protein, and Glucose plus Protein ». *Lancet*, 4.
- Ranawana, Viren, et Bhupinder Kaur. 2013. « Role of Proteins in Insulin Secretion and Glycemic Control ». In *Advances in Food and Nutrition Research*, 70:1-47. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416555-7.00001-1>.

- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et G. C. Fahey. 1993. « AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet ». *Journal of Nutrition* 123 (11). <https://doi.org/10/ghjkfp>.
- Richter, C. P., L. E. Holt Jr., et B. Barelare Jr. 1938. « Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by the self-selection method ». *American Journal of Physiology* 122: 734-44. <https://doi.org/10/ggsg2d>.
- Rieth, Nathalie, et Christiane Larue-Achagiotis. 1997. « Exercise Training Decreases Body Fat More in Self-Selecting Than in Chow-Fed Rats ». *Physiology & Behavior* 62 (6): 1291-97. <https://doi.org/10/bg5s7p>.
- Romsos, Dale R., Kew M. Chee, et Werner G. Bergen. 1982. « Protein Intake Regulation in Adult Obese (Ob/Ob) and Lean Mice: Effects of Nonprotein Energy Source and of Supplemental Tryptophan ». *Journal of Nutrition* 112 (3): 505-13. <https://doi.org/10/gf9z2s>.
- Tempel, D. L., G. Shor-Posner, D. Dwyer, et S. F. Leibowitz. 1989. « Nocturnal Patterns of Macronutrient Intake in Freely Feeding and Food-Deprived Rats ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 256 (2): R541-48. <https://doi.org/10/ggsgz3>.
- Theytaz, Fanny, Sara de Giorgi, Leanne Hodson, Nathalie Stefanoni, Valentine Rey, Philippe Schneiter, Vittorio Giusti, et Luc Tappy. 2014. « Metabolic Fate of Fructose Ingested with and without Glucose in a Mixed Meal ». *Nutrients* 6 (7): 2632-49. <https://doi.org/10/f6fv77>.
- Thouzeau, C. 1995. « Refeeding in Fasted Rats: Dietary Self-Selection According to Metabolic Status ». *Physiology & Behavior* 58 (6): 1051-58. <https://doi.org/10/fn9223>.
- Tribe, D. E. 1955. « The Choice of Purified Food Constituents during Growth, Pregnancy and Lactation ». *British Journal of Nutrition* 9 (1): 103-9. <https://doi.org/10/dmfs3p>.

Chapitre 3 : Discussion

Ces travaux de thèses avaient pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'ingestion des protéines, leur interaction avec le contrôle énergétique et les conséquences de ces processus sur la régulation de la prise alimentaire et de la composition corporelle.

Les résultats des différentes études ont permis de mettre en évidence que :

- Sous auto-sélection alimentaire, les rats ingéraient beaucoup plus de protéines (~30% de l'apport énergétique) que le niveau considéré comme suffisant pour atteindre le besoin protéique. De plus, le ratio protéines/énergie (PE) sélectionné s'ajustait en fonction de la quantité de glucides et de l'indice glycémique des régimes sans protéine. Cela avait pour but de maintenir un ratio protéines/glucides (PG) constant d'environ 70%, mais cette hypothèse reste discutable. L'établissement de ratios PE et PG élevés semblait avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique, et la dépendance de l'organisme vis-à-vis des glucides.
- Dans un cadre géométrique simplifié, où les rats étaient nourris avec des régimes contenant 3 à 30% de protéines et variant selon la quantité de glucides et de lipides, la majorité des paramètres de la composition corporelle et du métabolisme énergétique n'était affectée que par la teneur en protéines des régimes. Parallèlement aux résultats précédents, cela a permis de montrer que les niveaux de protéines sélectionnés (~30%) empêchaient l'augmentation de l'apport énergétique et de l'adiposité induite par un régime riche en graisses, par rapport à un régime à 15% de protéines.
- La régulation à long terme de FGF21 dépendait exclusivement de la teneur en protéines du régime. De plus, les concentrations plasmatiques de FGF21 étaient très faibles chez les rats en choix, et plus élevées chez les rats nourris avec 15% de protéines. Ces résultats suggéraient alors un léger signal de carence en protéines avec un régime à 15%, et indiquaient que FGF21 pourrait intervenir dans les mécanismes de choix protéique.

La discussion de ces résultats se fera en deux parties. Premièrement, nous discuterons des effets de la quantité de protéines sur le métabolisme énergétique au travers des effets sur la prise alimentaire, la dépense énergétique et la composition corporelle. Nous aborderons les rôles respectifs des protéines et des glucides dans la régulation de FGF21. Deuxièmement, nous discuterons des résultats concernant l'auto-sélection alimentaire et notamment la consommation élevée de protéines. Nous aborderons les effets métaboliques bénéfiques qu'apporte ce mode de consommation, permettant notamment d'équilibrer le métabolisme énergétique et de prévenir des effets d'un excès de glucides ou de lipides. Nous discuterons aussi le fait que d'après nos résultats FGF21 tient un rôle dans ces mécanismes de choix.

3.1. Impact des variations des niveaux d'apports protéiques dans le régime alimentaire sur le métabolisme énergétique

3.1.1. Régimes à faibles teneurs en protéines

De nombreuses études ont montré qu'une diminution de la teneur en protéines du régime engendrait une augmentation de la prise alimentaire, de la masse grasse, ainsi que de la dépense énergétique. Dans cette partie de la discussion, nous allons aborder uniquement les effets de la diminution en protéines, indépendamment des variations de contenu en lipides et glucides. En effet, dans l'étude 2 (**Page 97**), la restriction protéique entraînait des effets beaucoup plus importants sur la majorité des paramètres de la prise alimentaire, la composition corporelle et la dépense énergétique. L'absence d'effet du ratio glucides/(glucides+lipides) était probablement due au fait qu'ils étaient masqués par les effets des protéines. Le **Tableau 3** récapitule les principaux effets de la teneur en protéines des régimes observés dans l'étude 2 (**Page 97**).

Tableau 3. Effets des teneurs en protéines sur la composition corporelle et le métabolisme énergétique, par rapport au groupe 15P (*Etude 2 Page 97*)

	3P	5P	8P	30P
Poids	↓↓	↓	↓	=
Masse maigre	↓↓↓	↓↓	↓	=
Adiposité	↓	=	=	↓
Prise alimentaire	↑	↑	↑	=
Dépense énergétique totale	↑↑	↑	↑	↓
FGF21 plasma	↑↑	↑↑	↑	↓
FGF21 foie	↑↑	↑↑	↑	↓

↑ Augmentation par rapport au groupe 15P, ↓ Diminution par rapport au groupe 15P, = pas de différence par rapport au 15P.

Nous pouvons constater qu'il y a un phénomène d'hyperphagie qui était mis en place lorsque l'apport protéique diminuait en accord avec la littérature. En effet, il a déjà été montré qu'une restriction protéique modérée (5-8% de l'énergie) entraînait une augmentation de la prise alimentaire (Aparecida de França et al., 2009; Gosby et al., 2011; Griffioen-Roose et al., 2011; Pezeshki and Chelikani, 2021; Rozin, 1968; Swick and Gribbskov, 1983; White et al., 2000). Ce phénomène a pour objectif de compenser le manque de protéines dans le régime en augmentant la quantité ingérée au détriment de l'apport énergétique. Ces résultats mettent alors bien en avant que le contrôle de l'apport protéique est privilégié au contrôle de l'apport énergétique. Cependant, certaines études ont aussi montré que cette compensation n'était plus mise en place lorsque la déficience était trop élevée, et c'est alors un phénomène d'aversion qui intervenait (Du et al., 2000; Morrison and Laeger, 2015). Nos résultats ne concordaient pas avec ces observations puisqu'avec 3% de protéines, il y avait toujours un effet hyperphagique. Il apparaît quand même que l'hyperphagie est plus faible que celle observée sous un régime à 5% de protéines, ce qui va dans le sens des données précédentes.

En parallèle de l'augmentation de la prise alimentaire, nos résultats confirmaient qu'il y avait une augmentation de la dépense énergétique lorsque l'apport protéique était faible. Cet effet était d'autant plus important que la déficience en protéines était sévère (3P). Ces observations étaient en accord avec la littérature (Blais et al., 2018; Chaumontet et al., 2019; Du et al., 2000; Pezeshki et al., 2016). L'étude 2 complémentaire (**Page 134**) sur les composantes de la dépense énergétique a notamment permis de mettre en évidence que cette augmentation sous régime faible en protéines (5P vs 15P) semble résulter d'un coût de la régulation thermique légèrement plus élevé ainsi que d'une thermogénèse postprandiale plus élevée. Le résultat concernant la régulation thermique avait déjà été montré chez des souris nourries avec un régime à 6% de protéines, et placés soit à 30°C (thermoneutralité) soit à 22°C (Blais et al., 2018). La thermorégulation ne variait alors pas lorsque les souris étaient à thermoneutralité mais augmentait lorsqu'elles étaient à 22°C.

En réponse à la diminution des protéines dans le régime, les modifications de métabolisme énergétique, que ce soit la hausse de la dépense énergétique pour palier l'augmentation de la prise alimentaire (Blais et al., 2018; Chaumontet et al., 2019; Du et al., 2000; Pezeshki et al., 2016) ou inversement (Hill et al., 2018; Laeger et al., 2016; Rothwell and Stock, 1987), ont pour objectif de maintenir une composition corporelle optimale et d'éviter la prise de masse grasse. Dans notre étude, les rats avec une déficience modérée (5P et 8P) ne présentaient pas d'augmentation de l'adiposité. Cependant, ceux avec une déficience sévère (3P) avaient une adiposité légèrement plus faible par rapport au régime 15P. Cette observation pouvait notamment être le résultat de l'augmentation de la dépense énergétique plus importante que dans les autres groupes, combinée au fait que la très faible teneur en protéines du régime n'a pas permis une augmentation de la prise alimentaire suffisante pour permettre d'équilibrer l'apport et la dépense énergétique. En accord avec la littérature, nous observons bien une diminution du poids corporel, une baisse d'autant plus forte que la diminution des protéines dans le régime était importante. Cet effet était notamment le résultat d'une importante et rapide baisse de la masse maigre, dès que le niveau de protéines passait en dessous du besoin qui, dans cette étude, semblait se situer entre 15% et 8%. Ainsi, cette étude a montré que la diminution des niveaux de protéines alimentaires en dessous de 15% ralentit rapidement le taux de croissance, ce qui indiquait que 15% de protéines alimentaires est proche du plus bas niveau acceptable.

Nos résultats ne permettent pas de conclure si c'est l'augmentation de la dépense énergétique qui induit une augmentation adaptative de la prise alimentaire ou inversement. Il faut cependant noter que Rothwell and Stock ont rapporté que chez des rats, dont la prise alimentaire avait été contrôlée pour rester identique à celle des rats témoins, l'augmentation de la dépense énergétique observée semblait précéder l'augmentation de la prise alimentaire (Rothwell and Stock, 1987). L'augmentation importante de la thermogénèse postprandiale en réponse à un régime à faible teneur en protéines que nous avons pu mesurer dans l'étude 2 complémentaire (**Page 134**), qui confirme des données plus anciennes (Swick and Gribkov, 1983), pourrait être à l'origine de ce mécanisme.

Nous pouvons finalement noter que nos résultats mettent en évidence l'utilité de FGF21 dans l'établissement des réponses métaboliques à la restriction protéique, dont notamment l'augmentation de la dépense énergétique. En effet, par rapport au régime 15P, les rats nourris avec le régime 30P sont les seuls à avoir une concentration de FGF21 plus faible et une diminution de la dépense énergétique. Cet effet médié par FGF21 a déjà été démontré avec des modèles de souris KO-FGF21. Dans l'étude de Laeger et al. par exemple, l'absence d'expression de FGF21 induisait une inhibition des changements de la dépense énergétique lorsque l'apport protéique était faible (Laeger et al., 2016).

