



HAL
open science

Les abondances naturelles des isotopes stables de l'azote chez le rat : facteurs de variabilité et application pour l'étude des flux azotés et de l'impact métabolique de conditions nutritionnelles et physiopathologiques par modélisation compartimentale.

Nathalie Poupin

► To cite this version:

Nathalie Poupin. Les abondances naturelles des isotopes stables de l'azote chez le rat : facteurs de variabilité et application pour l'étude des flux azotés et de l'impact métabolique de conditions nutritionnelles et physiopathologiques par modélisation compartimentale.. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0003 . pastel-00927219

HAL Id: pastel-00927219

<https://pastel.hal.science/pastel-00927219>

Submitted on 12 Jan 2014

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.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Physiologie de la Nutrition

présentée et soutenue publiquement par

Nathalie POUPIN

le 10 janvier 2013

Les abondances naturelles des isotopes stables de l'azote chez le rat : facteurs de variabilité et application pour l'étude des flux azotés et de l'impact métabolique de conditions nutritionnelles et physiopathologiques par modélisation compartimentale

Directeur de thèse : **Jean-François HUNEAU**

Co-directrice de thèse : **Hélène FOUILLET**

Jury

M. Dominique DARDEVET, Directeur de Recherche, UMR 1019 UNH, INRA
M. Jacob van MILGEN, Ingénieur de recherche, UMR 1348 PEGASE, INRA
M. Vincent BALTER, Chargé de Recherche, UMR 5276 LGLTPE, CNRS-ENS Lyon
M. Philippe SCHMIDELY, Professeur, UMR 791 MoSAR, INRA-AgroParisTech
Mme Hélène FOUILLET, Chargée de Recherche, UMR 914 PNCA, INRA-AgroParisTech
M. Jean-François HUNEAU, Professeur, UMR 914 PNCA, INRA-AgroParisTech

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examinatrice
Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué dans l'unité mixte de recherche INRA/AgroParisTech de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, dans le cadre d'une allocation de recherche du Ministère de l'Éducation et de la Recherche.

Je tiens tout d'abord à remercier Dominique Dardevet et Jacob van Milgen, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Philippe Schmidely et Vincent Balter, d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je suis également très reconnaissante au Pr. Daniel Tomé de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie sincèrement Jean-François Huneau, directeur de cette thèse, pour la qualité de son encadrement scientifique et pour m'avoir fait largement profiter de ses idées et ses compétences.

Mes plus vifs et chaleureux remerciements vont à Hélène Fouillet, qui a co-encadré ce travail de thèse et qui m'a fait confiance pour la réalisation de ce projet. Je la remercie sincèrement de m'avoir fait partager ses connaissances et compétences en modélisation et en nutrition : j'ai beaucoup appris à travers nos échanges. Je lui suis en particulier très reconnaissante pour sa grande disponibilité tout au long de ce travail et pour son soutien et sa sympathie au quotidien.

Je souhaite également exprimer mes sincères remerciements à François Mariotti, pour son implication dans ce travail et sa disponibilité : ses conseils avisés et ses relectures attentives m'ont été plus que précieux.

Hélène, François, Jean-François, je tiens ici à vous remercier sincèrement pour l'enthousiasme que vous avez montré pour mon travail au cours de ces années, pour nos discussions scientifiques qui ont su me donner goût à la recherche et pour votre aide technique et vos conseils, toujours pertinents et chaleureux, qui m'ont énormément apporté.

Je ne saurais oublier Cécile Bos, qui a assuré le co-encadrement de la première partie de ma thèse. Je la remercie pour son aide précieuse dans la mise en place des études, pour ses nombreux conseils et pour sa gentillesse.

Je suis très reconnaissante à toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail. Je remercie chaleureusement Catherine Luengo de m'avoir initiée à la spectrométrie de masse, toujours dans la bonne humeur. Un grand merci à Angélique Foucault-Simonin, Véronique Mathé et Julien Piedcoq pour leur aide technique et leurs précieux conseils lors des expérimentations. Merci également à Maryline, Jérôme, Natalia et Lilia qui ont participé en tant que stagiaires à ce projet. Je tiens également à remercier les chercheurs de l'équipe "Protéines, métabolisme des acides aminés et prévention du syndrome métabolique", Dominique Hermier et Annie Quignard-Boulangier, pour leurs conseils et leurs encouragements à différentes étapes de ma thèse.

Je remercie Frédérique Clément (INRIA Rocquencourt), Dominique Dardevet (UMR 1019 INRA Clermont-Ferrand) et Illa Tea (CEISAM, CNRS-Université de Nantes), pour avoir fait partie de mon comité de thèse et dont les conseils ont contribué à l'avancement de ce projet.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Jean-Philippe Godin et Serge Rezzi (Nestlé Research Center, Lausanne) pour leur collaboration et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, et je suis très reconnaissante à la société Nestec d'avoir assuré le support financier d'une partie de ce travail.

Enfin, je tiens à remercier très sincèrement tous les membres du laboratoire pour leur accueil, leur sympathie et leur aide : j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à vos côtés tous les jours. Merci particulièrement à François Mariotti, Annaïg Lan et Anne Blais, dont j'ai partagé le bureau pendant quelques années ou quelques mois et qui m'ont apporté le plaisir quotidien de leur bonne humeur. Et merci aussi à Julien (qui, finalement, aura un peu aussi partagé mon bureau !) pour son oreille toujours attentive. Je remercie également tous les doctorants, anciens et actuels, pour les bons moments passés ensemble au cours de ces quatre années, avec une pensée particulière pour ceux avec lesquels j'ai partagé de nombreux déjeuners : Juliane, Anne-Sophie, Claire et Claire, Aurélie, Sabria, Najoua, Emilien, Caroline ... merci pour votre présence et votre soutien. Enfin, un petit clin d'œil à Juliane pour notre collaboration scientifique fructueuse !

Et parce que malgré tout, il n'y a pas eu que les rats et la modélisation pendant ces 4 années, je terminerai en remerciant tous ceux qui me sont proches, famille et amis, et qui m'ont soutenue sur le plan personnel pendant ma thèse.

Marion, Noémie, Elise, Cécile, Raphy, Simon, Florent, François, Bruno ... vous avez toujours répondu présents pour me changer les idées avec un verre, un dîner, un barbecue, un anniversaire surprise (!) ... la liste est longue, et parce que, de toute façon, quelques mots, perdus dans une thèse qui en compte plus de 100 000, sont bien peu en comparaison de tous vos messages d'encouragements, vos textos, vos mails, je n'en dirai qu'un seul, mais très sincèrement : Merci !

Un immense merci également à ma sœur (mon time manager !) pour son soutien sans faille : merci de m'avoir reboostée et coachée avec autant d'assiduité : ces derniers mois auront été bien studieux et stressants pour toutes les deux, mais ça en valait la peine.

Enfin merci à mes parents (avec un remerciement tout particulier à ma relectrice appliquée) d'avoir toujours su m'écouter, m'encourager et me remotiver pendant ces quatre dernières années et bien avant : vous avez tout simplement toujours été là quand j'en avais besoin, alors tout simplement merci !

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	6
Abstract	7
Liste des Figures	8
Liste des Tableaux	11
Liste des Annexes et Fiches Techniques.....	12
Liste des Abréviations.....	13
Liste des Articles et Communications	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	15
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
A. Le système complexe des flux d'azote inter- et intra-organes : Comment sont-ils organisés, quelles sont leurs valeurs et les méthodes utilisées pour les étudier, et comment sont-ils coordonnés et modulés ?.....	17
I. Diversité, organisation et coordination des flux métaboliques azotés et méthodes d'investigation.....	17
I.1. Assimilation de l'azote par le sous-système absorbant du tractus gastro-intestinal	18
I.2. Élimination de l'azote par différentes voies	21
I.3. Transferts et échanges inter-organes d'AA	25
I.4. Utilisation anabolique des AA par les organes	27
I.5. Coordination des flux d'échange inter et intra-organes et représentations régionales ou globales	32
II. Régulations et modulations nutritionnelles et physio-pathologiques des flux azotés dans l'organisme	37
II.1. Variabilité temporelle et régulation homéostatique à court terme des flux azotés	37
II.2. Modulations des flux azotés en réponse à des modifications quantitatives et qualitatives de l'apport en P	42
II.3. Altérations des flux azotés dans des conditions nutritionnelles défavorables ou des situations physio-pathologiques particulières	48
B. Les abondances isotopiques naturelles : quelles informations peuvent-elles nous apporter sur le métabolisme protéique et les flux d'azote dans l'organisme ?	58
I. Abondances isotopiques naturelles et fractionnement isotopique : définitions, notations et principes généraux	59
I.1. Définitions, notations et méthodes de mesure	59
I.2. Fractionnement et effet isotopiques.....	60
II. Facteurs de variabilité intra et inter-individuelle des abondances isotopiques naturelles de l'azote et capacité de ces abondances à constituer des signatures de l'impact métabolique de conditions nutritionnelles et physio-pathologiques particulières	63
II.1. Existence d'une discrimination isotopique entre tissus et régime ($\Delta^{15}\text{N}$) en lien avec le catabolisme protéique	64
II.2. Existence d'une variabilité intra-individuelle, inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ en lien avec la compartimentation et la variabilité régionale du métabolisme azoté	67
II.3. Existence d'une variabilité inter-individuelle des $\Delta^{15}\text{N}$ selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques, en lien avec des modulations des flux azotés	69
III. Interprétation et exploitation des abondances isotopiques par modélisation : relations avec le métabolisme protéique et les flux azotés	78
III.1. Intérêt de la modélisation pour interpréter et expliquer la variabilité tissulaire ou individuelle des $\delta^{15}\text{N}$ à l'état stationnaire en relation avec les flux azotés	79
III.2. Analyse des variations temporelles des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires en termes de vitesse de renouvellement et de croissance tissulaires	84

C. Conclusions et Justification des travaux personnels	90
Fiche technique n°1.....	94
CHAPITRE 2 : TRAVAUX PERSONNELS	98
A. ÉTUDE 1 (article n°1) : Variations des abondances isotopiques naturelles en azote ($\delta^{15}\text{N}$) dans différents tissus chez le rat en réponse à une modulation nutritionnelle : effet de la qualité des protéines alimentaires.....	98
B. ÉTUDE 2 : Variations des abondances isotopiques naturelles en azote et en carbone ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) dans différents tissus chez le rat dans une situation pré-pathologique : effet d'un syndrome métabolique nutritionnellement induit associant insulino-résistance et obésité.....	100
C. ÉTUDE 3 (article n°2) : Analyse des dynamiques tissulaires d'incorporation isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) après un changement de régime pour l'étude du renouvellement protéique.	102
D. ÉTUDE 4 : Modélisation multi-compartimentale des variations intra- et inter-individuelles des abondances isotopiques naturelles en azote ($\delta^{15}\text{N}$) pour l'étude des flux azotés de l'organisme et de leurs modulations.....	104
Fiche technique n°2.....	138
DISCUSSION GÉNÉRALE	141
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	152
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155
ANNEXES	179