En conclusion, nos résultats indiquent que la diminution des protéines dans le régime induit une augmentation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Contrairement à l'hypothèse de l'effet levier des protéines, supposant que cette augmentation de l'apport énergétique induit des effets délétères sur la composition corporelle, nous avons pu voir qu'il n'y avait pas de prise de masse grasse. Nos résultats ne permettent pas de conclure si l'augmentation de la dépense énergétique intervient avant ou après celle de la prise alimentaire.

3.1.2. Contrôle de FGF21 par la teneur en protéines des régimes

Il est désormais largement admis que l'hormone FGF21 est un signal essentiel indiquant un niveau d'apport protéique insuffisant, et un médiateur essentiel dans les réponses métaboliques à cette carence (Chaumontet et al., 2019; Hill et al., 2019, 2017; Laeger et al., 2014; Morrison and Laeger, 2015). Cependant, il a aussi été démontré que FGF21 répond à d'autres paramètres tels que la restriction alimentaire (Hollstein et al., 2020; Liang et al., 2014), le froid (Hollstein et al., 2020; Hondares et al., 2011), la lipolyse (Lee et al., 2013), l'exercice et divers autres signaux (Staiger et al., 2017). Parmi ces autres paramètres, il a été rapporté que des concentrations élevées de glucose ou d'insuline dans le sang, ainsi que la consommation excessive de glucides augmentaient les concentrations plasmatiques de FGF21 (BonDurant and Potthoff, 2018; Chalvon-Demersay et al., 2016; Dushay et al., 2015; Lundsgaard et al., 2017; Sánchez et al., 2009; von Holstein-Rathlou et al., 2016). Dans l'étude de Chalvon-Demersay et al. sur des souris, il a été montré que l'ingestion d'un régime riche en glucides et pauvre en protéines stimulait la synthèse et la sécrétion de FGF21 par le foie grâce à l'action d'une part de l'apport élevé de glucose et d'autre part par la faible concentration en acides aminés. Chez l'homme, les études de Dushay et al. et Lundsgaard, Fritzen et al. ont démontré qu'un apport unique de monosaccharides (fructose) était un activateur puissant mais bref de la sécrétion de FGF21, tout comme un excès de glucides alimentaires (Dushay et al., 2015; Lundsgaard et al., 2017).

Au vu de ces études, aucune conclusion n'était clairement établie sur l'interaction possible entre les protéines et les glucides dans le contrôle de la réponse FGF21. De plus, dans la plupart des études, les régimes faibles en protéines étaient formulés par un échange entre les protéines et les glucides ou inversement pour maintenir une teneur en graisses fixe. Une question importante à laquelle les travaux de cette thèse ont tenté de répondre était de distinguer les rôles spécifiques des niveaux d'apport en protéines et en glucides sur la régulation à long terme des concentrations plasmatiques de FGF21. Pour cela, nous avons utilisé un cadre géométrique simplifié permettant de tester différentes combinaisons de protéines et de glucides (**Expérience 3 Page 52**). Il est très clair dans nos résultats que chez le rat les concentrations plasmatiques en FGF21 répondaient exclusivement aux changements du ratio PE, et donc à l'apport en protéines. Dans l'étude 2 (**Page 97**), où cette question faisait partie des objectifs principaux, nous avons en effet montré que les concentrations de FGF21 n'étaient affectées que par le ratio PE. Les concentrations augmentaient brusquement lorsque l'apport protéique diminuait en dessous d'un niveau seuil situé entre 8 et 15% de l'apport énergétique. Ainsi, les régimes avec des PE ratios de 3, 5 et 8% induisaient une forte hausse de FGF21, mais dans aucun de ces groupes le ratio glucide/(glucide+lipide) n'a eu d'influence.

A notre connaissance, une seule autre étude avait utilisé un cadre géométrique pour étudier séparément les effets des glucides et des protéines sur FGF21, chez la souris. Les conclusions de

cette études étaient que FGF21 répondait bien aux protéines mais aussi, bien que plus faiblement, aux glucides, et répondait plus fortement à un apport faible en protéines lorsque celui-ci était associé à un apport élevé en glucides (Solon-Biet et al., 2016). Dans cette étude, largement en accord avec nos données, le niveau de protéines était de loin le principal paramètre affectant les concentrations plasmatiques de FGF21.

Deux hypothèses peuvent être considérées quant à l'absence d'effet de la teneur en glucides dans nos travaux :

- Il est possible qu'il y ait un lien avec l'amplitude de l'effet. Si l'apport en glucides pouvaient effectivement modifier les concentrations de FGF21, la réponse serait d'un ordre de grandeur beaucoup plus faible que la réponse aux changements de teneur en protéines. L'effet « glucides » semble en effet correspondre à une multiplication de l'ordre de 5-10 de la concentration plasmatique de FGF21 lorsque l'apport glucidique augmente (Lundsgaard et al., 2017), contrairement à l'effet « protéines » qui dans notre étude correspond à une multiplication de l'ordre de 100-1000. Il se pourrait donc que l'effet « glucides », s'il existe, est masqué par l'effet « protéines ». Cela est aussi montré dans l'étude de Solon-Biet et al. où les glucides engendraient de plus faibles modifications de FGF21 que les protéines (Solon-Biet et al., 2016).

- Il est aussi possible que la durée de l'effet soit en cause. Il semble qu'en plus de ne pas avoir le même ordre de grandeur, les modifications dues aux protéines et aux glucides n'ont pas la même durée. En effet, les changements engendrés sur la concentration en FGF21 plasmatique en réponse à l'apport en glucides ont toujours été mesurés à court terme, et donc aucune étude n'a rapporté des changements à long terme (Adams and Gimeno, 2016; BonDurant et al., 2017; Dushay et al., 2015; Lin et al., 2012; Vienberg et al., 2017; von Holstein-Rathlou et al., 2016).

Les résultats de l'étude 1 (**Page 59**) permettaient aussi de confirmer l'absence d'effet des glucides. Les concentrations plasmatiques de FGF21 ont été mesurées chez des rats sous auto-sélection entre un régime protéique et un régime sans protéine, où la quantité de glucides étaient de 30, 45, 60 ou 75% de l'énergie. Ces mesures ont mis en évidence que quelle que soit la teneur en glucides des régimes sans protéine, et donc quel que soit le niveau d'apport glucidique, les concentrations en FGF21 étaient similaires et très faibles dans tous les groupes.

En conclusion, en marge des études rapportant un effet des glucides sur la concentration plasmatique de FGF21, nos résultats indiquent qu'il n'y a un effet que des apports protéiques chez le rat à long terme.

3.2. Sélection d'un ratio protéines/énergie plus élevé que le besoin protéique

3.2.1. Ratio protéines/énergie défendu et s'ajustant en fonction des apports glucidiques

L'ensemble des modèles d'auto-sélection alimentaire utilisés dans ces travaux ont mis en évidence la sélection d'un ratio protéines/énergie (PE) proche en moyenne de 30% de l'apport énergétique total (**Etude 1 Page 59, Etude 4 Page 139 et Etude 5 Page 163**). Ce ratio est bien supérieur au besoin en protéines tel que défini pour assurer l'équilibre azoté (10-15%). Cette consommation spontanée élevée de protéines est retrouvée dans de nombreuses études (Castonguay et al., 1982; Jean et al., 2002; Makarios-Lahham et al., 2004; Mullen and Martin, 1992; Musten et al., 1974; Peters and Harper, 1984).

Certaines études, dont celle de Booth en 1985, ont suggéré que ce ratio PE élevé était le signe d'un contrôle approximatif de l'apport protéique. Il supposait que les mécanismes de régulation intervenaient simplement aux deux extrêmes d'une part pour maintenir le niveau d'ingestion de protéines au-dessus des niveaux requis pour assurer l'équilibre azoté, et d'autre part pour le maintenir en dessous des niveaux qui pourraient engendrer des adaptations métaboliques coûteuses et/ou nuisibles pour l'organisme (Booth, 1985). Cependant, nos résultats indiquent clairement que ce ratio PE élevé correspond bien à une valeur recherchée et défendu. Nous pouvons aussi noter qu'il a été démontré que lorsque la teneur en protéines du régime était augmentée, les voies métaboliques du catabolisme des protéines sont rapidement stimulées, permettant à l'organisme de s'adapter à une teneur en protéines allant jusqu'à 50% (Jean et al., 2001; L'Heureux-Bouron et al., 2004). Dans l'étude 2 (**Page 97**), l'excrétion d'urée a en effet montré que toutes les protéines ingérées au-delà de 30 kJ/d étaient catabolisées. Ainsi, si les mécanismes de régulation des niveaux d'apport protéique consistaient à limiter les niveaux d'ingestion juste en dessous des niveaux engendrant des effets délétères sur l'organisme, il devrait être bien plus élevé que 30%.

Que le ratio PE sélectionné par les rats en choix soit un niveau recherché et défendu est aussi fortement suggéré par le fait qu'il varie en fonction de différents paramètres, dont l'état physiologique (gestation, lactation, âge, activité physique, surpoids et obésité), l'environnement (température), ou le régime (qualité et dilution des protéines, apports glucidiques et lipides). Nous nous sommes intéressés dans cette thèse, au lien entre le ratio PE sélectionné et la teneur en glucides des régimes. Dans l'étude 1 (**Page 59**), les rats ont eu la possibilité de choisir entre un régime protéique et un régime sans protéine à teneur variable en glucides (amidon et saccharose). Le ratio PE augmentait de 20 à 35% selon que la teneur en glucides augmentait de 30 à 75%. Ainsi, plus l'apport en glucides des rats était élevé, plus ils choisissaient de consommer des protéines. Dans l'étude 4 (**Page 163**), les rats ont eu la possibilité de choisir entre le même régime protéique et un régime sans protéine dont la teneur en glucides était constante, mais l'indice glycémique variable. Le ratio PE diminuait alors d'environ 8% lorsque l'indice glycémique était faible.

Les ajustements du ratio PE en fonction de la quantité et de la qualité de l'apport en glucides pourraient donc refléter la régulation d'un ratio protéines/glucides (PG), qui aurait pour objectif d'optimiser le métabolisme énergétique. La régulation d'un ratio PG de l'ordre d'environ 70% a été observé dans de précédentes études (Azzout-Marniche et al., 2016; Chee et al., 1981; Richter et

al., 1938; Romsos and Ferguson, 1982). Il est notable que ce ratio recherché est alors bien supérieur au ratio PG défini dans les recommandations AIN-93 pour l'alimentation du rat (Reeves et al., 1993), où il est de 20%. Dans les études 1 (**Page 59**), 3 (**Page 139**) et 4 (**Page 163**) nous retrouvons bien ce ratio, appuyant notre hypothèse que, sous auto-sélection alimentaire, il y a bien une volonté de maintenir stable ce ratio plutôt que le ratio PE. Cependant, la variabilité importante de ce ratio retrouvée dans l'étude 4 (**Page 163**), pourrait suggérer que les interactions dans la régulation des ratios PE et PG sont plus complexes et probablement aussi influencées par la quantité et qualité des lipides du régime.

En conclusion, ces résultats indiquent que l'apport optimal en protéines, recherché sous auto-sélection alimentaire, est supérieur aux niveaux nécessaires à l'équilibre azoté, et qu'il fluctue en lien notamment avec la quantité et la qualité des glucides proposés pour optimiser les régulations énergétiques.

3.2.2. Effets bénéfiques de l'auto-sélection des protéines

La volonté des rats sous auto-sélection alimentaire d'ingérer de grandes quantités de protéines, et la variation des ratios PE en fonction de la teneur en glucides des régimes, nous ont conduit à considérer que l'appétit pour les protéines est probablement soutenu par des effets métaboliques positifs sur la prise alimentaire (Jean et al., 2001; Lacroix et al., 2004; Westerterp-Plantenga, 2008) et sur la composition corporelle (Blouet et al., 2006; Lacroix et al., 2004; Pichon et al., 2008; Skov et al., 1999).

Premièrement, l'établissement d'un haut ratio PE d'environ 30%, et donc d'une consommation protéique élevée, apparaît comme bénéfique pour l'organisme. En effet, de nombreuses études ont montré que l'augmentation des protéines dans le régime engendre une diminution de la prise alimentaire et du gain de masse grasse, ainsi qu'une amélioration du métabolisme glucidique. Ces effets bénéfiques sont avant tout le résultat du fait qu'après avoir comblé les besoins de renouvellement et de synthèse des principaux composés de l'organisme, l'excédent d'apport en protéines et en acides aminés est utilisé comme substrat énergétique, en lieu et place du glucose. Cette contribution au métabolisme énergétique, au même titre que les glucides et les lipides, permet alors d'équilibrer et d'optimiser l'apport énergétique.

L'apport adéquat en protéines a été déterminé à 15% de l'énergie, en fonction du bilan azoté (FAO/WHO/UNU Expert Consultation et al., 2007), et dans nos résultats, nous avons bien vu que les rats nourris avec cette teneur avaient le taux de croissance le plus élevé. Cependant, ils avaient aussi tendance à être plus gras que les rats nourris avec 30% de protéines, ce qui suggérerait que 30% serait un meilleur niveau pour soutenir la croissance avec un rapport optimal entre la masse maigre et le dépôt de graisse (**Etude 2 Page 97**). Le niveau d'adiposité plus faible des rats nourris avec 30% de protéines peut résulter du fait que les régimes hyperprotéinés réduisent l'intensité de l'inhibition postprandiale de l'oxydation des lipides (Petzke et al., 2007), et pourrait donc réduire la nécessité d'un stockage transitoire de lipides en période postprandiale. Il a en effet été montré qu'un apport élevé en protéines engendre des modifications du métabolisme énergétique et de la réponse hormonale à l'ingestion de ces repas et une réduction de la lipogenèse (Pichon et al., 2006; Stepien et al., 2011). Les régimes hyperprotéinés entraînent par exemple une augmentation du glucagon et du ratio glucagon/insuline, et une inhibition plus faible de l'oxydation des lipides (Acheson et al., 2011; Chaumontet et al., 2015; Devkota and Layman, 2011; Jean et al., 2002;

Rieth and Larue-Achagiotis, 1997). Dans notre étude 4 (**Page 163**), si l'inhibition cumulée de l'oxydation des lipides mesurée sur 6 heures n'était pas différente entre les régimes 15P et 30P, le pic d'inhibition mesuré entre 1 et 3 heures après le repas était nettement plus faible sous régime 30P que sous régime 15P. Les régimes 30% de protéines permettent donc d'amortir considérablement l'intensité de l'oxydation des lipides induite par le repas.

Deuxièmement, l'établissement d'un ratio élevé de PG d'environ 70% (**Etudes 1 Page 59, Etude 3 Page 139 et Etude 4 Page 163**), en conjonction avec un ratio PE élevé, semble également entraîner des avantages métaboliques (Azzout-Marniche et al., 2016; Larue-Achagiotis et al., 1992; Makarios-Lahham et al., 2004; Rieth and Larue-Achagiotis, 1997). La stabilité de ce ratio reflète le lien entre les apports protéiques et glucidiques, et ainsi le fait que la sélection des protéines s'ajuste en fonction des glucides pour prévenir de leurs effets néfastes sur l'organisme. En accord avec cela, dans l'étude 2 (**Page 97**), nous avons observé que, chez des rats nourris avec 30% de protéines, les indices HOMA-IR étaient inférieurs à ceux des rats nourris avec 15P, reflétant des différences de résistance à l'insuline (Matthews et al., 1985). Les résultats de l'étude 4 (**Page 163**) indiquent que l'augmentation de la teneur en protéines (15P vs 30P) diminuait l'augmentation postprandiale de la glycémie, et réduisait le pic d'oxydation glucidique lorsque l'indice glycémique est élevé. Cependant, contrairement à d'autres études (Akhavan et al., 2010; Moghaddam et al., 2006; Petersen et al., 2009; Ranawana and Kaur, 2013), nous n'avons pas montré d'effet dose sur la sécrétion d'insuline en réponse à l'ingestion, et il n'y avait donc pas de différence de sécrétion entre les régimes 15P et 30P. De plus dans l'étude 4 (**Page 163**), comme nous l'avons supposé, le ratio PE sélectionné était significativement plus élevé quand l'indice glycémique était élevé. Ce comportement alimentaire permet alors de réduire l'impact des glucides sur l'organisme grâce à l'effet régulateur des protéines sur la glycémie. Ce modèle de choix avec indice glycémique variable n'avait pas encore été exploré et nous avons émis cette hypothèse en accord avec des observations de Simpson et Raubenheimer (2005). Dans le cadre de leur hypothèse sur l'effet levier des protéines, ils ont observé que le poids corporel était préservé avec des régimes pauvres en protéines et riches en glucides, si la source de glucides provient principalement de légumes et de fruits riches en fibres et ayant donc un faible indice glycémique (Simpson and Raubenheimer, 2005).

Troisièmement, en plus d'offrir la possibilité de réguler finement les ratios PE et PG, l'auto-sélection alimentaire offre la possibilité de sélectionner précisément l'apport en chaque macronutriment au moment où ils sont nécessaires et dans l'ordre le plus optimal. Les résultats de la première expérience de l'étude 1 (**Page 59**) indiquent en effet que la proportion de repas mixtes (ingestion simultanée du régime protéiné et du régime sans protéine) était plus faible lorsque le régime sans protéines contenait beaucoup de glucides. Cette proportion de repas mixtes augmentait ensuite progressivement avec la diminution des glucides, et donc l'augmentation des lipides, dans le régime sans protéine. Ces résultats avaient déjà été montrés dans des études de notre laboratoire (Azzout-Marniche et al., 2016; Jean et al., 2002; Makarios-Lahham et al., 2004) et dans celles d'autres équipes (Konkle et al., 2003; Miller et al., 1994). Ils rapportent que les rats séparent plus facilement l'ingestion de protéines et de lipides que celle de protéines et de glucides. Cet effet est vérifié lorsque les glucides ont un haut indice glycémique, comme l'a montré l'étude 4 (**Page 163**). En effet, les rats ont consommé significativement plus de repas mixte lorsqu'il avait le choix entre un régime protéiné et un régime sans protéine riche en saccharose par rapport à notre régime témoin contenant la même quantité de glucide mais moins de saccharose.

La recherche de la consommation séparée des macronutriments, ou tout du moins des protéines et du mélange des glucides et des lipides, a aussi été confirmée par les résultats de la seconde

expérience de l'étude 1 (**Page 59**). Les animaux avaient le choix entre 3 régimes : un régime protéique, un régime sans protéine et un régime composite à teneur en protéines variable. Dans ce modèle, même lorsque les rats avaient accès à un régime composite contenant 30% de protéines, ils préféraient composer leur repas en ingérant le régime protéique et le régime sans protéine, plutôt que le régime composite pour finalement atteindre le même ratio PE de 30%. Ce résultat confirme l'intérêt de la séparation des macronutriments.

Ces effets bénéfiques potentiels, qui peuvent être obtenus par une organisation précise de l'ingestion des macronutriments, restent cependant largement inexplorés et le rôle joué par l'auto-sélection en elle-même mérite d'être approfondie. L'un des effets positifs de la séparation des macronutriments dans le temps a été observé dans l'étude 4 (**Page 163**). En effet, lorsque les rats ont accès à un repas protéique 15 min avant un repas composé de glucides et de lipides, ils ont une tendance à sécréter plus d'insuline, par rapport à un repas unique avec les mêmes quantités de macronutriments. L'influence des protéines ou d'acides aminés libres, sur la sécrétion d'insuline a déjà été démontrée (Berger and Vongaraya, 1966; Fajans et al., 1967; Floyd et al., 1966; Gannon and Nuttall, 2010; Ranawana and Kaur, 2013). L'ingestion de protéines, seules ou avec les glucides, augmente en effet la sécrétion d'insuline par deux mécanismes : la stimulation des cellules β du pancréas et la sécrétion d'hormones incrélines (Gannon et al., 1988; Nuttall and Gannon, 1991).

En conclusion, ces résultats indiquent que l'auto-sélection alimentaire permet de réguler finement les apports en plus d'ordonner l'ingestion des macronutriments pour s'adapter aux changements des besoins au cours du cycle circadien. Ces comportements alimentaires engendrent des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique et glucidique, mais nécessitent d'être encore explorés.

3.2.3. Rôle de FGF21 dans l'auto-sélection des protéines

Comme évoqué ci-dessus, l'établissement d'un ratio PG optimal, ou d'un compromis entre les ratios PE et PG, pourrait être responsable du niveau élevé d'apport protéique sélectionné. L'une des hypothèses, concernant le mécanisme régissant ce choix, repose sur la sécrétion de sérotonine. En effet, les glucides tendent à augmenter les niveaux de sérotonine dans le cerveau en changeant la composition en acides aminés dans le plasma (ratio du tryptophane/acides aminés neutres), mais les protéines bloquent cette augmentation (Fernstrom and Wurtman, 1997; Wurtman and Fernstrom, 1975). Ainsi, l'augmentation de la sécrétion de sérotonine encouragerait les rats à augmenter leur prise alimentaire, notamment de protéines (voir **Figure 4 Page 23**). En 1979, Ashley et Anderson ont testé l'hypothèse selon laquelle la consommation de protéines pourrait être inversement corrélée aux concentrations cérébrales de sérotonine (Ashley et al., 1979). Ils ont observé que le ratio PE sélectionné augmentait de 15-20% à 40% entre 2 et 14 jours après le sevrage, et que cette augmentation était partiellement compensée par la réduction des niveaux de sérotonine dans le cerveau. Cependant, ils n'ont pas été en mesure de fournir une démonstration claire d'un tel mécanisme. En 1981, Peters et Harper ont également trouvé aucune corrélation cohérente entre l'apport en protéines et les concentrations de sérotonine dans le cerveau (Peters and Harper, 1981). Enfin, en 1984, Theall et al. ont spécifiquement étudié la régulation du ratio PG chez des rats sous auto-sélection (Theall et al., 1984). Ils ont proposé à des rats des régimes isocaloriques qui différaient par leur ratio PG (7-360%), et les rats ont adapté leurs consommations pour maintenir un ratio PG dans une fourchette étroite (30-40%). Les auteurs ont

supposé que le ratio d'apport en PG était régulé afin de limiter les changements dans les taux de sérotonine dans le cerveau. Ils basaient leur hypothèse sur de précédentes observations montrant que cette fourchette de ratio PG n'entraînait ni augmentation ni diminution des taux de sérotonine dans le cerveau (Fernstrom and Wurtman, 1971). Ainsi même s'il y a bien un lien entre la consommation de protéines et la sécrétion de sérotonine, aucun résultat ne semble valider l'hypothèse que ce soit ce mécanisme qui régit l'auto-sélection des protéines.

Cette hypothèse ne reposant pas sur des démonstrations concrètes, et au vu des récentes études montrant que FGF21 s'est révélé être une hormone importante signalant le niveau de l'apport protéique (Chaumontet et al., 2019; Gosby et al., 2016; Hill et al., 2019, 2018, 2017; Laeger et al., 2014), nous avons émis l'hypothèse que les rats choisissent un ratio PE élevé pour maintenir de faibles concentrations plasmatiques de FGF21. En effet, il a été montré que les concentrations plasmatiques de FGF21 augmentent exponentiellement lorsque l'apport protéique diminue en dessous des niveaux proches de ceux considérés comme nécessaires pour préserver l'équilibre azoté (10-15%). Cependant, à notre connaissance, les concentrations plasmatiques de FGF21 chez des rats sous auto-sélection alimentaire n'avaient pas encore été étudiées.