RÉSUMÉ

Les abondances relatives naturelles des différents isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) varient selon les tissus au sein d'un individu et selon les individus au sein d'une population, et ces différences reflètent à la fois les caractéristiques de structure et de fonctionnement du métabolisme azoté et ses modulations en lien avec des variations des conditions nutritionnelles et physio-pathologiques. Cette thèse vise, à travers une approche couplée d'expérimentation et de modélisation, à mieux caractériser et comprendre les modulations des $\delta^{15}\text{N}$ des différents pools azotés et à démontrer la capacité des $\delta^{15}\text{N}$ à fournir des informations sur les flux azotés de l'organisme, leurs valeurs et modulations, qui sont encore mal connus. Nous avons, dans un premier temps, mesuré les $\delta^{15}\text{N}$ dans plusieurs tissus (intestin, foie, plasma, muscles, rein, peau...) et dans différentes fractions azotées (acides aminés, protéines, urée, NH_4) chez le rat, dans différentes conditions nutritionnelles (chez des rats nourris avec des P de qualité différente, les protéines de lait et de soja) ou physiopathologiques (chez des rats présentant ou non un syndrome métabolique, associant insulino-résistance et obésité, après avoir consommé un même régime potentiellement obésogène). Ces données expérimentales nous ont permis (i) de montrer que l'écart de $\delta^{15}\text{N}$ entre les protéines tissulaires et le régime est plus important lorsque la qualité protéique est moindre, et (ii) de mettre en évidence que, lors de l'initiation précoce d'un syndrome métabolique associant insulino-résistance et obésité, les $\delta^{15}\text{N}$ de certains pools métaboliques sont modulés et constituent des signatures isotopiques des modulations métaboliques associées. Par ailleurs, grâce à l'analyse par modélisation compartimentale des cinétiques de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées expérimentalement dans les fractions acides aminés et protéines de différents tissus après augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ du régime, nous avons pu estimer les taux de renouvellement protéique tissulaires et explorer la structure et le fonctionnement des échanges entre acides aminés et protéines des différents tissus et comparer leur degré de compartimentation. Enfin, nous avons développé un modèle multi-compartimental reproduisant l'ensemble des flux azotés inter- et intra-organes de l'organisme et rendant compte des variations de $\delta^{15}\text{N}$ observées. Cette représentation globale du métabolisme azoté fournit une vision novatrice du fonctionnement intégré du métabolisme azoté dont les données éparses de la littérature ne donnaient auparavant qu'une vision parcellaire et fragmentée. Le modèle a permis de reconstituer les mécanismes qui conduisent à l'observation de différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre pools azotés, de mieux comprendre quelles modulations sont les plus susceptibles d'affecter les $\delta^{15}\text{N}$, avec quelle amplitude et dans quel sens, et finalement d'expliquer les variations de $\delta^{15}\text{N}$ mises en évidence expérimentalement en terme de modulation des flux azotés. L'ensemble de nos résultats d'expérimentation et de modélisation démontre la capacité des $\delta^{15}\text{N}$ à apporter des informations sur les flux métaboliques azotés et souligne l'intérêt prometteur de cette approche nouvelle pour acquérir une compréhension intégrée du système complexe du métabolisme azoté inter- et intra-organes et des processus homéostatiques qui le régulent et de ses dérégulations pré-pathologiques.

Mots Clés : abondances isotopiques naturelles ($\delta^{15}\text{N}$) – modélisation compartimentale – métabolisme des protéines et des acides aminés – renouvellement protéique – flux d'azote inter-organes – qualité protéique – syndrome métabolique – discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$) – fractionnement isotopique.

ABSTRACT

Natural abundances of stable nitrogen isotopes vary among tissues within an individual and among individuals within a population, and these differences are linked to the structural and functioning characteristics of the nitrogen metabolism and also to its modulations in response to variations in nutritional and physiological conditions. In this thesis, we developed an approach combining both experimentation and modeling, in order to better characterize and understand the modulations in the $\delta^{15}\text{N}$ values of various nitrogen metabolic pools, and to show the capacity of the $\delta^{15}\text{N}$ to provide information regarding the values and modulations of the body nitrogen fluxes, that are still poorly determined. We first measured the $\delta^{15}\text{N}$ in various tissues (intestine, liver, plasma, muscle, kidney, skin ...) and in various nitrogen fractions (amino acids, proteins, urea, NH_4) in rats, under different nutritional (*i.e.* in rats fed with P of distinct quality, that were milk and soy P) or pathophysiological (*i.e.* in rats that had or not become obese and insulin resistant after being fed a high-fat diet for 10 weeks). From these experimental data, we showed (i) that the tissue nitrogen discrimination (*i.e.*, the difference between tissue and diet $\delta^{15}\text{N}$) is higher when the P is of lesser quality, and (ii) that, during the onset of a metabolic syndrome, in the presence of both insulin resistance and obesity, the $\delta^{15}\text{N}$ differed in some nitrogen pools and thus constitute isotopic signatures of the metabolic impact of such conditions. In this thesis, we also measured the $\delta^{15}\text{N}$ kinetics in the amino acid and protein fractions of several tissues after a shift in the diet $\delta^{15}\text{N}$. The analysis of these kinetics, using a compartmental modeling approach, enabled us to estimate tissue fractional turnover rates and to investigate the structure and the functioning of the protein synthesis and breakdown exchanges in some tissues and their level of compartmentation. Lastly, we developed a multi-compartmental model that describes the various body nitrogen transfers between and within tissues and accounts for the observed $\delta^{15}\text{N}$ variability. This model of the nitrogen metabolism provides a new and systemic insight of the interactions and modulations of the various nitrogen fluxes, as opposed to the fragmented information available from the literature data. This model enabled us to reconstruct the mechanisms that caused the observed $\delta^{15}\text{N}$ differences between nitrogen pools, to better understand how they vary, depending on which metabolic modulation and with which amplitude, and finally to hypothesize which nitrogen fluxes alterations are the more likely to be responsible for the $\delta^{15}\text{N}$ variations that we observed in our experimentations. In conclusion, our experimental and modeling results show that it is feasible to gain information from the $\delta^{15}\text{N}$ values regarding the metabolic nitrogen fluxes and their modulations, and highlight the interest of this new approach to get an integrated insight into the complex nitrogen metabolic system and a better understanding of the way the various between and within tissues nitrogen fluxes are regulated and altered.

Keywords: natural isotopic abundances ($\delta^{15}\text{N}$) – compartmental modeling – protein and amino acid metabolism – protein turnover – inter-tissues nitrogen fluxes – protein quality – metabolic syndrome – isotopic discrimination ($\Delta^{15}\text{N}$) – isotopic fractionation.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Métabolisme des protéines et des acides aminés chez l'homme.
- Figure 2. Flux de transit, de sécrétion et d'absorption d'azote alimentaire et endogène dans le tractus gastro-intestinal.
- Figure 3. Flux d'urée et d'ammoniaque dans l'intestin.
- Figure 4. Représentation schématique des flux d'urée dans l'organisme.
- Figure 5. Relation entre le niveau d'apport protéique et la production d'urée chez l'homme adulte.
- Figure 6. Principaux échanges inter-organes d'AA.
- Figure 7. Flux net d'AA dans les zones périphérique et splanchnique à l'état postabsorptif chez l'homme.
- Figure 8 : Représentation schématique des principaux flux impliqués dans le maintien de l'homéostasie des AA et des P à l'échelle corps-entier.
- Figure 9. Effet de l'administration d'une large dose d'AA sur les estimations de FSR musculaire.
- Figure 10. Modèle théorique de la compartimentation du pool précurseur des synthèses protéiques.
- Figure 11. Modèle théorique du renouvellement protéique tissulaire.
- Figure 12. Modèle à 3 compartiments représentant les flux d'AA au niveau tissulaire.
- Figure 13. Stimulation des taux de synthèses hépatiques en réponse à une hyperaminoacidémie.
- Figure 14. Modèle à 6 compartiments du renouvellement protéique chez la souris.
- Figure 15. Modèle multi-compartimental de la distribution et du métabolisme de l'azote alimentaire en phase postprandiale chez l'homme.
- Figure 16. Variations du métabolisme protéique à l'échelle corps-entier lors des phases postabsorptive et postprandiale.
- Figure 17. Bilans splanchniques et musculaires des acides aminés ramifiés (BCAA) et non ramifiés (N-BCAA) avant et après l'ingestion d'un repas mixte chez l'homme.
- Figure 18. Modulation des échanges d'AA entre la zone splanchnique et le muscle lors de l'ingestion d'un repas.
- Figure 19. Variations de l'excrétion urinaire lors des phases postabsorptive et postprandiale en fonction du niveau d'apport protéique.
- Figure 20. Variations des flux de synthèse et dégradation protéiques musculaires en réponse à une hyperaminocidémie.
- Figure 21. Variations des flux musculaires de leucine en réponse à une hyperinsulinémie seule ou associée à une hyperaminoacidémie.
- Figure 22. Variations des flux musculaires de phénylalanine en réponse à une hyperinsulinémie.
- Figure 23. Effet de la qualité des P alimentaires sur la production et l'hydrolyse de l'urée en phase postprandiale chez l'homme.
- Figure 24. Effet du niveau d'apport protéique sur la synthèse protéique corporelle totale chez le rat.
- Figure 25. Effet du niveau d'apport protéique sur les taux de renouvellement hépatique et musculaire chez le rat.
- Figure 26. Effet du diabète de type 2 et de l'obésité sur les cinétiques protéiques à l'échelle corps-entier.
- Figure 27. Effet du diabète de type 2 sur les cinétiques protéiques à l'échelle corps-entier et sur le taux de renouvellement protéique musculaire.
- Figure 28. Effet de l'obésité sur le renouvellement protéique musculaire en phases postabsorptive et postprandiale chez l'homme.

- Figure 29. Effet de l'obésité sur le renouvellement protéique en phases postabsorptive et postprandiale chez la souris.
- Figure 30. Corrélation entre la masse grasse et le renouvellement protéique musculaire chez l'homme.
- Figure 31. Effet de l'obésité sur le débit sanguin au niveau musculaire chez le rat.
- Figure 32. Représentation schématique de la relation entre l'existence d'un effet isotopique et l'observation d'un fractionnement isotopique.
- Figure 33. Fractionnement isotopique dans un réseau métabolique théorique.
- Figure 34. Compositions isotopiques du précurseur et de ses flux d'utilisation au niveau d'un embranchement métabolique.
- Figure 35. Valeurs moyennes de $\Delta^{15}\text{N}$ dans plusieurs classes taxonomiques.
- Figure 36. Valeurs moyennes de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ observées dans le collagène des os chez des mammifères d'Afrique de l'Est.
- Figure 37. Relations entre le régime alimentaire et les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des cheveux chez l'homme
- Figure 38. Relation entre les $\delta^{15}\text{N}$ et les concentrations en acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) dans les cellules sanguines (RBC).
- Figure C39-a. Comparaison des valeurs moyennes de $\Delta^{15}\text{N}$ entre plusieurs tissus et organes.
- Figure C39-b. Comparaison des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ entre plusieurs tissus chez la souris.
- Figure 40. Comparaison des valeurs individuelles de $\Delta^{15}\text{N}$ des AA issus des P musculaires et hépatiques chez le Rat.
- Figure 41. Comparaison des valeurs individuelles de $\delta^{15}\text{N}$ des AA issus des cheveux et des protéines plasmatiques chez l'Homme.
- Figure 42. Relation entre les $\Delta^{15}\text{N}$ dans le sang et la qualité des protéines alimentaires chez des mammifères et oiseaux.
- Figure 43. Effet d'une période de jeûne sur les $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie et le muscle chez l'oiseau.
- Figure 44. Relation entre les $\delta^{15}\text{N}$ et le bilan azoté chez le caribou (*Rangifer tarandus*).
- Figure 45. Variations de la masse corporelle et du $\delta^{15}\text{N}$ dans les urines au cours de périodes de restriction énergétique et de réalimentation chez un bonobo (*Pan paniscus*).
- Figure 46. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans le plasma et les urines en relation avec la masse corporelle pendant la période d'hibernation chez l'écureuil arctique (*Urocyon parryi*).
- Figure 47. Relation entre le $\Delta^{15}\text{N}$ et la teneur en N du régime (%N) chez l'oiseau (Paruline à croupion jaune, *Dendroica coronata*).
- Figure 48. Relation entre les $\delta^{15}\text{N}$ et la quantité de régime consommée chez le poisson (Carpe, *Cyprinus carpio L.*).
- Figure 49. Comparaison des $\delta^{15}\text{N}$ des cellules sanguines chez des oiseaux (macareux rhinoceros, *Cerorhinca monocerata*) nourris *ad libitum* ("Control") ou restreints ("Restricted").
- Figure 50. Relation entre les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ corps-entier et l'efficacité de la rétention protéique chez le poisson (Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*).
- Figure 51-a. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux chez la femme au cours de la grossesse en fonction du gain de poids.
- Figure 51-b. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ dans les cheveux chez une femme au cours de la grossesse.
- Figure 52. Evolution des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux chez une personne anorexique en phase de reprise de poids.
- Figure 53. Comparaison des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ mesurés dans les cheveux chez des personnes cirrhotiques par rapport à des personnes en bonne santé.
- Figure 54. Modèle proposé par Ponsard & Averbuch pour expliquer le saut trophique au niveau corps entier.