Dans le cadre de cette hypothèse, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques de FGF21 chez des rats sous auto-sélection entre un régime protéique et un régime sans protéine, où la quantité de glucides étaient de 30, 45, 60 ou 75% de l'énergie (**Etude 1 Page 59**). Les concentrations de FGF21 chez ces rats étaient reproductibles et très basses, et notamment significativement plus faibles que celles observées chez les rats nourris avec le régime composite témoin contenant 15% de protéines. Nos résultats suggèrent donc que lorsque les rats ont la possibilité de réguler finement l'apport en protéines indépendamment de l'apport énergétique, ils ajustent le ratio PE afin de minimiser les niveaux de FGF21 dans le plasma. FGF21 étant largement décrit comme un signal de stress métabolique, notamment en réponse à un déficit d'apport protéique (Chaumontet et al., 2019; Hill et al., 2019, 2018; Laeger et al., 2014), nous supposons donc que la minimisation de sa concentration plasmatique est un objectif de l'organisme. Les niveaux plus élevés de FGF21 mesurés chez les rats nourris avec un régime composite standard 15P pourrait refléter un niveau d'apport protéique sub-limitant, mais pourraient aussi refléter le fait que dans ces régimes standards riches en glucides, le ratio PG d'environ 20% est trop faible par rapport au niveau établi le plus souvent en condition d'auto-sélection. Ainsi, nous avons suggéré que chez les rats nourris avec des niveaux de protéines considérés comme adéquats (15%), l'augmentation des taux de FGF21 plasmatique observé vis-à-vis de rats en choix pourrait plutôt signaler l'inadéquation du rapport entre les protéines et les glucides dans le régime. Lorsque les rats étaient sous auto-sélection alimentaire, ils répondaient à la signalisation du FGF21 en ajustant l'apport en protéines en fonction de la teneur en glucides des régimes sans protéine, et régulaient un ratio PG d'environ 70%.

Les concentrations plasmatiques de FGF21 mesurées sous auto-sélection étaient beaucoup moins variables que celles observées chez les rats nourris avec le régime composite témoin avec 15% de protéines. Nous nous sommes demandés si les taux de FGF21 très variables d'un individu à l'autre sous régime standard 15P reflétaient au niveau individuel l'écart entre le niveau d'apport optimal en protéines et le niveau imposé par le régime. Nous avons donc fait l'hypothèse que plus les taux de FGF21 étaient élevés sous 15P, plus les rats consommeraient de protéines lorsqu'ils seraient mis en choix (**Etude 3 Page 134**). Cependant, nous n'avons observé aucune corrélation entre l'apport en protéines sélectionnées en condition de choix et les concentrations de FGF21 mesurées sous 15P. Si nous nous tenons à cette approche globale, il faut aboutir à la conclusion que les taux de FGF21 mesurés sous régime 15P ne reflètent pas l'écart entre les besoins en protéines de

l'individu et le niveau d'apport permis par le régime. Il faut cependant tenir compte du rôle potentiellement important joué par le fait que l'auto-sélection permet d'ajuster dans le temps les niveaux d'ingestion des protéines et de l'énergie. Ainsi, certains des rats de cette étude ont considérablement réduite leurs taux plasmatiques de FGF21 en période de choix sans modifier leur niveau d'apport protéique.

En conclusion, FGF21 semble jouer un rôle dans les mécanismes d'auto-sélection protéique. Cela est appuyé par le fait qu'il existe une littérature importante et croissante démontrant clairement que les animaux détectent sélectivement et ajustent de manière adaptative l'apport en protéines, et que FGF21 est fortement impliqué dans cette réponse.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont permis de mieux comprendre les liens entre le contrôle de l'ingestion des protéines et de l'énergie, notamment l'ingestion des glucides. Pour cela, deux stratégies ont été mises en place.

La première consistait à utiliser des modèles d'auto-sélection alimentaire permettant aux rats de consommer la quantité de protéines souhaitée indépendamment de la consommation énergétique. Elle a permis de mettre en évidence une régulation fine de l'apport protéique et plus précisément du ratio protéines/énergie (PE) d'en moyenne 30%. Cette valeur s'ajustait en fonction de la qualité et de la quantité de glucides dans les régimes, reflétant la recherche d'un équilibre du métabolisme énergétique au travers du maintien d'un ratio protéines/glucides (PG) stable proche de 70%. L'apport de protéines sélectionné, plus élevé que le besoin protéique (10-15%), semble en effet avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique en restreignant l'impact des régimes gras ou à haut indice glycémique.

La seconde consistait à utiliser des régimes à teneurs variables en protéines, glucides et lipides, créant ainsi un cadre géométrique avec douze combinaisons de macronutriments. Elle a permis de mettre en évidence que la variation des teneurs en protéines engendrait des effets bien plus importants sur la majorité des paramètres du métabolisme énergétique que les variations des teneurs en glucides et lipides.

La combinaison des deux stratégies a permis d'enrichir les connaissances sur l'hormone FGF21. Elle est déjà largement décrite comme le médiateur essentiel de la réponse métabolique à la restriction protéique. Nos résultats ont aussi montré que, contrairement à certaines études, seuls les teneurs en protéines, et pas en glucides, impactaient la concentration plasmatique en FGF21. Enfin, cette hormone semble aussi jouer un rôle dans les mécanismes d'auto-sélection des protéines, mais ce rôle reste à éclaircir.

La conclusion principale de ce projet est que, bien qu'un apport en protéines de 15% de l'énergie semble optimale pour le métabolisme protéique, il y a optimisation du métabolisme énergétique par un apport proche de 30%, s'ajustant selon les apports glucidiques. Cette conclusion n'a pas pour objectif de redéfinir le besoin en protéines tel qu'il est établi actuellement. Cependant, il a pour but d'alimenter la réflexion dans le cadre de la transition alimentaire en cours, qui a pour objectif, particulièrement dans les pays développés, ayant une consommation riche en glucides à haut indice glycémique, de réduire la consommation protéique notamment celle d'origine animale au profit de celle d'origine végétale. Nos résultats suggèrent que les protéines alimentaires ont un rôle qui va bien au-delà de la simple préservation du bilan azoté et que la quantité et la qualité des glucides de l'alimentation pourraient jouer un rôle important dans la régulation des apports protéiques. Ce paramètre devrait être pris en compte quand on envisage la réduction du niveau d'apport protéique. Du fait de la crise de Covid-19, les travaux de cette étude ont été faits uniquement avec des protéines totales de lait très équilibrées en acides aminés, car les expériences utilisant des protéines végétales ont dû être interrompues. Cependant selon les données de la littérature, les besoins en protéines pourraient être encore augmentés avec des protéines d'origine végétale limitées en certains acides aminés essentiels.

Références

- Acheson, K.J., Blondel-Lubrano, A., Oguey-Araymon, S., Beaumont, M., Emady-Azar, S., Ammon-Zufferey, C., Monnard, I., Pinaud, S., Nielsen-Moennoz, C., Bovetto, L., 2011. Protein choices targeting thermogenesis and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 525–534. <https://doi.org/10/bpv8mj>
- Adams, A.C., Gimeno, R.E., 2016. The Sweetest Thing: Regulation of Macronutrient Preference by FGF21. *Cell Metab.* 23, 227–228. <https://doi.org/10/gfzgz9>
- Adechian, S., Balage, M., Remond, D., Migne, C., Quignard-Boulange, A., Mareset-Baglieri, A., 2012. Protein feeding pattern, casein feeding, or milk-soluble protein feeding did not change the evolution of body composition during a short-term weight loss program. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012;303(8):E973–82.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), 2007. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations.
- Akhavan, T., Luhovyy, B.L., Brown, P.H., Cho, C.E., Anderson, G.H., 2010. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 966–975. <https://doi.org/10/c4nw2t>
- 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. <https://doi.org/10/bk7wv4>
- Andik, I., Bank, J., Moring, I., Szegvari, G.Y., 1954. The effect of exercise on the intake and selection of food in the rat. *Acta physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 1954;5(3-4):457–61.
- Andik, I., Donhoffer, S., Farkas, M., Schmidt, P., 1963. Ambient temperature and survival on a protein-deficient diet. *Br. J. Nutr.* 17, 257–261. <https://doi.org/10/fv5mj2>
- Anthony, T.G., Gietzen, D.W., 2013. Detection of amino acid deprivation in the central nervous system. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16, 96–101. <https://doi.org/10/gmmtvp>
- Aparecida de França, S., Dos Santos, M., Garofalo, D., 2009. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 2009;25(11-12):1186-92.
- Aparecida de França, S., dos Santos, M.P., Przygodna, F., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Magalhães, D.A., Bezerra, K.S., Colodel, E.M., Flouris, A.D., Andrade, C.M.B., Kawashita, N.H., 2016. A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. *Lipids* 51, 303–310. <https://doi.org/10/f8nkp3>
- Aparecida de França, S., Pavani Dos Santos, M., Nunes Queiroz da Costa, R.V., Froelich, M., Buzelle, S.L., Chaves, V.E., Giordani, M.A., Pereira, M.P., Colodel, E.M., Marlise Balbinotti Andrade, C., Kawashita, N.H., 2014. Low-protein, high-carbohydrate diet increases glucose uptake and fatty acid synthesis in brown adipose tissue of rats. *Nutrition* 30, 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.004>
- Arakawa, M., Masaki, T., Nishimura, J., Seike, M., Yoshimatsu, H., 2011. The effects of branched-chain amino acid granules on the accumulation of tissue triglycerides and uncoupling proteins in diet-induced obese mice. *Endocr. J.* 58, 161–170. <https://doi.org/10/fdzk9d>

- Arch, J.R.S., Hislop, D., Wang, S.J.Y., Speakman, J.R., 2006. Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int. J. Obes.* 30, 1322–1331. <https://doi.org/10/ddk58p>
- Arnal M., Beaufrère B., Benamouzig R., Boirie Y., Cynober L., Dardevet D., Darmaun D., Dupin H., Fromentin G., Gaudichon C., Grizard J., Huneau J.-F., Krempf M., Mahe S., Meynial-Denis D., Mosoni L., Patureau Mirand P., Pelletier X., Rerat A., Tomé D., 1997. LES PROTEINES, in: DOSSIER SCIENTIFIQUE DE L'IFN.
- Ashley, D.V.M., Anderson, G.H., 1975. Food Intake Regulation in the Weanling Rat: Effects of the Most Limiting Essential Amino Acids of Gluten, Casein, and Zein on the Self-selection of Protein and Energy. *J. Nutr.* 105, 1405–1411. <https://doi.org/10/gf9zx7>
- Ashley, D.V.M., Coscina, D.V., Anderson, G.H., 1979. Selective decrease in protein intake following brain serotonin depletion. *Life Sci.* 24(11), 12. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(79\)90315-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(79)90315-1)
- Azzout, B., Chanez, M., Bois-Joyeux, B., Peret, J., 1984. Gluconeogenesis from dihydroxyacetone in rat hepatocytes during the shift from a low protein, high carbohydrate to a high protein, carbohydrate-free diet. *J. Nutr.* 1984;114(11):2167–78.
- Azzout-Marniche, D., Chalvon-Demersay, T., Pimentel, G., Chaumontet, C., Nadkarni, N.A., Piedcoq, J., Fromentin, G., Tomé, D., Gaudichon, C., Even, P.C., 2016. Obesity-prone high-fat-fed rats reduce caloric intake and adiposity and gain more fat-free mass when allowed to self-select protein from carbohydrate:fat intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310, R1169–R1176. <https://doi.org/10/gf9zzv>
- Azzout-Marniche, D., Chaumontet, C., Nadkarni, N.A., Piedcoq, J., Fromentin, G., Tomé, D., Even, P.C., 2014. Food intake and energy expenditure are increased in high-fat-sensitive but not in high-carbohydrate-sensitive obesity-prone rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R299–R309. <https://doi.org/10/f6d2qr>
- Batterham, R.L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J.E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C.W., Thomas, E.L., Bell, J.D., Withers, D.J., 2006. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* 4, 223–233. <https://doi.org/10/fnxk23>
- Beaton, F., JR, V, S., J.A., 1964. Activity and Patterns of Rats Fed a Low-Protein Diet and the Effects of Subsequent Food Deprivation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 42, 705–18.
- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., Fromentin, G., 2002. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol Behav* 75, 577–582. <https://doi.org/10/cmsw2x>
- Bensaïd, Tomé, L'Heureux-Bourdon, Even, D, Morens, Gaudichon, Larue-Achagiotis, Fromentin, 2003. A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol. Behav.* 78, 311–320. <https://doi.org/10/df34hd>
- Berger, S., Vongaraya, N., 1966. Insulin response to ingested protein in diabetes. *Diabetes* 15, 303–306. <https://doi.org/10/gmmwrz>
- Blais, A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Tomé, D., Even, P.C., 2018. Low-protein diet-induced hyperphagia and adiposity are modulated through interactions involving thermoregulation, motor activity, and protein quality in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314, E139–E151. <https://doi.org/10/gc559r>
- Blake, H.H., Henning, S.J., 1986. Control of protein intake in the young rat. *Physiol. Behav.* 38, 607–611. <https://doi.org/10/ccwmtj>

- Blouet, C., Mariotti, F., Azzout-Marniche, D., 2006. The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J. Nutr.* 136, 1849–54. <https://doi.org/10/ghpv2r>
- Boghossian, S., Alliot, J., 2000. A moderate swimming exercise regularly performed throughout the life induces age and sex-related modifications in adaptive macronutrients choice. *Mech. Ageing Dev.* 120, 95–109. <https://doi.org/10/dmnbz9>
- Boghossian, S., Veyrat-Durebex, C., Alliot, J., 2000. Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats. *Physiol. Behav.* 2000;69(3):231–8.
- BonDurant, L.D., Ameka, M., Naber, M.C., Markan, K.R., Idiga, S.O., Acevedo, M.R., Walsh, S.A., Ornitz, D.M., Potthoff, M.J., 2017. FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metab.* 25, 935-944.e4. <https://doi.org/10/f9z86q>
- BonDurant, L.D., Potthoff, M.J., 2018. Fibroblast Growth Factor 21: A Versatile Regulator of Metabolic Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 38, 173–196. <https://doi.org/10/gg4gzk>
- Booth, D.A., 1985. Food-conditioned Eating Preferences and Aversions with Interoceptive Elements: Conditioned Appetites and Satieties. *Annals of the New York Academy of Sciences* 443, 22–41. <https://doi.org/10/b5m8sw>
- Booth, D.A., 1974. Food intake compensation for increase or decrease in the protein content of the diet. *Behavioral Biology* 12, 31–40. <https://doi.org/10/dz99rq>
- Bray, G.A., York, D.A., Swerloff, R.S., 1973. Genetic obesity in rats. I. The effects of food restriction on body composition and hypothalamic function. *Metabolism* 22, 435–42. <https://doi.org/10/fjxw5r>
- Brooks, G.A., Mercier, J., 1994. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the “crossover” concept. *J. Appl. Physiol.* 76, 2253–61. <https://doi.org/10/ggkgcw>
- Calet, C., Jouandet, C., Baratou, T., 1961. Variation de la consommation spontanée d’énergie du poussin en fonction de la nature des matières azotées du régime. *Reprod. Nutr. Dev.* 1, 5–9. <https://doi.org/10/ggsgzr>
- Castonguay, T.W., Hartman, W.J., Fitzpatrick, E.A., Stern, J.S., 1982. Dietary self-selection and the Zucker rat. *J. Nutr.* 112, 796–800. <https://doi.org/10/ggsgzx>
- Castonguay, T.W., Kaiser, L.L., Stern, J.S., 1986. Meal pattern analysis: artifacts, assumptions and implications. *Brain Res Bull* 17, 439–443. <https://doi.org/10/cnbgrg>
- Chalvon-Demersay, T., Even, P.C., Tomé, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., Azzout-Marniche, D., 2016. Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 36, 60–67. <https://doi.org/10/f86k5v>
- Chartoumpekis, D.V., Habeos, I.G., Ziros, P.G., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., Papavassiliou, A.G., 2011. Brown Adipose Tissue Responds to Cold and Adrenergic Stimulation by Induction of FGF21. *Mol. Med.* 17, 736–740. <https://doi.org/10/crnxc9>
- Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Blais, A., 2019. Low-protein and methionine, high starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and has little effect on adiposity in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 316, R486–R501. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00316.2018>

- Chaumontet, C., Even, P.C., Schwarz, J., Simonin-Foucault, A., Piedcoq, J., Fromentin, G., Azzout-Marniche, D., Tomé, D., 2015. High dietary protein decreases fat deposition induced by high-fat and high-sucrose diet in rats. *Br. J. Nutr.* 114, 1132–1142. <https://doi.org/10/f7vfp4>
- Chaumontet, C., Recio, I., Fromentin, G., Benoit, S., Piedcoq, J., Darcel, N., Tomé, D., 2018. The Protein Status of Rats Affects the Rewarding Value of Meals Due to their Protein Content. *J. Nutr.* 148, 989–998. <https://doi.org/10/gdrn84>
- Chee, K.M., Romsos, D.R., Bergen, W.G., 1981. Effect of Dietary Fat on Protein Intake Regulation in Young Obese and Lean Mice. *J. Nutr.* 111, 668–677. <https://doi.org/10/gf9zx8>
- Chevalier, L., Bos, C., Azzout-Marniche, D., Fromentin, G., Mosoni, L., Hafnaoui, N., 2005. Energy restriction only slightly influences protein metabolism in obese rats, whatever the level of protein and its source in the diet. *Int. J. Obes.* 2013;37(2):263–71.
- Cieslak, D.G., Benevenga, N.J., 1984. The effect of amino acid excess on utilization by the rat of the limiting amino acid–lysine. *J. Nutr.* 114(10):1863–70.
- Cohen, L.R., Woodside, B.C., 1989. Self-selection of protein during pregnancy and lactation in rats. *Appetite* 12, 119–136. <https://doi.org/10/dk2sng>
- Collier, G., Leshner, A.I., Squibb, R.L., 1969. Dietary self-selection in active and non-active rats. *Physiol. Behav.* 4, 79–82. <https://doi.org/10/c2q33b>
- Deutsch, J.A., Moore, B.O., Heinrichs, S.C., 1989. Unlearned specific appetite for protein. *Physiol. Behav.* 46, 619–624. <https://doi.org/10/bm83f4>
- Devkota, S., Layman, D.K., 2011. Increased ratio of dietary carbohydrate to protein shifts the focus of metabolic signaling from skeletal muscle to adipose. *Nutr. Metab.* 8, 13. <https://doi.org/10/dd332m>
- Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 2011. . Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- DiGirolamo, M., Fine, J.B., Tagra, K., Rossmanith, R., 1998. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am. J. Physiol.* 274.
- Donhoffer, S., Vonotzky, J., 1947. The effect of environmental temperature on food selection. *Am. J. Physiol.* 150, 329–333. <https://doi.org/10/ggsgzn>
- Du, F., Higginbotham, D.A., White, B.D., 2000. Food Intake, Energy Balance and Serum Leptin Concentrations in Rats Fed Low-Protein Diets. *J. Nutr.* 130, 514–521. <https://doi.org/10.1093/jn/130.3.514>
- Dushay, J.R., Toschi, E., Mitten, E.K., Fisher, F.M., Herman, M.A., Maratos-Flier, E., 2015. Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol. Metab.* 4, 51–57. <https://doi.org/10/gh2std>
- Elvert, R., Wille, A., Wandschneider, J., Werner, U., Glombik, H., Herling, A.W., 2013. Energy loss via urine and faeces - a combustive analysis in diabetic rats and the impact of antidiabetic treatment on body weight. *Diabetes Obes Metab* 15, 324–334. <https://doi.org/10/gmh bq7>
- Emmans, G.C., 1981. A model of the growth and feed intake of ad libitum fed animals, particularly poultry. *Computers in Animal Production* 103–10.
- Even, P.C., Bertin, E., Gangnerau, M.-N., Roseau, S., Tomé, D., Portha, B., 2003. Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in

- rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R751–R759. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2002>
- Even, P.C., Gehring, J., Tomé, D., 2021. What does self-selection of dietary proteins in rats tell us about protein requirements and body weight control? *Obes. Rev.* 1–15. <https://doi.org/10.1111/obr.13194>
- Even, P.C., Nadkarni, N.A., 2012. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303, R459–476. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00137.2012>
- Even, P.C., Rieth, N., Roseau, S., Larue-Achagiotis, C., 1998. Substrate oxidation during exercise in the rat cannot fully account for training-induced changes in macronutrients selection. *Metabolism* 47, 777–782. <https://doi.org/10/b3qrx4>
- Fajans, S.S., Floyd, J.C., 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. <https://doi.org/10/gmmwsr>
- FAO/WHO/UNU Expert Consultation, Nations, F. and A.O. of the U., Organization, W.H., University, U.N., 2007. Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. World Health Organization.
- Farnsworth, E., Luscombe, N.D., Noakes, M., Wittert, G., Argyiou, E., Clifton, P.M., 2003. Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003;78(1):31–9.
- Fernstrom, J.D., Wurtman, R.J., 1997. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Obes. Res.* 5, 377–380. <https://doi.org/10/ghdh35>
- Fernstrom, J.D., Wurtman, R.J., 1971. Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science* 173, 149–152. <https://doi.org/10/cd7nz6>
- Fisher, M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., Spiegelman, B.M., 2012. FGF21 regulates PGC-1 and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes & Development* 26, 271–281. <https://doi.org/10/fx2w26>
- Flatt, J.P., Ravussin, E., Acheson, K.J., Jequier, E., 1985. Effects of dietary fat on postprandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances. *J. Clin. Invest.* 76, 1019–24. <https://doi.org/10/bn3d9w>
- Floyd, J.C., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F., Rull, J., 1966. Insulin secretion in response to protein ingestion. *J. Clin. Invest.* 45, 1479–1486. <https://doi.org/10/cjxtm4>
- François, J.-C., Aïd, S., Chaker, Z., Lacube, P., Xu, J., Fayad, R., Côté, F., Even, P., Holzenberger, M., 2017. Disrupting IGF Signaling in Adult Mice Conditions Leanness, Resilient Energy Metabolism, and High Growth Hormone Pulses. *Endocrinology* 158, 2269–2283. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00261>
- Fulton, S., 2010. Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol* 31, 85–103. <https://doi.org/10/bqm9pz>
- Gannon, M.C., Nuttall, F.Q., 2010. Amino acid ingestion and glucose metabolism—a review. *IUBMB Life* 62, 660–668. <https://doi.org/10/cts9rk>
- Gannon, M.C., Nuttall, F.Q., 2006. Control of blood glucose in type 2 diabetes without weight loss by modification of diet composition. *Nutr. Metab.* 3. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-3-16>