- Figure 55. Modèles proposés par Schoeller *et al.* pour expliquer le saut trophique et les variations tissulaires de $\delta^{15}\text{N}$.
- Figure 56-a. Modèle proposé par Balter *et al.* pour prédire les $\Delta^{15}\text{N}$ de différents compartiments azotés corporels.
- Figure 56-b. Prédications du modèle de Balter *et al.* concernant les $\Delta^{15}\text{N}$ de différents compartiments azotés corporels.
- Figure 57. Modèle proposé par Martinez del Rio & Wolf pour expliquer le saut trophique au niveau corps-entier et ses modulations.
- Figure 58. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ des P plasmatiques, des P intestinales et de l'urée en fonction du niveau d'apport protéique chez des rats nourris à un régime à base de caséine complétement en méthionine.
- Figure 59. Evolutions des $\delta^{15}\text{N}$ dans le sang (a), le foie (b) et le muscle (c) après une modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime chez la souris.
- Figure 60. Evolutions théoriques des teneurs isotopiques d'un élément X (δX) dans différents tissus chez un individu migrant d'un milieu A à un milieu B dont les ressources présentent des compositions isotopiques distinctes.
- Figure 61. Evolutions des $\delta^{15}\text{N}$ dans la peau (b), le plasma (h) et le sang (j) après une modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime chez la tortue Caouanne (*Caretta caretta*).
- Figure 62 : Modèle multi-compartimental décrivant les flux azotés corporels et les signatures isotopiques naturelles de l'azote chez le rat.
- Figure 63 : système d'équations différentielles décrivant les évolutions des variables d'état du modèle multi-compartimental : exemple des compartiments musculaires.
- Figure 64 : Définitions des principaux flux d'échanges pour un tissu T
- Figure 65 : Ajustements des prédictions du modèle aux données expérimentales pour les tailles en N de chaque compartiment.
- Figure 66 : Ajustements des prédictions du modèle aux données expérimentales pour les $\delta^{15}\text{N}$ de chaque compartiment.
- Figure 67 : Simulations des évolutions du $\delta^{15}\text{N}$ (A), de la taille (B), des flux et du renouvellement (C) du compartiment protéique musculaire en réponse à des modifications de ses taux de synthèse et dégradation.
- Figure 68 : Simulations des $\delta^{15}\text{N}$ des compartiments protéiques musculaire, hépatique et intestinal en réponse à des modifications des taux de transfert d'AA.
- Figure 69 : Simulations des flux métaboliques et des $\delta^{15}\text{N}$ lors d'une variation de la qualité protéique
- Figure 70 : Simulations des flux métaboliques et des $\delta^{15}\text{N}$ lors d'une augmentation de l'apport protéique.
- Figure 71 : Simulations des $\delta^{15}\text{N}$ lors d'un jeûne d'intensité variable.
- Figure 72 : Simulations de l'évolution du $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle en relation avec le $\delta^{15}\text{N}$ des P musculaires et les variations de la masse protéique et des flux métaboliques musculaires.
- Figure 73 : Relation entre les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les pools d'excrétion et l'efficacité du recyclage entéro-hépatique de l'urée (f_{UH}/f_{UP}).
- Figure 74. Schéma d'interprétation générale des variations de $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction des caractéristiques qualitatives et quantitatives de l'apport en P et AA.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Flux d'azote dans le tractus gastro-intestinal
- Tableau 2 : Cinétiques de l'urée mesurées dans différentes études chez l'homme pour des niveaux d'apports protéiques variables
- Tableau 3 : FSR mesurés dans différents tissus chez le rat
- Tableau 4 : Flux régionaux d'AA : relations entre les flux de transport depuis le plasma, les flux d'utilisation pour les synthèses protéiques et les flux d'oxydation
- Tableau 5 : Variations nycthémérales des flux azotés
- Tableau 6 : Effet d'une hyperaminoacidémie sur les cinétiques protéiques
- Tableau 7 : Effet d'une hyperinsulinémie sur les cinétiques protéiques
- Tableau 8 : Mesures de la qualité de différentes protéines alimentaires chez l'homme et le rat selon différents indices
- Tableau 9 : Effet de la nature et du profil en AA des P alimentaires sur les flux azotés
- Tableau 10 : Modulations des cinétiques protéiques associées au diabète de type 2
- Tableau 11 : Modulations des cinétiques protéiques associées à l'obésité
- Tableau 12 : Effets isotopiques mesurés dans la littérature et associés à différentes réactions impliquées dans le métabolisme de l'azote
- Tableau 13 : Comparaison des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ des excréta de plusieurs espèces de mammifères rapportées dans la littérature
- Tableau 14 : Comparaison des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées dans différents tissus chez des mammifères non ruminants rapportées dans la littérature
- Tableau 15 : Analyse des données de la littérature concernant les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction de la qualité des protéines alimentaires
- Tableau 16 : Analyse des données de la littérature concernant les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en réponse à des restrictions modérées ou sévères de l'apport protéique et en relation avec les variations de la masse corporelle
- Tableau 17 : Variations des valeurs de discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$) pour des apports azotés élevés
- Tableau 18 : Données expérimentales utilisées pour la calibration du modèle
- Tableau 19 : Valeurs des flux et paramètres k et ϵ du modèle
- Tableau 20 : Comparaison des prédictions du modèle et des données de la littérature concernant la contribution relative des différents tissus à la synthèse protéique corporelle totale.
- Tableau 21 : Comparaison des prédictions du modèle et des données de la littérature concernant le bilan net d'AA totaux à travers les zones splanchnique et périphérique.
- Tableau 22 : Principaux paramètres du modèle modifiés pour simuler des situations de jeûne d'intensité variable
- Tableau 23 : Variations majeures des flux, grandeurs d'intérêt et tailles des compartiments prédites par le modèle lors de la simulation d'un jeûne d'intensité variable
- Tableau 24 : Valeurs de discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$) tissulaires chez le rongeur : comparaison des valeurs obtenues dans nos travaux expérimentaux et des données rapportées dans la littérature

LISTE DES ANNEXES ET FICHES TECHNIQUES

Annexe n°1 : Détermination des flux de production, d'excrétion et de recyclage de l'urée par perfusion d'urée doublement marquée

Annexe n°2 : Estimation du renouvellement protéique à l'échelle corps entier par l'utilisation d'AA traceurs

Annexe n°3 : Mesure du taux fractionnaire de synthèse protéique (FSR) à partir de données cinétiques de traceurs

Annexe n°4 : Mesure du taux fractionnaire de dégradation protéique (FBR) à partir de données cinétiques de traceurs

Annexe n°5 : Détermination des cinétiques des AA au niveau tissulaire : analyse par un modèle à 3 compartiments des données de bilans d'organes et de traceurs isotopiques

Annexe n°6 : Principales mesures utilisées pour évaluer la qualité nutritionnelle des protéines

Annexe n°7 : Principe de la mesure des $\delta^{15}\text{N}$ par EA-IRMS

Annexe n°8 : Définition et calcul du facteur de fractionnement isotopique

Fiche technique n°1 : Relations entre flux azotés et abondances isotopiques naturelles de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) dans les systèmes métaboliques

Fiche technique n°2 : Formulation mathématique des équations différentielles du modèle multi-compartimental : évolutions des quantités d'azote et des enrichissements isotopiques dans un compartiment

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α : facteur de fractionnement isotopique

$\delta^{15}\text{N}$: abondance naturelle des isotopes stables de l'azote dans un pool métabolique donné

$\Delta^{15}\text{N}$: écart d'abondance naturelle des isotopes stables de l'azote dans un pool donné par rapport au régime (discrimination)

AA : acides aminés

AACR : acides aminés à chaîne latérale ramifiée

AAG : acides aminés glucoformateurs

AAI : acides aminés indispensables

DP : dégradation protéique

FBR : vitesse fractionnaire de dégradation protéique

FSR : vitesse fractionnaire de synthèse protéique

HA : hyperaminoacidémie

HI : hyperinsulinémie

IR : insulino-résistance

N : azote

P : protéines

SM : syndrome métabolique

SP : synthèse protéique

TGI : tractus gastro-intestinal

LISTE DES ARTICLES ET COMMUNICATIONS

× Publications

Poupin N, Huneau J-F, Mariotti F, Tomé D, Bos C, & Fouillet H. (2013) **Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues**. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304(3): R218-31. Epub 7 Nov 2012.

Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D & Fouillet H. (2011) **The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet ¹⁵N discrimination factors in laboratory rats**. *PLoS ONE*. 6(11):e28046. Epub 22 Nov 2011.

× Communications orales

Poupin N., F. Mariotti, J.-F. Huneau, J.-P. Godin, D. Hermier, H. Fouillet. Les abondances isotopiques naturelles signent l'initiation nutritionnelle du syndrome métabolique. *10^{èmes} Journées Francophones de Nutrition (JFN)*, 12-14 décembre 2012, Lyon, France.

Poupin N., Huneau JF., Mariotti F., Bos C., Tomé D., Fouillet H. Une nouvelle méthode d'estimation des taux de renouvellement protéique multi-organes par l'analyse des trajectoires isotopiques azotées tissulaires après augmentation de l'enrichissement du régime. *8^{èmes} Journées Francophones de Nutrition (JFN)*, 8-10 décembre 2010, Lille, France.

Poupin N., H. Fouillet, F. Mariotti, D. Tome, J.-F. Huneau et C. Bos. La qualité des protéines alimentaires influence les compositions isotopiques naturelles en azote des tissus chez le rat. *4^{ème} congrès de la Société Française de Nutrition (SFN)*, 10-12 décembre 2009, Montpellier, France.

Poupin N., Bos C., Mariotti F., Tomé D., Huneau JF., Fouillet H. Les cinétiques d'enrichissement isotopique naturel de l'azote mesurées dans différents tissus après un changement de régime reflètent les taux tissulaires de renouvellement protéique. *4^{èmes} journées des Jeunes Chercheurs de la Société Française des Isotopes Stables (SFIS)*, 22-23 octobre 2009, Thiverval-Grignon, France.

× Posters

Poupin N., Huneau JF., Mariotti F., Bos C., Tomé D., Fouillet H. A new method for the multi-tissue estimation of protein turnover by compartmental analysis of the nitrogen isotope dynamics in rats fed a ¹⁵N-enriched diet. *Experimental Biology (EB)*, 9-13 avril 2011, Washington DC, USA. *FASEB J.* 25: 983.14.