- Gannon, M.C., Nuttall, F.Q., Neil, B.J., Westphal, S.A., 1988. The insulin and glucose responses to meals of glucose plus various proteins in type II diabetic subjects. *Metabolism* 37, 1081–1088. <https://doi.org/10/fvf5rn>
- Gehring, J., Gaudichon, C., Even, P.C., 2020. Influence de la teneur en protéines de l'alimentation sur le contrôle de la prise alimentaire et la régulation du poids. *Cah. Nutr. Diét.* 55, 223–232. <https://doi.org/10/ghpv4d>
- Gibson, E.L., Wainwright, C.J., Booth, D.A., 1995. Disguised protein in lunch after low-protein breakfast conditions food-flavor preferences dependent on recent lack of protein intake. *Physiol Behav* 58, 363–371. <https://doi.org/10/bkdmgh>
- Gietzen, D.W., 1993. Neural Mechanisms in the Responses to Amino Acid Deficiency. *J. Nutr.* 123, 610–625. <https://doi.org/10/gf9z2b>
- Gietzen, D.W., Hao, S., Anthony, T.G., 2007. Mechanisms of Food Intake Repression in Indispensable Amino Acid Deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 63–78. <https://doi.org/10/djrjnzq>
- Gimeno, R.E., Moller, D.E., 2014. FGF21-based pharmacotherapy – potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 303–311. <https://doi.org/10/f57h7r>
- Gosby, A.K., Conigrave, A.D., Lau, N.S., Iglesias, M.A., Hall, R.M., Jebb, S.A., Brand-Miller, J., Caterson, I.D., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2011. Testing Protein Leverage in Lean Humans: A Randomised Controlled Experimental Study. *PLoS ONE* 6, e25929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025929>
- Gosby, A.K., Lau, N.S., Tam, C.S., Iglesias, M.A., Morrison, C.D., Caterson, I.D., Brand-Miller, J., Conigrave, A.D., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2016. Raised FGF-21 and Triglycerides Accompany Increased Energy Intake Driven by Protein Leverage in Lean, Healthy Individuals: A Randomised Trial. *PLoS ONE* 11, e0161003. <https://doi.org/10/ggs2sk>
- Griffioen-Roose, S., Mars, M., Siebelink, E., Finlayson, G., Tome, D., Graaf, C., 2011. Protein status elicits compensatory changes in food intake and food preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012;95(1):32–8.
- Hall, K.D., 2019. The Potential Role of Protein Leverage in the US Obesity Epidemic. *Obesity* (Silver Spring. *Int. J. Obes.* 2019;27(8):1222–4.
- Hall, K.D., 2008. What is the Required Energy Deficit per unit Weight Loss? *Int. J. Obes.* 32. <https://doi.org/10/btwjqd>
- Hans Konrad Biesalski, Peter Grimm, Susanne Nowitzki-Grimm, 2017. Atlas de poche de nutrition, 2eme édition. ed, Atlas de poche. Médecine Sciences Publications - Lavoisier.
- Hao, S., Sharp, J.W., Ross-Inta, C.M., McDaniel, B.J., Anthony, T.G., Wek, R.C., Cavener, D.R., McGrath, B.C., Rudell, J.B., Koehnle, T.J., Gietzen, D.W., 2005. Uncharged tRNA and sensing of amino acid deficiency in mammalian piriform cortex. *Science* 307, 1776–1778. <https://doi.org/10/dws6td>
- Harper, A.E., Benevenga, N.J., Wohlhueter, R.M., 1970. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* 50, 428–558. <https://doi.org/10/gf9zz6>
- Hartsook, E.W., Hershberger, T.V., Nee, J.C.M., 1973. Effects of Dietary Protein Content and Ratio of Fat to Carbohydrate Calories on Energy Metabolism and Body Composition of Growing Rats. *J. Nutr.* 103, 167–178. <https://doi.org/10/gf9zx5>

- Harvey Anderson, G., Leprohon, C., Chambers, J.W., Coscina, D.V., 1979. Intact regulation of protein intake during the development of hypothalamic or genetic obesity in rats. *Physiol. Behav.* 23, 751–755. <https://doi.org/10/dbbm6n>
- Hegsted, D.M., Neff, R., 1970. Efficiency of protein utilization in young rats at various levels of intake. *J. Nutr.* 1970;100(10):1173–9.
- Henry, Y., Rerat, A., 1963. Variations de la consommation spontanée d'énergie en fonction de la nature et de la quantité des matières azotées chez le rat en croissance. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*.
- Hill, C.M., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., Morrison, C.D., 2018. Homeostatic sensing of dietary protein restriction: A case for FGF21. *Front. Neuroendocrinol.* 51, 125–131. <https://doi.org/10/gfh76x>
- Hill, C.M., Laeger, T., Albarado, D.C., McDougal, D.H., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., Morrison, C.D., 2017. Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10/gbvfn>
- Hill, C.M., Laeger, T., Dehner, M., Albarado, D.C., Clarke, B., Wanders, D., Burke, S.J., Collier, J.J., Qualls-Creekmore, E., Solon-Biet, S.M., Simpson, S.J., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., Morrison, C.D., 2019. FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism. *Cell rep.* 27, 2934-2947.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.022>
- Hollstein, T., Heinitz, S., Ando, T., Rodzevik, T.L., Walter, M., Chang, D.C., Krakoff, J., Piaggi, P., 2020. The metabolic responses to 24-h fasting and mild cold exposure in overweight individuals are correlated and accompanied by changes in FGF21 concentration. *Diabetes* 37.
- Hondares, E., Iglesias, R., Giral, A., Gonzalez, F.J., Giral, M., Mampel, T., Villarroya, F., 2011. Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue. *J. Biol. Chem.* 286, 12983–12990. <https://doi.org/10/d5scvh>
- Hood, D.A., Terjung, R.L., 1990. Amino Acid Metabolism During Exercise and Following Endurance Training: *Sports Med.* 9, 23–35. <https://doi.org/10/bq6hnz>
- Hrupka, B.J., Lin, Y., Gietzen, D.W., Rogers, Q.R., 1999. Lysine Deficiency Alters Diet Selection without Depressing Food Intake in Rats. *J. Nutr.* 129, 424–430. <https://doi.org/10/ggsgz7>
- Huang, X., Hancock, D.P., Gosby, A.K., McMahon, A.C., Solon, S.M.C., Le Couteur, D.G., Conigrave, A.D., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2013. Effects of dietary protein to carbohydrate balance on energy intake, fat storage, and heat production in mice: Protein Leverage and Thermogenesis in Mice. *Obesity* 21, 85–92. <https://doi.org/10/f45cnx>
- Jean, C., Fromentin, G., Tomé, D., Larue-Achagiotis, C., 2002. Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiol. Behav.* 76, 65–73. <https://doi.org/10/d46sg2>
- Jean, C., Rome, S., Mathé, V., Huneau, J.-F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C.L., Tomé, D., 2001. Metabolic Evidence for Adaptation to a High Protein Diet in Rats. *J. Nutr.* 131, 91–98. <https://doi.org/10/ghd2cw>
- Johnson, D.J., Li, E.T.S., Coscina, D.V., Harvey Anderson, G., 1979. Different diurnal rhythms of protein and non-protein energy intake by rats. *Physiol. Behav.* 22, 777–780. <https://doi.org/10/c8nvm3>
- Journel, M., Chaumontet, C., Darcel, N., Fromentin, G., Tomé, D., 2012. Brain Responses to High-Protein Diets. *Adv. Nutr.* 3, 322–329. <https://doi.org/10/f33j4t>

- Kanarek, R.B., 1985. Determinants of dietary self-selection in experimental animals. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 940–950. <https://doi.org/10/ggsg6p>
- Kaur, N., Gupta, A.K., 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27, 703–714. <https://doi.org/10/c75j3j>
- Kishi, K., Rikimaru, K., Matsumoto, Y., Shizuka, F., Inoue, G., 1982. Constancy of net protein intake in rats on self-selection regimen with proteins of various qualities. *Japanese Journal of Physiology* 32, 959–970. <https://doi.org/10/bgx3hq>
- Konkle, A.T.M., Sreter, K.B., Baker, S.L., Bielajew, C., 2003. Chronic paroxetine infusion influences macronutrient selection in male Sprague-Dawley rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74, 883–890. <https://doi.org/10/bjbvmx>
- Kratz, C.M., Levitsky, D.A., 1979a. Responses to protein dilution in the adult female rat. *Physiol. Behav.* 23, 709–715. <https://doi.org/10/cn882z>
- Kratz, C.M., Levitsky, D.A., 1979b. Dietary obesity: Differential effects with self-selection and composite diet feeding techniques. *Physiol. Behav.* 22, 245–249. <https://doi.org/10/bc9x8k>
- Lacroix, M., Gaudichon, C., Martin, A., Morens, C., Mathe, V., Tome, D., 2004. A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287. <https://doi.org/10/dvpf8d>
- Laeger, T., Albarado, D.C., Burke, S.J., Trosclair, L., Hedgepeth, J.W., Berthoud, H.-R., Gettys, T.W., Collier, J.J., Münzberg, H., Morrison, C.D., 2016. Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell rep.* 16, 707–716. <https://doi.org/10/gf9wk9>
- Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., Morrison, C.D., 2014. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922. <https://doi.org/10/f6f43c>
- Larue-Achagiotis, C., Martin, C., Verger, P., Louis-Sylvestre, J., 1992. Dietary self-selection vs. complete diet: Body weight gain and meal pattern in rats. *Physiol. Behav.* 51, 995–999. <https://doi.org/10/fkfc3k>
- Larue-Achagiotis, C., Rieth, N., Louis-Sylvestre, J., 1994. Exercise training modifies nutrient self-selection in rats. *Physiol. Behav.* 56, 367–372. <https://doi.org/10/fng3c4>
- Le Bellego, L., van Milgen, J., Dubois, S., Noblet, J., 2001. Energy utilization of low-protein diets in growing pigs. *J Anim Sci* 79, 1259–1271. <https://doi.org/10/gmh49>
- Lee, P., Brychta, R.J., Linderman, J., Smith, S., Chen, K.Y., Celi, F.S., 2013. Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E98-102. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3107>
- Leibowitz, S.F., Lucas, D.J., Leibowitz, K.L., Jhanwar, Y.S., 1991. Developmental patterns of macronutrient intake in female and male rats from weaning to maturity. *Physiol. Behav.* 50, 1167–1174. <https://doi.org/10/ctrw6j>
- Leshner, A., Siegel, H., Collier, G., 1971. Dietary Self-Selection by Pregnant and Lactating Rats. *Physiol. Behav.* 4. <https://doi.org/10/bxt89n>
- Leshner, A.I., Collier, G.H., Squibb, R.L., 1971. Dietary self-selection at cold temperatures. *Physiol. Behav.* 6, 1–3. <https://doi.org/10/d78n4v>

- Leung, P., Rogers, Q., 1971. Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am. J. Physiol.* 221, 929–935. <https://doi.org/10/ggsg69>
- L'Heureux-Bouron, D., Tomé, D., Bensaid, A., Morens, C., Gaudichon, C., Fromentin, G., 2004. A very high 70%-protein diet does not induce conditioned taste aversion in rats. *J. Nutr.* 134, 1512–1515. <https://doi.org/10/ghd2cx>
- Li, E.T.S., Anderson, G.H., 1982. Meal composition influences subsequent food selection in the young rat. *Physiol. Behav.* 29, 779–783. <https://doi.org/10/ctxttp>
- Liang, Q., Zhong, L., Zhang, J., Wang, Y., Bornstein, S.R., Triggie, C.R., Ding, H., Lam, K.S.L., Xu, A., 2014. FGF21 Maintains Glucose Homeostasis by Mediating the Cross Talk Between Liver and Brain During Prolonged Fasting. *Diabetes* 63, 4064–4075. <https://doi.org/10/f6p8nt>
- Lieberman, H.R., Fulgoni, V.L., Agarwal, S., Pasiakos, S.M., Berryman, C.E., 2020. Protein intake is more stable than carbohydrate or fat intake across various US demographic groups and international populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 112, 180–186. <https://doi.org/10/gg4hn7>
- Lin, Z., Gong, Q., Wu, C., Yu, J., Lu, T., Pan, X., Lin, S., Li, X., 2012. Dynamic Change of Serum FGF21 Levels in Response to Glucose Challenge in Human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E1224–E1228. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1132>
- Lundsgaard, A.-M., Fritzen, A.M., Sjøberg, K.A., Myrmel, L.S., Madsen, L., Wojtaszewski, J.F.P., Richter, E.A., Kiens, B., 2017. Circulating FGF21 in humans is potently induced by short term overfeeding of carbohydrates. *Mol. Metab.* 6, 22–29. <https://doi.org/10/gf9hmc>
- Makarios-Lahham, L., Roseau, S.M., Fromentin, G., Tome, D., Even, P.C., 2004. Rats Free to Select between Pure Protein and a Fat-Carbohydrate Mix Ingest High-Protein Mixed Meals during the Dark Period and Protein Meals during the Light Period. *J. Nutr.* 134, 618–624. <https://doi.org/10/gf9zzf>
- Marmonier, C., Chapelot, D., Louis-Sylvestre, J., 2000. Effects of macronutrient content and energy density of snacks consumed in a satiety state on the onset of the next meal. *Appetite* 34, 161–168. <https://doi.org/10/bkqcjs>
- Martens, E.A., Lemmens, S.G., Westerterp-Plantenga, M.S., 2013. Protein leverage affects energy intake of high-protein diets in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 97, 86–93. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.046540>
- Martens, E.A., Tan, S.-Y., Dunlop, M.V., Mattes, R.D., Westerterp-Plantenga, M.S., 2014. Protein leverage effects of beef protein on energy intake in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 1397–1406. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.078774>
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419. <https://doi.org/10/dbht47>
- Mayer, J., Dickie, M.M., Bates, M.W., Vitale, J.J., Usdin, M., Birkeland, J.M., 1951. Free Selection of Nutrients by Hereditarily Obese Mice. *Science* 113, 2. <https://doi.org/10/d4zr3z>
- McArthur, R.A., Blundell, J.E., 1982. Effects of age and feeding regimen on protein and carbohydrate self-selection. *Appetite* 3, 153–162. <https://doi.org/10/fxzbdc>
- Miller, G.D., Hrupka, B.J., Gietzen, D.W., Rogers, Q.R., Stern, J.S., 1994. Rats on a Macronutrient Self-selection Diet Eat Most Meals From a Single Food Cup. *Appetite* 23, 67–78. <https://doi.org/10/bgxcrt>

- Moghaddam, E., Vogt, J.A., Wolever, T.M.S., 2006. The effects of fat and protein on glycemic responses in nondiabetic humans vary with waist circumference, fasting plasma insulin, and dietary fiber intake. *J Nutr* 136, 2506–2511. <https://doi.org/10/gmmwtc>
- Morrison, C.D., Laeger, T., 2015. Protein-dependent regulation of feeding and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 256–262. <https://doi.org/10/f7chr5>
- Morrison, C.D., Reed, S.D., Henagan, T.M., 2012. Homeostatic regulation of protein intake: in search of a mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, R917–R928. <https://doi.org/10/f3zrjj>
- Mullen, B.J., Martin, R.J., 1992. Novel approach to diet design for determining macronutrient preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 42, 343–346. <https://doi.org/10/fcg2jh>
- 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. <https://doi.org/10/ghjkfn>
- Nadkarni, N.A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Piedcoq, J., Fromentin, G., Tomé, D., Even, P.C., 2013. The Carbohydrate Sensitive Rat as a Model of Obesity. *PLoS ONE* 8, e68436. <https://doi.org/10/f5dkrx>
- Nieuwenhuizen, A.G., Hochstenbach-Waelen, A., Veldhorst, M.A.B., Westerterp, K.R., Engelen, M.P.K.J., Brummer, R.-J.M., Deutz, N.E.P., Westerterp-Plantenga, M.S., 2009. Acute effects of breakfasts containing alpha-lactalbumin, or gelatin with or without added tryptophan, on hunger, “satiety” hormones and amino acid profiles. *Br J Nutr* 101, 1859–1866. <https://doi.org/10/ctrz2f>
- Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., 1991. Plasma Glucose and Insulin Response to Macronutrients in Nondiabetic and NIDDM Subjects. *Diabetes Care* 14, 824–838. <https://doi.org/10/cts63v>
- Parizkova, J., Stankova, L., 1964. Influence of Physical Activity on a Treadmill on the Metabolism of Adipose Tissue in Rats. *Br. J. Nutr.* 18, 325–32.
- Pencharz, P.B., Ball, R.O., 2003. Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr* 23, 101–116. <https://doi.org/10/ftr7fw>
- 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.
- Peters, J.C., Harper, A.E., 1984. Influence of dietary protein level on protein self-selection and plasma and brain amino acid concentrations. *Physiol. Behav.* 33, 783–790. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90048-9)
- Peters, J.C., Harper, A.E., 1981. Protein and energy consumption, plasma amino acid ratios, and brain neurotransmitter concentrations. *Physiol. Behav.* 27, 287–298. <https://doi.org/10/d3zxx6>
- Petersen, B.L., Ward, L.S., Bastian, E.D., Jenkins, A.L., Campbell, J., Vuksan, V., 2009. A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia. *Nutrition Journal* 8, 47. <https://doi.org/10/dzx62r>
- Petzke, K.J., Friedrich, M., Metges, C.C., Klaus, S., 2005. Long-term dietary high protein intake up-regulates tissue specific gene expression of uncoupling proteins 1 and 2 in rats. *Eur. J. Nutr.* 44, 414–421. <https://doi.org/10/c87gwb>
- Petzke, K.J., Riese, C., Klaus, S., 2007. Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats. *J. Nutr. Biochem.* 18, 400–407. <https://doi.org/10/bf9xwk>

- Pezeshki, A., Chelikani, P.K., 2021. Low Protein Diets and Energy Balance: Mechanisms of Action on Energy Intake and Expenditure. *Front Nutr* 8, 655833. <https://doi.org/10/gk3jtb>
- Pezeshki, A., Zapata, R.C., Singh, A., Yee, N.J., Chelikani, P.K., 2016. Low protein diets produce divergent effects on energy balance. *Sci. Rep.* 6.
- Pichon, L., Huneau, J.-F., Fromentin, G., Tomé, D., 2006. A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J. Nutr.* 136, 1256–1260. <https://doi.org/10/ghn3d3>
- Pichon, L., Potier, M., Tome, D., Mikogami, T., Laplaize, B., Martin-Rouas, C., Fromentin, G., 2008. High-protein diets containing different milk protein fractions differently influence energy intake and adiposity in the rat. *Br. J. Nutr.* 99, 739–748. <https://doi.org/10/d2322z>
- Piquard, F., Schaefer, A., Haberey, P., 1977. Influence of Fasting and Protein Deprivation on Food Self-Selection in the Rat. *Physiol. Behav.* 8. <https://doi.org/10/cw63x2>
- Pol, G., den Hartog, C., 1966. The dependence on protein quality of the protein to calorie ratio in a freely selected diet and the usefulness of giving protein and calories separately in protein evaluation experiments. *Br. J. Nutr.* 20, 649–661. <https://doi.org/10/dtrq7c>
- Pullar, J.D., Webster, A.J., 1974. Heat loss and energy retention during growth in congenitally obese and lean rats. *Br. J. Nutr.* 31, 377–92. <https://doi.org/10/dmz8b7>
- Radcliffe, J.D., Webster, A.J.F., 1978. Sex, body composition and regulation of food intake during growth in the Zucker rat. *Br. J. Nutr.* 39, 483–492. <https://doi.org/10/b8xgmf>
- Radcliffe, J.D., Webster, A.J.F., 1976. Regulation of food intake during growth in fatty and lean female Zucker rats given diets of different protein content. *Br. J. Nutr.* 36, 457–469. <https://doi.org/10/c8nbjt>
- Ranawana, V., Kaur, B., 2013. Role of Proteins in Insulin Secretion and Glycemic Control, in: *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier, pp. 1–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416555-7.00001-1>
- Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2019. Protein Leverage: Theoretical Foundations and Ten Points of Clarification. *Obesity* 27, 1225–1238. <https://doi.org/10/ghntt6>
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123. <https://doi.org/10/ghjkfp>
- Richter, C.P., Holt Jr., L.E., Barelare Jr., B., 1938. Nutritional requirements for normal growth and reproduction in rats studied by the self-selection method. *Am. J. Physiol.* 122, 734–744. <https://doi.org/10/ggsg2d>
- Rieth, N., Larue-Achagiotis, C., 1997. Exercise Training Decreases Body Fat More in Self-Selecting Than in Chow-Fed Rats. *Physiol. Behav.* 62, 1291–1297. <https://doi.org/10/bg5s7p>
- Romsos, D.R., Chee, K.M., Bergen, W.G., 1982. Protein Intake Regulation in Adult Obese (ob/ob) and Lean Mice: Effects of Nonprotein Energy Source and of Supplemental Tryptophan. *J. Nutr.* 112, 505–513. <https://doi.org/10/gf9z2s>
- Romsos, D.R., Ferguson, D., 1982. Self-selected intake of carbohydrate, fat, and protein by obese (ob/ob) and lean mice. *Physiol. Behav.* 28, 301–305. <https://doi.org/10/b7bbwd>
- Rothwell, N.J., Stock, M.J., 1987. Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diets. *J. Nutr.* 117, 1721–1726. <https://doi.org/10.1093/jn/117.10.1721>

- Rothwell, N.J., Stock, M.J., Tyzbir, R.S., 1983. Mechanisms of thermogenesis induced by low protein diets. *Metab. Clin. Exp.* 32, 257–261.
- Rozin, P., 1968. Are carbohydrate and protein intakes separately regulated? *J. Comp. Physiol. Psychol.* 65, 23–29. <https://doi.org/10/dqhrw>
- Sánchez, J., Palou, A., Picó, C., 2009. Response to Carbohydrate and Fat Refeeding in the Expression of Genes Involved in Nutrient Partitioning and Metabolism: Striking Effects on Fibroblast Growth Factor-21 Induction. *Endocrinology* 150, 5341–5350. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0466>
- Saner, C., Tassoni, D., Harcourt, B.E., Kao, K.T., Alexander, E.J., McCallum, Z., 2020. Evidence for Protein Leverage in Children and Adolescents with Obesity. *Obesity* 2020;28(4):822–9.
- Schollenberger, A.E., Karschin, J., Meile, T., Kuper, M.A., Konigsrainer, A., Bischoff, S.C., 2015. Impact of protein supplementation after bariatric surgery: A randomized controlled double-blind pilot study. *Nutrition* 2016;32(2):186–92.
- Shor-Posner, G., Ian, C., Brennan, G., Cohn, T., Moy, H., Ning, A., Leibowitz, S.F., 1991. Self-selecting albino rats exhibit differential preferences for pure macronutrient diets: Characterization of three subpopulations. *Physiol. Behav.* 50, 1187–1195. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90581-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90581-8)
- Simpson, S.J., Batley, R., Raubenheimer, D., 2003. Geometric analysis of macronutrient intake in humans: the power of protein? *Appetite* 2003;41(2):123–40.
- Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 2020. The power of protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 112, 6–7. <https://doi.org/10/gg4hn6>
- Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 2005. Obesity: the protein leverage hypothesis. *Obes. Rev.* 6, 133–142. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2005.00178.x>
- Skov, A.R., Toubro, S., Rønn, B., Holm, L., Astrup, A., 1999. Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int. J. Obes.* 23, 528–536. <https://doi.org/10/dm8wgj>
- Smith, B.K., Andrews, P.K., West, D.B., 2000. Macronutrient diet selection in thirteen mouse strains. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R797–R805. <https://doi.org/10/ggsgz9>
- Solon-Biet, S.M., Cogger, V.C., Pulpitel, T., Heblinski, M., Wahl, D., McMahon, A.C., Warren, A., Durrant-Whyte, J., Walters, K.A., Krycer, J.R., Ponton, F., Gokarn, R., Wali, J.A., Ruohonen, K., Conigrave, A.D., James, D.E., Raubenheimer, D., Morrison, C.D., Le Couteur, D.G., Simpson, S.J., 2016. Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework. *Cell Metab.* 24, 555–565. <https://doi.org/10/f89gzz>
- Sørensen, A., Mayntz, D., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2008. Protein-leverage in Mice: The Geometry of Macronutrient Balancing and Consequences for Fat Deposition. *Obesity* 16, 566–571. <https://doi.org/10/c2d587>
- Specter, S.E., Hamilton, J.S., Stern, J.S., Horwitz, B.A., 1995. Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency or brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr.* 1995;125(8):2183–93.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., Häring, H.-U., 2017. Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocr. Rev.* 38, 468–488. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00016>