Poupin N., H. Fouillet, F. Mariotti, D. Tome, J.-F. Huneau and C. Bos. Dietary protein quality influences the pattern of natural isotopic composition of nitrogen in rats. *Experimental Biology (EB)*, 24-28 avril 2010, Anaheim, CA, USA. *FASEB J.* 24: 740.6.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les protéines (**P**) corporelles, qui représentent une masse d'une dizaine de kg chez l'homme adulte en bonne santé, remplissent des fonctions variées (P de structure, P motrices, P impliquées dans la transduction du signal, P immunitaires, enzymes, hormones, transporteurs ...) qui sont vitales pour l'organisme. Les P corporelles sont synthétisées à partir d'un pool d'acides aminés (**AA**) de petite taille (environ 200g) et sont renouvelées de manière permanente par l'intermédiaire des processus de synthèse protéique (**SP**) et de dégradation protéique (**DP**), dont l'équilibre assure la conservation de la masse protéique. Les AA sont utilisés comme précurseurs pour les SP et pour former des composés spécifiques biologiquement actifs, mais sont également catabolisés en permanence, leur oxydation complète aboutissant à la formation d'urée et d'ammoniaque excrétés dans les urines et de CO₂ expiré. Le pool d'AA est en partie alimenté par la DP et la synthèse de novo d'AA non essentiels, mais l'apport d'AA exogènes, par l'alimentation, est indispensable pour compenser les pertes irréversibles d'AA et maintenir constant les pools d'AA et de P corporels (Figure 1). Les différents flux azotés (d'AA, de P, d'urée ou d'ammoniaque) qui permettent l'assimilation de l'azote alimentaire, le transfert des AA entre les tissus, le renouvellement des différentes P corporelles via les processus de SP et DP ainsi que l'élimination de l'azote, sont fortement intriqués et coordonnés, et leur régulation fine à l'échelle de l'organisme est indispensable au maintien de l'homéostasie azotée. Malgré les techniques diverses développées pour l'étude des différents flux métaboliques, l'organisation de ce réseau complexe de flux azotés inter- et intra-organes ainsi que sa régulation et les facteurs contribuant à sa dérégulation, sont encore mal connus.

En parallèle, des données croissantes et convergentes, principalement en écologie, montrent que les teneurs relatives des différents isotopes stables de l'azote (¹⁵N et ¹⁴N) observées à l'état naturel chez différents organismes et à différents niveaux (organisme, organes, tissus, pools métaboliques...) diffèrent selon les individus au sein d'une population et selon les tissus au sein d'un individu. Ces différences reflèteraient des caractéristiques spécifiques du métabolisme azoté et ses modulations en lien avec des modifications des conditions nutritionnelles et physio-pathologiques. L'objectif de cette thèse est de démontrer l'intérêt d'une approche combinée basée sur l'investigation des modulations des abondances isotopiques naturelles dans l'organisme et leur analyse par modélisation mathématique pour étudier le système complexe des AA et des P dans l'organisme et les flux azotés inter- et intra-organes.

Afin de situer le contexte scientifique de cette thèse, nous présentons dans le premier chapitre de ce manuscrit, un exposé des données de la littérature en deux parties. La première partie dresse un état des lieux des connaissances actuelles concernant les flux azotés inter- et intra-organes en conditions normales et perturbées, en abordant des principales approches qui ont permis de les obtenir, leurs limites et intérêts. Dans la deuxième partie, nous avons essayé de mettre en évidence les relations entre les abondances isotopiques naturelles et le métabolisme azoté, sur la base de données de la littérature principalement issues d'études en écologie ou éco-physiologie.

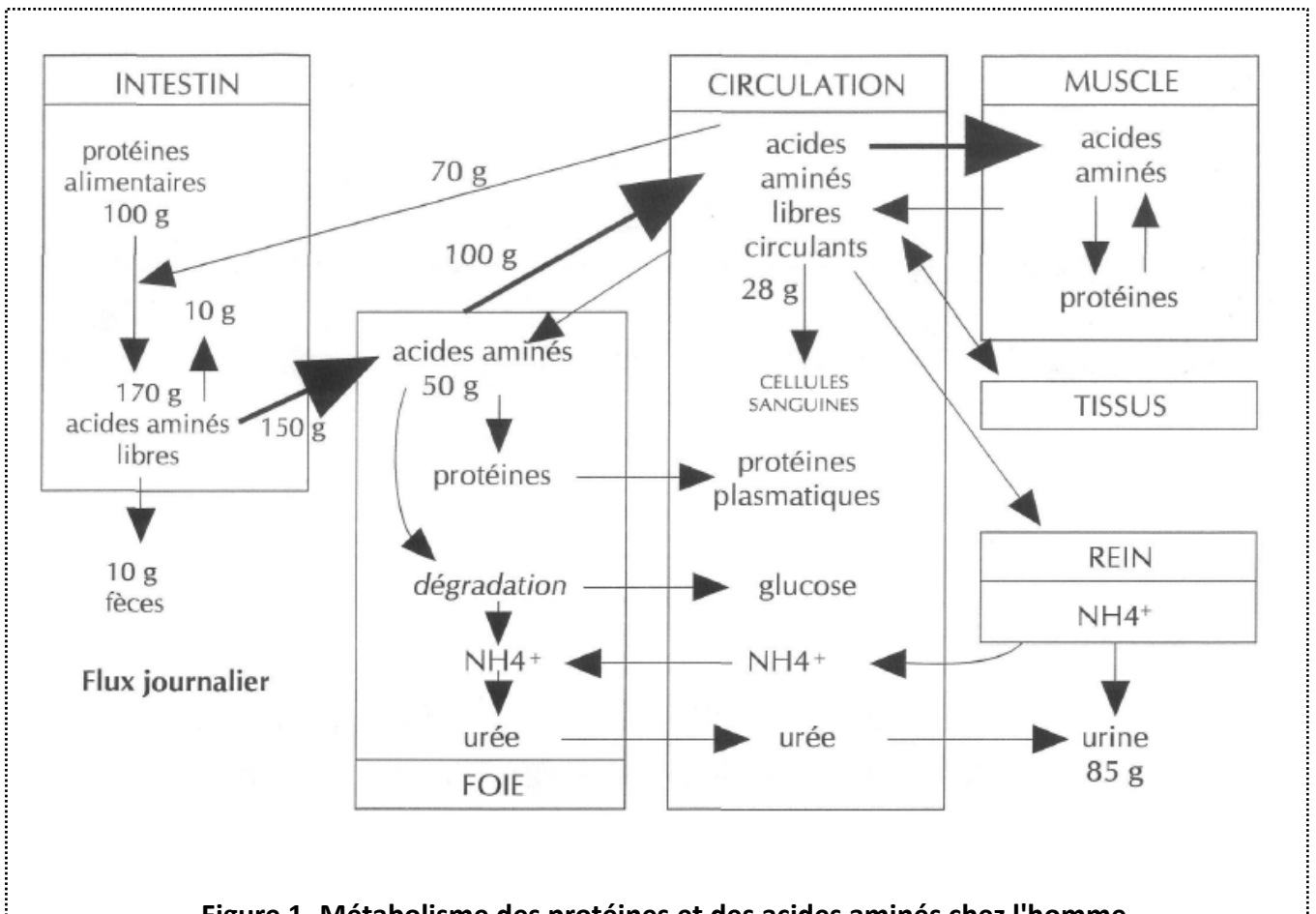


Figure 1. Métabolisme des protéines et des acides aminés chez l'homme.

Les acides aminés sont absorbés dans l'intestin et captés par le foie. Ils sont alors utilisés pour les synthèses protéiques, dégradés ou redistribués dans l'organisme et captés par les tissus.

D'après Tomé (1995)

L'objectif de ce chapitre introductif est de montrer pourquoi et comment l'analyse des abondances isotopiques naturelles des différents pools métaboliques constitue, pour l'étude du métabolisme azoté, un outil d'intérêt qui apporte des informations complémentaires et une vision plus intégrée par rapport aux approches existantes. Les deuxième et troisième chapitres sont consacrés respectivement à la présentation et à la discussion des travaux expérimentaux et de modélisation réalisés au cours de cette thèse.

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. LE SYSTÈME COMPLEXE DES FLUX D'AZOTE INTER- ET INTRA-ORGANES : COMMENT SONT-ILS ORGANISÉS, QUELLES SONT LEURS VALEURS ET LES MÉTHODES UTILISÉES POUR LES ÉTUDIER, ET COMMENT SONT-ILS COORDONNÉS ET MODULÉS ?

Le maintien d'un bilan azoté équilibré et l'homéostasie protéique sont assurés par le jeu complexe d'un enchaînement de flux de protéines (**P**), d'acides aminés (**AA**) et de différents composés azotés (urée, ammoniacque...) permettant l'assimilation de l'azote, son transfert entre les organes ou son orientation vers les voies d'élimination. La masse protéique de l'organisme est continuellement renouvelée via les flux de synthèse protéique (**SP**) et de dégradation protéique (**DP**) tissulaires, qui sont coordonnés et finement régulés à l'échelle de l'organisme afin de préserver l'intégrité des tissus maigres et les fonctions vitales qu'ils assurent. Les différents flux azotés assurent également des échanges continus entre les différentes zones de ce système métabolique fortement compartimenté et régionalisé, avec de nombreux transferts inter-organes de P circulantes, d'AA, d'urée, d'ammoniacque... Chez l'individu sain, la régulation de l'ensemble de ces flux, par des modulations de leur amplitude, leur orientation et leur distribution, est déterminante pour l'adaptation d'une part, à court terme, à la discontinuité de l'apport alimentaire, et d'autre part, à plus long terme, à des modifications des conditions nutritionnelles ou physio-pathologiques. Les différentes méthodes qui ont été développées pour estimer les flux azotés ont permis d'accumuler de nombreuses données concernant la SP mais les données concernant les autres flux (DP et échanges inter-organes) sont plus rares et parcellaires en raison de difficultés et limites méthodologiques (Fouillet *et al.* 2002a; Tessari & Garibotto 2000). On méconnaît ainsi encore largement le fonctionnement intégré et coordonné de l'ensemble des flux azotés dans l'organisme, comment ce système complexe est régulé pour assurer l'homéostasie protéique en conditions normales et comment il se dérégule lors de dérives vers des situations pathologiques.

I. Diversité, organisation et coordination des flux métaboliques azotés et méthodes d'investigation

Le métabolisme azoté est un système fortement structuré et compartimenté qui met en jeu un ensemble de flux azotés très divers de par leur nature (P, AA libres, urée ...), leur origine (alimentaire ou endogène), leur rôle (simple transport ou réaction de SP, DP, transamination ...), leur ampleur ... Ces flux azotés sont globalement organisés en plusieurs sous-systèmes connectés et coordonnés afin d'assurer : l'assimilation de l'N exogène et sa mise à disposition pour le reste de l'organisme au niveau du tractus gastro-intestinal (**TGI**) ; le transfert de l'N alimentaire et endogène, principalement sous forme d'AA, entre les tissus ; son utilisation anabolique dans chaque tissu (flux de synthèse et dégradation protéiques) ; et enfin son élimination à travers différentes voies (urinaire, fécale, dermique ...).

L'équilibre entre les flux azotés entrant (apports alimentaires) et sortant (pertes azotées) permet le maintien d'un bilan azoté global nul. En raison de la diversité des flux métaboliques, les méthodes qui ont permis de les identifier et quantifier sont également très diverses, chaque technique étant souvent dédiée à l'étude d'un type de flux particulier. Dans cette partie, nous détaillerons les principaux flux impliqués dans le métabolisme azoté, en rendant compte de leur organisation spatiale. Nous rapporterons également les données disponibles concernant la valeur de ces flux en mettant en avant la diversité des méthodes ayant permis de les obtenir.

I.1. Assimilation de l'azote par le sous-système absorptif du tractus gastro-intestinal

I.1.i. Organisation et nature des flux dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal

Le TGI assure l'assimilation de l'azote alimentaire et sa mise à disposition pour le reste de l'organisme. Il est alimenté de manière continue par différentes sécrétions endogènes (P et urée), et de manière transitoire par des protéines et AA alimentaires. On peut distinguer, dans le TGI, trois compartiments majeurs (l'estomac, l'intestin grêle et l'ensemble côlon et caecum) qui ont chacun un rôle différent dans la mise à disposition de l'azote alimentaire et dans la régulation des flux d'échanges d'azote alimentaire et endogène avec le reste de l'organisme.

Transit de l'azote alimentaire dans l'estomac : Digestion et vidange gastrique

L'estomac assure la première étape de digestion des P, qui y sont partiellement dégradées sous l'action de l'acidité et des pepsines. Cette étape conduit à la formation de polypeptides, d'oligopeptides et d'AA libres, qui sont ensuite vidangés dans l'intestin grêle. La vitesse avec laquelle ces composés azotés sont évacués de l'estomac vers la lumière intestinale (c.-à-d. la vitesse de vidange gastrique) joue un rôle déterminant dans les cinétiques des phénomènes digestifs en aval et particulièrement dans la modulation des cinétiques d'absorption et de mise à disposition des AA alimentaires (Gaudichon *et al.* 1994). La vitesse de vidange gastrique est modulée par la quantité et la nature des apports alimentaires : elle est en particulier ralentie pour des apports élevés en énergie (Jian *et al.* 1986); (Fouillet *et al.* 2001); (Mariotti *et al.* 2000) ou P (Peraino *et al.* 1959).

Flux d'azote dans l'intestin grêle

La phase finale de la digestion des P alimentaires a lieu dans la lumière de l'intestin sous l'action d'abord des enzymes pancréatiques puis des peptidases de la bordure en brosse des entérocytes. Cette étape aboutit à la formation de tripeptides, de dipeptides et d'AA libres qui sont progressivement absorbés par la muqueuse intestinale (Erickson & Kim 1990).

Plusieurs types de transfert d'azote ont lieu au niveau de l'intestin grêle : des P endogènes sont sécrétées vers la lumière intestinale, l'azote alimentaire et endogène luminal est absorbé par la muqueuse intestinale, et l'azote non absorbé transite le long de l'intestin vers le côlon (Figure 2).

- Les sécrétions de P endogènes dans la lumière intestinale sont majoritairement issues du foie et du pancréas exocrine (sécrétion bilio-pancréatique) et de l'épithélium intestinal (mucines produites par les cellules caliciformes, protéines présentes dans les cellules épithéliales expulsées des villosités du fait du renouvellement tissulaire). Des P plasmatiques et des composés non protéiques tels que l'urée sont

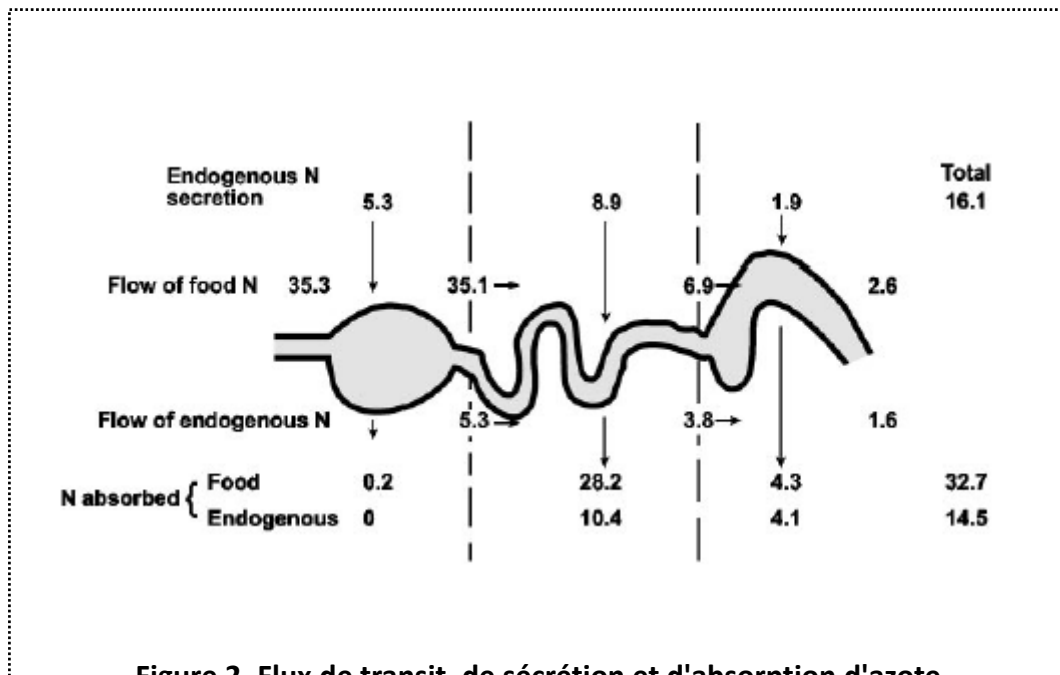


Figure 2. Flux de transit, de sécrétion et d'absorption d'azote alimentaire et endogène dans le tractus gastro-intestinal.

Les valeurs rapportées (en g/j) ont été mesurées sur des porcs de 30kg.

D'après Fuller & Reeds (1998)

également sécrétés mais en plus faible quantité. Les sécrétions pancréatiques sont particulièrement modulées par les conditions nutritionnelles, contrairement aux sécrétions biliaires qui y sont peu sensibles (Buraczewska 1979).

- Les P endogènes et alimentaires présentes dans la lumière intestinale subissent les phénomènes de digestion et d'absorption de manière simultanée. L'absorption des AA et di/tripeptides issus de la digestion se fait par diffusion facilitée impliquant des échangeurs d'acides aminés ou des transporteurs sodium ou proton-dépendants) (Broer 2008; Daniel 2004). La cinétique de mise à disposition des AA alimentaires varie selon la nature des P ingérées et ces différences sont susceptibles d'influencer le devenir métabolique protéique postprandial (Boirie *et al.* 1997a; Dangin *et al.* 2001).
- L'N qui n'a pas été (ré)-absorbé (N alimentaire ingéré et N endogène sécrété) est transféré de la lumière de l'intestin grêle vers le caecum. L'importance des pertes iléales d'azote alimentaire dépend principalement de la digestibilité des P alimentaires ingérées.

Transferts d'azote dans la partie terminale de l'intestin (caecum et côlon)

L'importance du caecum dans le TGI est très différente selon les espèces (par ex. développé chez les rongeurs mais peu chez l'homme). Les P alimentaires ou endogènes non digérées dans l'intestin sont hydrolysées dans la lumière caeco-colique sous l'action des bactéries, qui y sont présentes en quantité importante. Les flux de sécrétion et d'absorption d'azote dans cette partie terminale du TGI sont quantitativement beaucoup moins importants que dans l'intestin grêle mais leur ampleur et leur nature ne sont pas clairement définies.

L'azote endogène sécrété dans la lumière caeco-colique est essentiellement sous forme d'urée. L'urée diffuse librement depuis la circulation sanguine dans la lumière du TGI où elle est hydrolysée en ammoniacque par les bactéries (Figure 3). Le caecum et le côlon étant beaucoup plus riches en bactéries que le reste de l'intestin, l'hydrolyse de l'urée se fait vraisemblablement essentiellement dans cette partie du TGI (Moran & Jackson 1990; Wrong & Vince 1984). Certaines études suggèrent que, chez l'homme, l'hydrolyse de l'urée par les bactéries se produirait majoritairement au niveau mucosal ou juxta-mucosal plutôt que luminal, en raison d'une faible perméabilité à l'urée de la muqueuse colique (Wolpert *et al.* 1971). L'ammoniacque issu de l'hydrolyse de l'urée peut être utilisé par les bactéries intestinales pour assurer leur propre SP (Metges *et al.* 1999a) ou être réabsorbé, son excrétion fécale étant très réduite (Wrong & Vince 1984).

Les AA, issus de l'hydrolyse des P alimentaires ou provenant de l'iléon, et l'ammoniacque, issu de l'hydrolyse de l'urée, sont soit utilisés par le microbiote intestinal pour ses propres besoins métaboliques, c.-à-d. ses synthèses d'AA et de P et son métabolisme énergétique (Metges *et al.* 1999a), soit réabsorbés (Jackson *et al.* 1984; Millward *et al.* 2000). L'azote absorbé au niveau colique est ainsi constitué d'ammoniacque (Younes *et al.* 1996), mais également vraisemblablement d'AA d'origine alimentaire, endogène, ou bactérienne (Metges *et al.* 1999b; Torrallardona *et al.* 1996). Il est généralement admis que l'absorption d'AA dans le côlon est faible mais son importance est encore très controversée (Blachier *et al.* 2007; Fuller & Reeds 1998). Si l'absorption d'AA d'origine microbienne

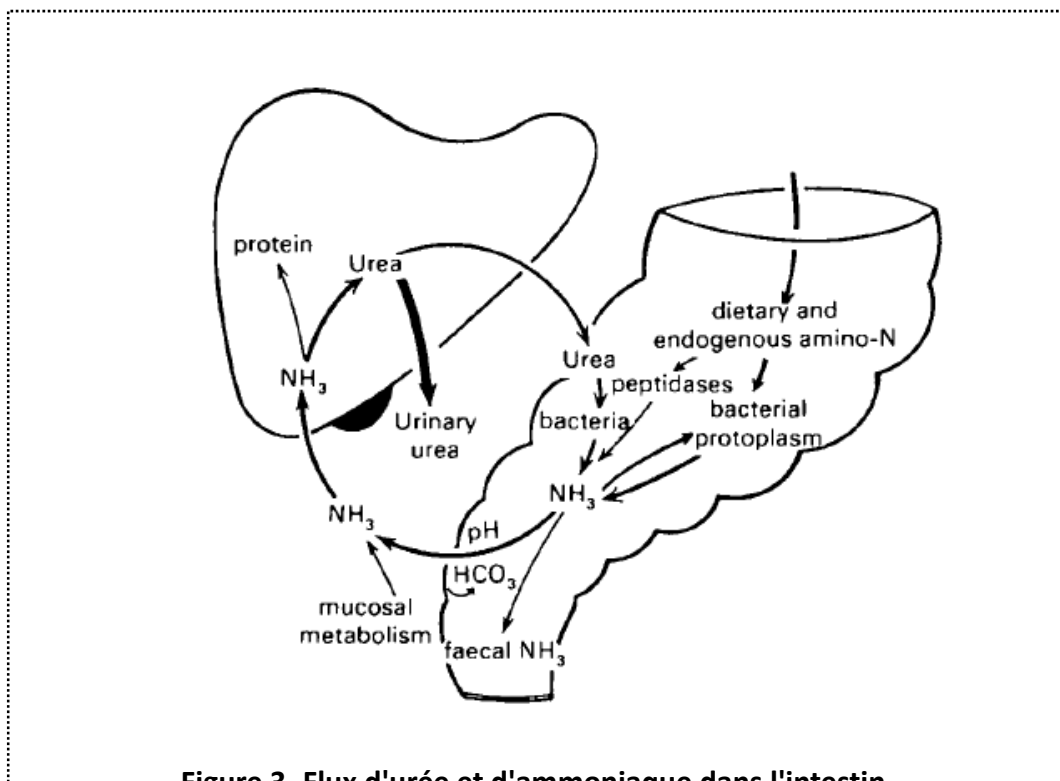


Figure 3. Flux d'urée et d'ammoniaque dans l'intestin.