- Steinruck, U., 1994. The origin of the specific protein hunger of layers by investigating their responses in dietary self-selection. *Arch Geflügeld* 57, 42–7.
- Stepien, M., Azzout-Marniche, D., Even, P.C., Khodorova, N., Fromentin, G., Tomé, D., Gaudichon, C., 2016. Adaptation to a high-protein diet progressively increases the postprandial accumulation of carbon skeletons from dietary amino acids in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 311, R771–R778. <https://doi.org/10/f9ckd8>
- Stepien, M., Gaudichon, C., Fromentin, G., Even, P., Tomé, D., Azzout-Marniche, D.D., 2011. Increasing Protein at the Expense of Carbohydrate in the Diet Down-Regulates Glucose Utilization as Glucose Sparing Effect in Rats. *PLoS ONE* 6, np. <https://doi.org/10/d39j45>
- Swick, R.W., Gribskov, C.L., 1983. The Effect of Dietary Protein Levels on Diet-Induced Thermogenesis in the Rat. *J. Nutr.* 113, 2289–2294. <https://doi.org/10.1093/jn/113.11.2289>
- Tagliaferro, A.R., Dobbin, S., Curi, R., Leighton, B., Meeker, L.D., Newsholme, E.A., 1990. Effects of diet and exercise on the in vivo rates of the triglyceride-fatty acid cycle in adipose tissue and muscle of the rat. *Int. J. Obes.* 1990;14(11):957–71.
- Tanphaichitr, V., Zaklama, M.S., Broquist, H.P., 1976. Dietary lysine and carnitine: relation to growth and fatty livers in rats. *J. Nutr.* 1976;106(1):111–7.
- Tempel, D.L., Shor-Posner, G., Dwyer, D., Leibowitz, S.F., 1989. Nocturnal patterns of macronutrient intake in freely feeding and food-deprived rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 256, R541–R548. <https://doi.org/10/ggsgz3>
- Theall, C.L., Wurtman, J.J., Wurtman, R.J., 1984. Self-Selection and Regulation of Protein:Carbohydrate Ratio in Foods Adult Rats Eat. *J. Nutr.* 114, 711–718. <https://doi.org/10/ggsgz2>
- Thibault, L., Mok, E., Nagai, K., Wong, C., 1999. Serotonin infusion in the SCN reduces casein ingestion in rats. *Physiol. Behav.* 68, 37–45. <https://doi.org/10/b8d6th>
- Tomé, D., Chaumontet, C., Even, P.C., Darcel, N., Azzout-Marniche, D., 2019. Protein status modulates the rewarding value of foods and meals to maintain an adequate protein intake. *Physiol. Behav.* 206, 7–12. <https://doi.org/10/gfzg74>
- Tomé, D., Chaumontet, C., Even, P.C., Darcel, N., Thornton, S.N., Azzout-Marniche, D., 2020. Protein Status Modulates an Appetite for Protein To Maintain a Balanced Nutritional State-A Perspective View. *J. Agric. Food Chem.* 68, 1830–1836. <https://doi.org/10/ggnrxx>
- Veldhorst, M., Smeets, A., Soenen, S., Hochstenbach-Waelen, A., Hursel, R., Diepvens, K., Lejeune, M., Luscombe-Marsh, N., Westerterp-Plantenga, M., 2008. Protein-induced satiety: effects and mechanisms of different proteins. *Physiol Behav* 94, 300–307. <https://doi.org/10/fgcnwr>
- Veldhorst, M.A.B., Nieuwenhuizen, A.G., Hochstenbach-Waelen, A., Westerterp, K.R., Engelen, M.P.K.J., Brummer, R.-J.M., Deutz, N.E.P., Westerterp-Plantenga, M.S., 2009. A breakfast with alpha-lactalbumin, gelatin, or gelatin + TRP lowers energy intake at lunch compared with a breakfast with casein, soy, whey, or whey-GMP. *Clin Nutr* 28, 147–155. <https://doi.org/10/d8tvq4>
- Vienberg, S.G., Jacobsen, S.H., Worm, D., Hvolris, L.E., Naver, L., Almdal, T., Hansen, D.L., Wulff, B.S., Clausen, T.R., Madsbad, S., Holst, J.J., Andersen, B., 2017. Increased glucose-stimulated FGF21 response to oral glucose in obese nondiabetic subjects after Roux-en-Y gastric bypass. *Clin. Endocrinol.* 86, 156–159. <https://doi.org/10/f9g3td>

- von Holstein-Rathlou, S., BonDurant, L.D., Peltekian, L., Naber, M.C., Yin, T.C., Claflin, K.E., Urizar, A.I., Madsen, A.N., Ratner, C., Holst, B., Karstoft, K., Vandenbeuch, A., Anderson, C.B., Cassell, M.D., Thompson, A.P., Solomon, T.P., Rahmouni, K., Kinnamon, S.C., Pieper, A.A., Gillum, M.P., Potthoff, M.J., 2016. FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab.* 23, 335–343. <https://doi.org/10/bbj9>
- Webster, A.J.F., 1993. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc. Nutr. Soc.* 52, 69–76. <https://doi.org/10/dzbbt5>
- Weir, J.B.D.B., 1949. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol.* 109, 1–9. <https://doi.org/10/ggfg59>
- Weltman, A., Weltman, J.Y., Schurrer, R., Evans, W.S., Veldhuis, J.D., Rogol, A.D., 1985. Endurance training amplifies the pulsatile release of growth hormone: effects of training intensity. *J. Appl. Physiol.* 1992;72(6):2188–96.
- Westerterp-Plantenga, M.S., 2008. Protein intake and energy balance. *Regul. Pept.* 149, 67–9. <https://doi.org/10/dgt4wh>
- White, B.D., He, B., Dean, R.G., Martin, R.J., 1994. Low Protein Diets Increase Neuropeptide Y Gene Expression in the Basomedial Hypothalamus of Rats. *J. Nutr.* 124, 1152–1160. <https://doi.org/10/gf9zzc>
- White, B.D., Porter, M.H., Martin, R.J., 2000. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol. Behav.* 2000;69(4-5):383-9.
- Wu, Y., Li, B., Li, L., Mitchell, S.E., Green, C.L., D'Agostino, G., Wang, G., Wang, L., Li, M., Li, J., Niu, C., Jin, Z., Wang, A., Zheng, Y., Douglas, A., Speakman, J.R., 2021. Very-low-protein diets lead to reduced food intake and weight loss, linked to inhibition of hypothalamic mTOR signaling, in mice. *Cell Metab.* 33, 888-904.e6. <https://doi.org/10/gjxwj7>
- Wurtman, R.J., Fernstrom, J.D., 1975. Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 638–647. <https://doi.org/10/ghdh38>
- Yo, T., Siegel, P., Faure, J., Picard, M., 1998. Self-selection of dietary protein and energy by broilers grown under a tropical climate: adaptation when exposed to choice feeding at different ages. *Poult. Sci.* 77, 502–508. <https://doi.org/10/ggsgz6>
- Zhao, X.Q., Jorgensen, H., Gabert, V.M., Eggum, B.O., 1996. Energy metabolism and protein balance in growing rats housed in 18 degree C or 28 degree C environments and fed different levels of dietary protein. *J. Nutr.* 1996;126(8):2036–43.

Titre : Impact du niveau d'apport protéino-glucidique sur l'homéostasie et le contrôle de l'ingestion des protéines et de l'énergie

Mots clés : Apport protéique ; Auto-sélection alimentaire ; Apport énergétique ; Composition corporelle ; Dépense énergétique ; Fibroblast growth factor 21.

Résumé : Le niveau d'apport protéique est contrôlé de façon très précise par des signaux agissant sur le comportement alimentaire qui visent à atteindre et réguler un niveau d'apport « cible », communément de 10-20% de l'apport énergétique, pour équilibrer le bilan azoté. Cependant, les études d'auto-sélection alimentaire montrent que les rats, mais aussi d'autres espèces, ayant la possibilité de séparer le contrôle de l'ingestion des protéines du contrôle de l'ingestion des glucides et des lipides consomment en moyenne 30% de protéines. L'homéostasie protéique ne semble donc pas être le seul critère qui régule le niveau d'apport protéique. Certaines études suggèrent en effet que l'ingestion d'un niveau élevé de protéines au dépend des glucides aurait des effets métaboliques positifs permettant de réduire la dépendance du métabolisme vis-à-vis de l'insuline, de limiter la prise de poids et de gras, et de réduire le développement de syndromes métaboliques.

L'objectif de cette thèse était de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'ingestion de protéine et leur interaction avec le contrôle énergétique. Les travaux réalisés ont montré que même si une teneur en protéine de 15% était suffisante pour assurer le métabolisme protéique, elle ne l'était pas pour optimiser le métabolisme énergétique par rapport au niveau sélectionné par les rats. Le niveau protéique choisi était en moyenne de 30%, et était défendu en s'ajustant à la quantité et à la qualité des glucides proposés, notamment en diminuant proportionnellement à la baisse de l'index glycémique des régimes. Nos résultats suggèrent aussi que FGF21 joue un rôle dans l'orientation des choix alimentaires vers les protéines, puisque les rats en auto-sélection alimentaire maintiennent des taux plasmatiques de FGF21 très bas. Enfin, les taux de FGF21 n'étaient régulés que par le niveau d'apport protéique, et étaient insensibles à l'apport glucidique.

Title : Impact of protein-carbohydrate intake level on homeostasis and control of protein and energy intake

Keywords : Protein intake ; Dietary self-selection ; Energy intake ; Body composition ; Energy expenditure ; Fibroblast growth factor 21.

Abstract : The level of protein intake is very tightly controlled by signals acting on feeding behaviour that aim to achieve and regulate a "target" level of intake, commonly 10-20% of energy intake, to equilibrate the nitrogen balance. However, dietary self-selection studies show that rats, but also other species, with the possibility to separate the control of protein intake from the control of carbohydrate and fat intake consume on average 30% protein. Protein homeostasis does not seem to be the only criterion that regulates the level of protein intake. Some studies suggest that ingesting a high level of protein at the expense of carbohydrates would have positive metabolic effects that would reduce the dependence of the metabolism on insulin, limit weight and fat gain, and reduce the development of metabolic syndromes. The objective of this thesis was to better understand the control mechanisms of protein intake, their interaction with energy control and the

consequences of these processes on food intake and body composition regulations. The work performed showed that although a protein level of 15% was sufficient to ensure protein metabolism, it was not sufficient to optimize energy metabolism compared to the level selected by the rats. The selected protein level averaged 30%, and was defended by adjusting to the quantity and quality of carbohydrates provided, particularly by decreasing in proportion to the decrease in the glycemic index of the diets. Our results also suggest that FGF21 plays a role in directing dietary choices toward protein, as rats in dietary self-selection maintain very low plasma FGF21 levels. Finally, FGF21 levels were only regulated by the level of protein intake, and were insensitive to carbohydrate intake.