D'après Wrong & Vince (1984)

depuis le TGI a été mise en évidence (Metges 2000; Torrallardona *et al.* 1996; Torrallardona *et al.* 2003b; Torrallardona *et al.* 2003a), la localisation de cette absorption entre intestin grêle et/ou gros intestin reste incertaine (Torrallardona *et al.* 2003b; Torrallardona *et al.* 2003a). L'absorption d'AA indispensables (AAI) synthétisés de novo par les bactéries pourrait participer au maintien du bilan azoté de l'organisme et contribuer à satisfaire ses besoins en AAI (Fuller & Garlick 1994). Il a ainsi été montré que la lysine et la thréonine d'origine microbienne contribueraient au pool d'AA plasmatiques à hauteur de 5-20% (Metges *et al.* 1999a; Metges *et al.* 1999b), mais la contribution des AAI produits par la flore microbienne à l'homéostasie des AA corporels est difficile à quantifier et reste largement débattue (Blachier *et al.* 2007; Tome & Bos 2007).

I.1.ii. Quantification des flux gastro-intestinaux par des méthodes diverses et spécifiques

Les flux d'azote à travers le TGI sont difficiles à quantifier car, d'une part, ils sont fortement dépendants de l'apport P alimentaire et variables dans le temps par rapport au moment de la prise alimentaire, et d'autre part, ils impliquent des composés azotés de nature (P, AA, urée) et d'origine (alimentaire ou endogène) variées. Par conséquent les méthodes développées pour estimer ces flux sont très diverses.

Les flux de transit le long du TGI et d'un compartiment à l'autre sont généralement déterminés par le suivi de marqueurs non-digestibles grâce à la pose de canules ou de sondes intestinales (Bos *et al.* 2007; Deglaire *et al.* 2009; Maes *et al.* 1995).

Les techniques de bilan artério-veineux (entre l'artère hépatique et la veine porte) permettent d'estimer les flux d'absorption d'AA totaux (Darcy-Vrillon *et al.* 1991; Rerat *et al.* 1992). Cette technique a été largement appliquée chez le porc et a permis d'estimer que l'absorption d'AA totaux représentait entre 75 à 140% de l'apport azoté selon la source protéique (Rerat *et al.* 1992; Souffrant *et al.* 1993; Krawielitzki *et al.* 1990) et avait lieu pour 82 à 97% depuis l'intestin grêle. Cette mesure ne reflète cependant que l'absorption apparente puisque certains AA luminaux captés par l'épithélium peuvent être métabolisés par la muqueuse intestinale.

Les méthodes les plus couramment utilisées pour mesurer les flux de sécrétions endogènes totales et distinguer les flux d'absorption d'N endogène et alimentaire en phase nourrie sont des méthodes isotopiques, qui consistent à marquer soit les P endogènes (Hess *et al.* 1998) soit les P alimentaires (Bos *et al.* 2005a; Gaudichon *et al.* 1994; Mahe *et al.* 1994) et à déterminer la dilution du traceur dans les contenus gastro-intestinaux. Le recueil des contenus digestifs est réalisé soit *in vivo* par la pose de canules au niveau de la valve cécale (Leterme *et al.* 1996) ou directement par prélèvement après sacrifice chez l'animal (Hess *et al.* 1998), soit à l'aide de sondes positionnées au niveau terminal de l'iléon chez l'homme (Mahe *et al.* 1992). Malgré leurs limites (problème de l'identification du pool précurseur des synthèses de P endogènes sécrétées ou non prise en compte du recyclage du traceur) et leur caractère fortement invasif, l'application de ces méthodes, principalement chez le porc, mais également chez l'homme, a permis d'estimer l'amplitude des flux d'absorption de l'azote alimentaire (qui correspondent à la digestibilité de l'azote alimentaire) en phase post-prandiale. Les données

quantitatives rapportées pour les flux de sécrétions endogènes, également obtenues par ces techniques, sont très variables selon les études et les espèces : elles représenteraient environ 50% de l'apport alimentaire chez l'homme (Mahe *et al.* 1994; Munro 1964), un peu moins de 50% chez le porc (Souffrant *et al.* 1993; Krawielitzki *et al.* 1990) et seraient équivalentes à l'apport alimentaire chez le rat (Twombly & Meyer 1961).

Les sécrétions issues des cellules exocrines (sécrétions biliaires et pancréatiques) peuvent être quantifiées spécifiquement par l'utilisation de canules placées dans les canaux biliaires et pancréatiques et dans le duodénum (Corring *et al.* 1990). Chez les porcs, elles représenteraient globalement 34% des sécrétions endogènes totales (Corring *et al.* 1990; Souffrant *et al.* 1993).

L'application combinée de ces techniques diverses chez le porc a permis d'obtenir un corpus de données relativement cohérentes, issues de plusieurs études différentes mais obtenues sur des animaux au même stade de développement (Tableau 1), mais très peu de données similaires sont disponibles chez l'homme et concernant les variations de ces flux selon les conditions nutritionnelles.

Par ailleurs, quelques modèles compartimentaux de la digestion protéique ont été développés chez le porc (Bastianelli *et al.* 1996; Rivest *et al.* 2000). Dans ces modèles, le TGI est représenté par un nombre plus ou moins important de compartiments. Ce sont des modèles cinétiques qui tiennent compte de la discontinuité des apports alimentaires. Ils permettent de reproduire les flux d'absorption et de sécrétions, mais également la vitesse de vidange gastrique, les taux de transit entre les différents segments, les digestibilités iléales et fécales et distinguent l'azote alimentaire de l'azote endogène. Le paramétrage de ces modèles est basé en grande partie sur des données de la littérature et implique un certain nombre d'approximations, mais leur intérêt est de permettre d'intégrer l'ensemble de ces données et de prédire l'effet de plusieurs facteurs nutritionnels, tels que la quantité de P ingérées, sur les flux azotés dans le TGI. Le modèle développé par Hanigan chez le ruminant permet également de prédire les flux de mise à disposition de l'azote depuis le TGI pour les tissus splanchniques (Hanigan *et al.* 2004).

En conclusion, le sous-système constitué du TGI joue un rôle déterminant dans la mise à disposition de l'azote alimentaire pour le reste de l'organisme. Les flux d'azote à travers ce sous-système sont complexes et difficiles à quantifier car ils interviennent à différents niveaux et sont de nature et d'origine variées. L'ensemble de ces flux assure une forte interconnexion de ce sous-système avec le reste de l'organisme.

I.2. Élimination de l'azote par différentes voies

Chez un individu adulte et en condition physiologique stable le bilan azoté est nul, c'est-à-dire que les pertes azotées sont égales aux apports azotés alimentaires.

I.2.i. Répartition des différentes pertes azotées

L'azote est principalement éliminé par voie urinaire (sous la forme d'urée et dans une moindre mesure d'ammoniaque), par voie fécale (majoritairement sous la forme d'AA et de P), ou par

Tableau 1. Flux d'azote dans le tractus gastro-intestinal

	Ensemble du TGI	Intestin grêle	Colon & Cecum		
	mgN /j /100g PC (% N ingéré)			Espèce	références
sécrétions endogènes totales	21 – 54 (45%)	21 – 47 (40 - 45%)	0 – 6 (0 - 5%)	Porc	Krawielitzki <i>et al.</i> , 1990 ^(a) ; Souffrant <i>et al.</i> , 1993 ^(a)
	43 - 71 (47 - 96%)	35 (39%)	8 (9%)	Rat	Twombly & Meyer, 1961 ^(c) ; Deglaire <i>et al.</i> , 2008 ^(b)
sécrétions spécifiques (pancréatiques et biliaires)	8	8		Porc	Corring <i>et al.</i> , 1990 ^(d)
Flux d'absorption d'azote total	66 – 157 (135 - 140%)	64 – 130 (111 - 136%)	2 – 28 (4 - 24%)	Porc	Krawielitzki <i>et al.</i> , 1990 ^(e) ; Souffrant <i>et al.</i> , 1993 ^(e)
Flux absorption d'azote alimentaire ^{a,b} (digestibilité)	47 – 109 (93-100%)	47 – 95 (75 -100%)*	0 – 14 (0 - 12%)	Porc	Krawielitzki <i>et al.</i> , 1990 ^(a) ; Souffrant <i>et al.</i> , 1993 ^(a) ; Gaudichon <i>et al.</i> , 1994 ^(b) ; Rerat <i>et al.</i> , 1992 ^(a) ; Bos <i>et al.</i> , 2005b ^(b) ; Deglaire <i>et al.</i> , 2009 ^(b)
	96,5%*	95,5%*		Homme	Bos <i>et al.</i> , 1999 ^(b)
		95,2%*		Rat	Boutry <i>et al.</i> , 2011 ^(b)
Flux absorption d'azote endogène	19 – 48 (40%)	17 – 35 (29 - 36%)	2 – 14 (4 - 12%)	Porc	Krawielitzki <i>et al.</i> , 1990 ^(a) ; Souffrant <i>et al.</i> , 1993 ^(a)

Les valeurs des flux rapportées ont été obtenues par différentes méthodes : ^(a) par dilution isotopique avec marquage des protéines endogènes, ^(b) par dilution isotopique avec marquage des protéines alimentaires, ^(c) sous régime protéoprive, ^(d) par fistules implantées dans les canaux pancréatiques et biliaires, ^(e) par la mesure des différences de concentrations artério-veineuses. *Données obtenues pour des régimes à base de caséine ou protéines de lait. TGI, Tractus Gastro-Intestinal.

desquamation ou perte de phanères (sous forme de P). Les pertes urinaires représentent la majeure partie des pertes azotées totales, soit 70 à 75% des pertes totales chez l'homme (FAO/WHO 1991) et environ 85 à 90% des pertes totales chez le rat (Hayase *et al.* 1980; Yamamoto *et al.* 1985; Younes *et al.* 1996; Younes *et al.* 1995; Younes *et al.* 1998), (Tableau 2). L'N excrété dans les urines est essentiellement sous forme d'urée (75 à 95% chez le rat, (Beliveau Carey *et al.* 1993; Herrera *et al.* 1969; Phromphetcharat *et al.* 1981; Yamamoto *et al.* 1985)), l'ammoniaque éliminé dans les urines (majoritairement produit par le rein à partir de la glutamine) ne représentant qu'environ 5% de l'N urinaire (Beliveau Carey *et al.* 1993; Herrera *et al.* 1969; Phromphetcharat *et al.* 1981; Yamamoto *et al.* 1985). Les pertes fécales, qui représentent seulement 10 à 25% des pertes azotées totales, sont constituées essentiellement d'azote provenant du métabolisme microbien, car la majorité de l'azote alimentaire ou endogène transitant dans le TGI est absorbé avant l'iléon et seule une petite partie atteint le côlon. Les pertes azotées dites « diverses », c'est-à-dire principalement les pertes liées à la desquamation, la sudation, les phanères et autres pertes variées, ont été estimées à 1 à 5% des pertes azotées totales chez l'homme (Calloway *et al.* 1971; Rand *et al.* 2003).

Les quantités d'azote éliminées par ces différentes voies sont modulées en réponse à divers facteurs. Les quantités d'urée excrétée dans les urines varient essentiellement en fonction de la quantité et de la qualité de l'apport azoté (Hayase *et al.* 1980). Les pertes azotées fécales semblent moins sensibles aux quantités (Younes *et al.* 1996) et à la nature des P ingérées (Mariotti *et al.* 2001b), mais peuvent varier sous l'effet d'autres facteurs alimentaires tels que la présence de fibres dans le régime (Mariotti *et al.* 2001a; Younes *et al.* 1996; Younes *et al.* 1998). A l'inverse, les autres pertes azotées sont indépendantes des conditions nutritionnelles mais leur ampleur peut être modulée par le climat, dans le cas des pertes par desquamation, ou par l'équilibre acido-basique, dans le cas de l'élimination sous forme d'ammoniaque.

1.2.ii. Rôle particulier du recyclage entéro-hépatique de l'urée dans la modulation de l'excrétion urinaire et le maintien du bilan azoté

Organisation des flux d'urée et recyclage entéro-hépatique de l'N (Figure 4)

L'excrétion d'urée dans les urines étant la voie d'élimination azotée la plus importante et la plus sensible aux apports azotés, la régulation de la production et de l'élimination de l'urée est un processus déterminant dans le maintien du bilan azoté.

L'urée, produit terminal du catabolisme des AA, est majoritairement synthétisée dans le foie et est éliminée dans les urines. Une partie de l'urée produite n'est pas excrétée directement, mais transférée vers le TGI, où elle est hydrolysée par l'action de l'uréase des bactéries (El-Khoury *et al.* 1996; El-Khoury *et al.* 1994; Forslund *et al.* 1998; Jackson *et al.* 1990; Jackson *et al.* 1984; Long *et al.* 1978). L'ammoniaque ainsi produit peut être utilisé par les bactéries intestinales pour leur propre synthèse de P ou AA (Metges *et al.* 1999a) ou être réabsorbé (Jackson *et al.* 1984; Millward *et al.* 2000). Une petite partie de l'ammoniaque réabsorbé au niveau intestinal et colique est utilisé par les cellules épithéliales pour la synthèse de citrulline et de glutamine qui sont exportées vers le foie (Eklou-Lawson *et al.* 2009).

Tableau 2. Cinétiques de l'urée mesurées dans différentes études chez l'homme pour des niveaux d'apports protéiques variables.

Niveau d'apport	Source protéique	UP / I ¹ Urée produite (% N ingéré)	UH / UP ¹ Urée hydrolysée (%urée produite)	R / S ¹ Urée recyclée ² (%urée hydrolysée)	références
Nul			6 - 7 %	73%	Young et al., 2000; Long al., 1978
Faible 0,3 à 0,45 g/kg/j	P. d'œuf	190%	25%	nd	Young al., 2000
	Mixtes ³	120 - 138%	21 - 23%	15%	Meakins al., 1998; Lee al., 2000
Adéquat 0,8 à 1,3 g/kg/j	Mixtes ³	71 - 126%	22 - 46%	23 - 67%	Child al., 1997; Jackson al., 1993; Long al., 1978; Lee al., 2000;
	P. d'œuf	96 - 98%	20%	nd	El-Khoury al., 1994; El-Khoury al., 1996
	P. de lait	110 - 118%	24 - 45%	nd	Forslund al., 1998 ; Fouillet al., 2008
Elevé 2,5 g/kg/j	P. de lait	98 - 116%	14 - 22%	nd	Forslund al., 1998 ; Fouillet al., 2008

¹ d'après les notations présentées dans la Figure 4; ² proportion d'ammoniaque issu de l'hydrolyse qui est réutilisé pour produire de l'urée. ³ les sujets consomment des repas usuels. P, protéines; nd, non déterminé.

Le reste est transféré, via la veine porte, vers le foie où il est soit de nouveau transformé en urée (Long *et al.* 1978; Jackson *et al.* 1984), soit utilisé pour la synthèse d'AA non indispensables. L'hydrolyse d'urée dans le côlon, sa réabsorption sous forme d'ammoniaque et sa réutilisation dans le foie pour la production d'urée constituent un cycle futile de l'azote. À l'inverse, l'utilisation d'une partie de l'azote réabsorbé pour la synthèse d'AA au niveau épithélial et hépatique participe au recyclage de l'azote et potentiellement à une économie d'azote en fournissant une source non spécifique d'azote pour l'organisme.

Quantification de l'importance des flux d'urée

La production d'urée est généralement estimée par des approches isotopiques utilisant de l'urée doublement marquée. Les deux méthodes les plus couramment utilisées consistent à mesurer, à l'équilibre isotopique, les teneurs en urée ^{15}N - ^{15}N : soit dans le pool plasmatique, après l'administration d'urée doublement marquée par une perfusion intraveineuse continue sur 24h, précédée d'une dose amorce (El-Khoury *et al.* 1994; Young *et al.* 2000), soit dans le pool d'excrétion urinaire après l'administration d'urée par voie orale sous la forme d'une large dose (Jackson, 1993 ; Jackson, 1984) ou d'une dose amorce suivie de doses répétées (Meakins *et al.* 1998)(Annexe 1). Selon cette dernière méthode, développée par Jackson, la quantité d'urée recyclée (c.-à-d. la proportion d' NH_4 issu de l'hydrolyse de l'urée qui est réutilisé pour la synthèse d'urée) peut également être estimée par la mesure de la teneur en urée ^{15}N - ^{14}N dans l'urine (Jackson *et al.* 1984). Par ailleurs, une approche couplant l'utilisation de P alimentaires marquées et l'analyse par modélisation compartimentale des cinétiques d'enrichissement isotopique mesurées dans l'urée plasmatique et l'urée urinaire a été développée afin de déterminer spécifiquement les cinétiques de l'urée à l'état non-stationnaire en phase postprandiale (Fouillet *et al.* 2008).

Les valeurs des flux d'urée obtenues chez l'homme selon ces différentes méthodes sont synthétisées dans le Tableau 2. Les estimations rapportées concernant la proportion d'urée hydrolysée sont globalement cohérentes : pour des apports azotés adéquats, en moyenne 20 à 30% de l'urée produite seraient transférés vers le côlon et hydrolysés (El-Khoury *et al.* 1996; El-Khoury *et al.* 1994; Jackson *et al.* 1993; Long *et al.* 1978). En revanche, concernant la proportion d'ammoniaque, issu de l'hydrolyse de l'urée, qui est utilisé pour reformer de l'urée ou disponible pour la synthèse d'AA, les estimations rapportées sont très variables selon les études : chez l'homme, 20 à 70% de l'ammoniaque absorbé seraient recyclés vers la formation d'urée (Jackson *et al.* 1993; Long *et al.* 1978). De même, les estimations des quantités d'urée produites sont très variables et s'échelonnent de 70 à 130 % de l'apport alimentaire (Child *et al.* 1997; El-Khoury *et al.* 1996; El-Khoury *et al.* 1994; Jackson *et al.* 1993; Lee *et al.* 2000; Long *et al.* 1978). Cette variabilité importante peut être liée à la forte variabilité inter-individuelle également observée sur les quantités d'urée produite.

Rôle du recyclage entéro-hépatique dans le maintien du bilan azoté

Si les cinétiques de production, d'excrétion et d'hydrolyse de l'urée ont largement été étudiées chez l'homme pour des apports en P variables (Forslund *et al.* 1998; Young *et al.* 2000; McClelland &

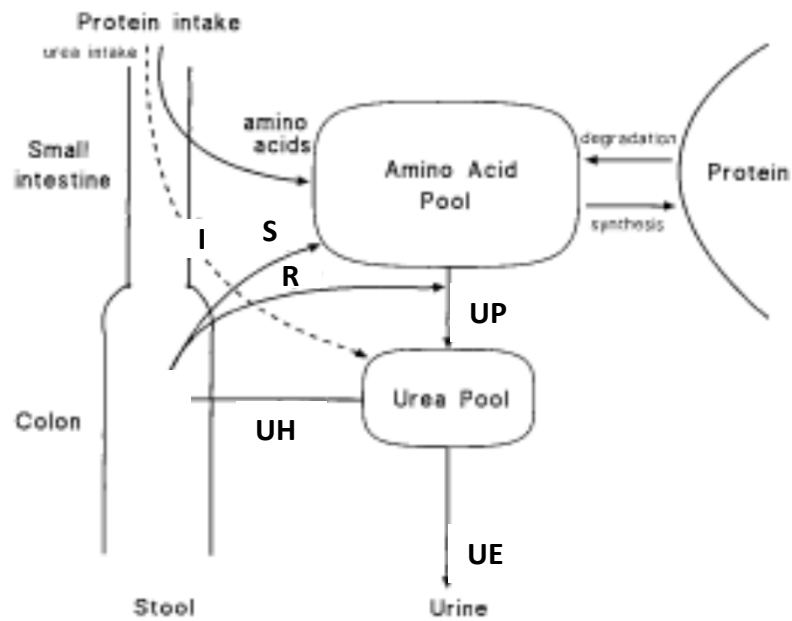


Figure 4. Représentation schématique des flux d'urée dans l'organisme

Le pool d'urée corporelle (urea pool) est alimenté par 2 sources : la production endogène d'urée par le foie (UP) et l'urée apportée par l'alimentation (I). UE représente le flux d'excrétion urinaire de l'urée et UH la part de l'urée qui est transférée vers le colon et hydrolysée. Une partie de l'ammoniaque issu de l'hydrolyse de l'urée dans le colon est réutilisée pour produire de l'urée (R), le reste (S) est utilisé dans des voies anaboliques (synthèse d'AA notamment).

D'après Meakins et al. (1998)

Jackson 1996; Langran *et al.* 1992; Forslund *et al.* 1999; Jackson 1999; Lee *et al.* 2000; Fouillet *et al.* 2008), les résultats obtenus sont souvent divergents, si bien que les modulations de ces cinétiques en fonction de l'apport azoté sont encore mal établies malgré leur rôle vraisemblablement important dans le maintien du bilan N. En particulier, la question de savoir si la régulation du bilan azoté global se fait par une modification de la production d'urée en réponse à la modification de l'apport azoté ou par une adaptation de la quantité d'urée hydrolysée est encore très controversée. D'un côté, le groupe de Young suggère que le contrôle du bilan azoté en réponse à une modification de l'apport en P se ferait grâce à la modulation de la production d'urée (Young *et al.* 2000). L'analyse des résultats de plusieurs études menées par ce groupe met en effet en évidence une relation linéaire positive entre l'apport azoté et la production d'urée pour des apports azotés variant de 0 à 400mg N/kg/j (Young *et al.* 2000; El-Khoury *et al.* 1994; Forslund *et al.* 1998), alors que la proportion d'urée hydrolysée ne varie pas de manière systématique avec l'apport azoté (Figure 5). A l'inverse, le groupe de Jackson défend la théorie selon laquelle l'hydrolyse de l'urée, et non la production d'urée, serait le principal moyen de régulation du bilan azoté (Jackson 1999). En effet, d'après les résultats obtenus par ce groupe, la quantité d'urée produite resterait constante malgré une diminution de l'apport en P de 70g/d à 30g/d (un niveau qui reste néanmoins adéquat) alors que la proportion d'urée hydrolysée augmenterait (Langran *et al.* 1992; Meakins *et al.* 1998). Cependant ces conclusions concernent une gamme d'apports azotés plus restreinte qui correspondent à des apports usuels pour lesquels le maintien du bilan azoté est assuré (Jackson 1999). Il a par ailleurs été montré que la production d'urée était fortement diminuée lorsque l'apport azoté était très faible et ne permettait pas le maintien du bilan azoté (Meakins & Jackson 1996; Danielsen & Jackson 1992). Au vu de l'ensemble de ces résultats, il est donc probable que la production d'urée soit relativement stable sur une gamme d'apports azotés variables mais permettant de satisfaire le besoin azoté, mais par contre qu'elle soit diminuée pour des apports très faibles ou des régimes protéoprives et à l'inverse augmentée dans le cas de régimes fortement hyperprotéiques. De plus, en conditions de faible apport azoté, la relation entre l'apport azoté et la production d'urée dépend vraisemblablement de l'importance de la mobilisation des P endogènes, via leur catabolisme, pour maintenir le bilan azoté (Faber *et al.* 2003). La mise à disposition d'azote non spécifique issu de l'hydrolyse de l'urée pour la synthèse d'AA pourrait contribuer au maintien du bilan azoté (Metges *et al.* 1999a; Jackson 1995); des données ont montré que le recyclage entéro-hépatique de l'urée pouvait permettre d'épargner de l'azote dans certaines conditions nutritionnelles ou physiopathologiques (apports en P limités, renutrition, pathologies...) (Jackson 1998; Badaloo *et al.* 1999), où les quantités d'urée hydrolysée seraient augmentées jusqu'à 50-60% de l'urée produite alors que la proportion d'ammoniaque absorbé et reconduisant à la formation d'urée ne serait plus que de 10-20%.

Ainsi, bien que l'élimination de l'azote par voie urinaire semble être le principal paramètre modulable pour maintenir le bilan azoté en réponse à des variations quantitatives de l'apport azoté, les données actuellement disponibles ne permettent pas d'établir clairement la façon dont l'excrétion d'urée est régulée (via une modification de la production d'urée et/ou de la proportion d'urée hydrolysée et recyclée).

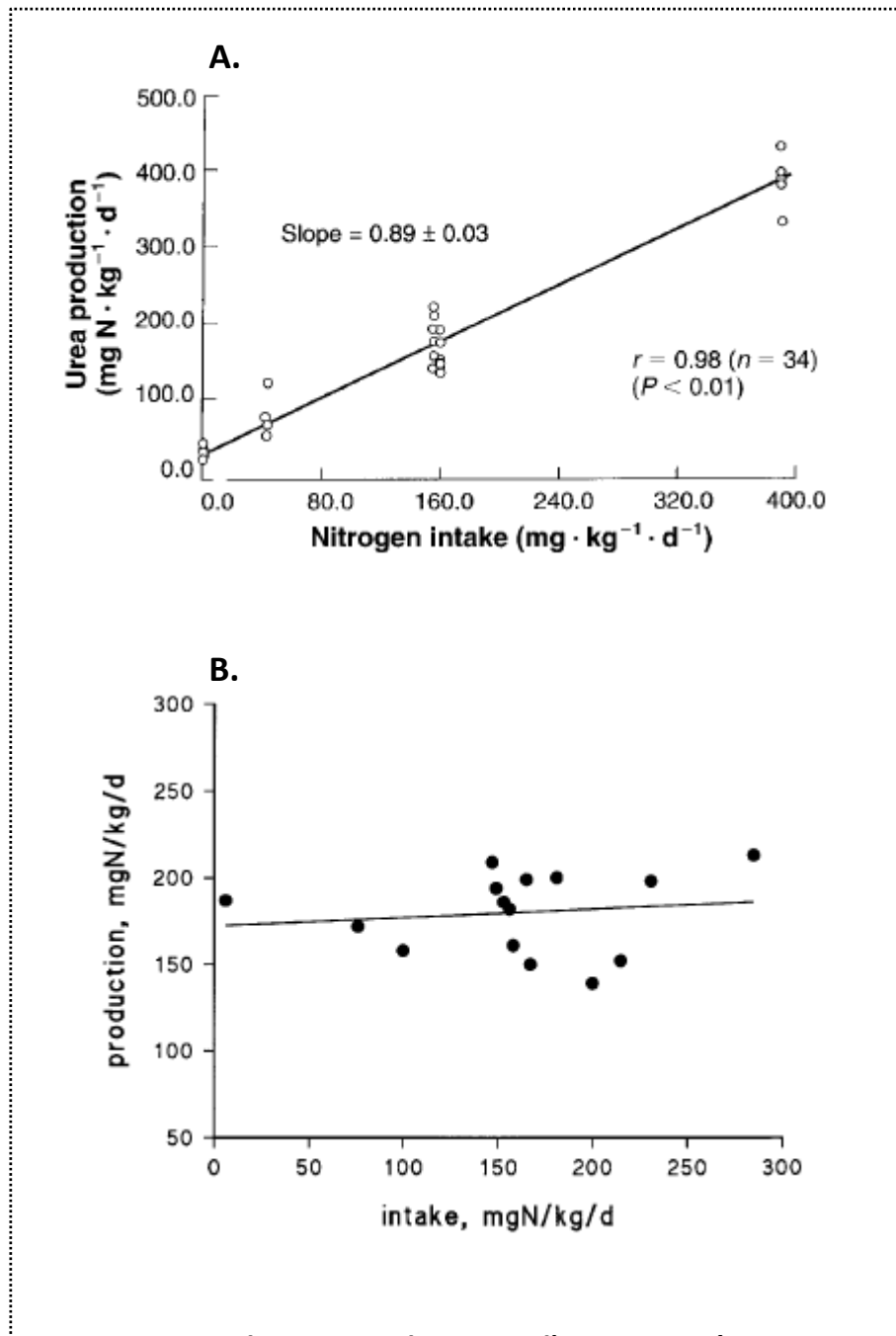


Figure 5. Relation entre le niveau d'apport protéique et la production d'urée chez l'homme adulte.

A. Données issues d'études réalisées par le groupe de Young (n = 4 études), avec des apports alimentaires en P de 0, 0,25, 1 et 2,5 g.kg.j⁻¹.

D'après Young et al. (2000).

B. Données issues d'études réalisées par le groupe de Jackson (n = 15 études).

D'après Jackson (1999).

→ La relation entre la production d'urée et le niveau d'apport protéique est controversée : selon les données, la production est soit linéairement corrélée à l'apport protéique (A), soit stable quel que soit le niveau d'apport protéique.

I.3. Transferts et échanges inter-organes d'AA

Les AA alimentaires, absorbés depuis la lumière intestinale, transitent d'abord par la zone splanchnique où ils se mêlent aux AA endogènes et sont en partie extraits. L'intestin et le foie modulent ainsi la libération des AA alimentaires vers les autres tissus. Les transferts d'AA (alimentaires et endogènes) entre tissus se font de manière coordonnée et régulée, chaque tissu prélevant ou libérant des AA avec des taux différents selon les conditions et les AA.

I.3.i. Étude des flux d'AA par des méthodes de bilan d'organe

Le bilan net d'AA totaux ou d'un AA particulier à travers un organe ou une région peut être quantifié par la mesure, par cathétérisme, des différences de concentrations artérielles et veineuses d'AA de part et d'autre de l'organe ou région considérés et du débit sanguin : $NB = (C_a - C_v) * BF$, où NB est le bilan net d'AA, C_a et C_v les concentrations artérielles et veineuses et BF le débit sanguin. Un bilan net positif indique un prélèvement d'AA supérieur à la libération (prélèvement net) tandis qu'un bilan net négatif indique une libération nette d'AA par l'organe (Bloomgarden *et al.* 1981; Barrett *et al.* 1986; Elia 1991; Elia *et al.* 1989; Capaldo *et al.* 1999). Pour les AA qui ne sont ni synthétisés de novo ni métabolisés dans le tissu étudié (tels que la phénylalanine dans le muscle), le bilan net représente également la différence entre SP et DP (soit un bilan net de synthèse ou de dégradation).

Cette technique a été principalement utilisée pour étudier les flux d'AA vers et depuis le muscle, qui sont approximés par les flux d'AA mesurés à travers un membre, considérant que la participation de la peau et des tissus cartilagineux aux flux d'AA est négligeable devant celle des tissus musculaires. De nombreuses études de bilan d'AA ont également été réalisées sur l'ensemble de la zone splanchnique (incluant le foie et les tissus drainés par la veine porte, c.-à-d. principalement l'intestin, le pancréas et la rate) par des mesures de différences de concentrations entre l'artère et la veine hépatique, et ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la zone splanchnique dans les échanges inter-organes d'AA. Des mesures spécifiques dans la veine porte permettent de distinguer le rôle spécifique du foie et de l'intestin dans le prélèvement et la libération d'AA. Globalement, l'application des techniques de bilan d'organes à différents tissus et sur différents AA a largement contribué à une meilleure compréhension de l'organisation des échanges inter-organes d'AA.

I.3.ii. Rôle carrefour de la zone splanchnique dans les flux d'échanges d'AA

L'intestin et le foie, en raison de leur interposition entre le site d'absorption de l'azote et la circulation systémique, jouent un rôle prépondérant dans le prélèvement et l'utilisation métabolique des AA alimentaires et leur libération vers la zone périphérique. Contrairement aux tissus périphériques, ces tissus splanchniques ont la spécificité d'avoir deux sources d'alimentation : l'intestin prélève des AA alimentaires ou endogènes (issus de la réabsorption de P endogènes sécrétées) depuis la lumière intestinale et des AA endogènes depuis la circulation systémique, alors que le foie prélève, dans la veine porte, certains AA libérés par l'intestin et est également alimenté en AA par la voie systémique. Une partie importante des AA alimentaires est extraite et séquestrée dans la zone splanchnique après l'ingestion d'un repas. Des données obtenues chez l'homme et l'animal indiquent qu'entre 30 et 50% des

AA ingérés seraient retenus par la zone splanchnique (Volpi *et al.* 1999; Biolo *et al.* 1992b; Stoll *et al.* 1997; Stoll *et al.* 1998a; Yu *et al.* 1990), mais ces valeurs d'extraction varient de manière importante selon les AA considérés (Biolo *et al.* 1992b; Matthews *et al.* 1993b; Matthews *et al.* 1993a; Hoerr *et al.* 1993; Hoerr *et al.* 1991). L'intestin dominerait l'utilisation splanchnique des AA alimentaires puisque 75 à 85% de l'extraction splanchnique des AA alimentaires seraient réalisés par l'intestin et seulement 15 à 25% par le foie (Stoll *et al.* 1998a). Les extractions intestinale et hépatique sont également qualitativement différentes : l'intestin prélève majoritairement le glutamate, la glutamine et l'aspartate, qu'il utilise comme sources principales d'énergie, alors que le foie, du fait de son activité de néoglucogénèse importante, prélève essentiellement des AA glucoformateurs (**AAG**), dont l'alanine qui est libérée en quantités importantes par l'intestin dans la veine porte.

Ainsi, l'intestin et le foie jouent un rôle prépondérant dans la modulation à la fois quantitative et qualitative des AA libérés vers la zone périphérique, le profil des AA dans la veine hépatique étant très différent du profil des AA ingérés.

I.3.iii. Cycles d'interaction entre tissus dans les échanges d'AA

Des travaux de cathétérisme multiple et simultané de la zone splanchnique et de plusieurs organes ont mis en évidence la complémentarité entre les zones splanchniques et périphériques dans les transferts d'AA ainsi que des coopérations particulières entre organes dans la production et l'utilisation de certains AA (Figure 6).

Les AA à chaîne latérale ramifiée (**AACR**) sont peu prélevés par la zone splanchnique (Bloomgarden *et al.* 1981) et sont donc davantage transférés vers la zone périphérique que les AAG ou les autres AAI (Capaldo *et al.* 1999; Brosnan 2003) : ils représentent plus de la moitié des AA relâchés vers la zone périphérique (Tessari & Garibotto 2000; Aoki *et al.* 1976; Barrett *et al.* 1986; Wahren *et al.* 1976), et ils sont essentiellement prélevés par le muscle et le cerveau.

Les échanges inter-organes de glutamine ont également été largement décrits, la glutamine étant l'AA libre le plus abondant, et vraisemblablement un acteur prépondérant du transfert d'azote entre les organes (Elia 1991). La glutamine est principalement synthétisée et libérée dans la circulation par le muscle mais également par le tissu adipeux, le poumon (Frayn *et al.* 1991) et potentiellement par la peau. Elle est essentiellement utilisée par l'intestin, pour lequel elle constitue une source majeure d'énergie, et dans une moindre mesure par le rein, dans lequel elle participe à l'ammoniagénèse. Le foie possède à la fois les enzymes pour dégrader et synthétiser la glutamine et peut par conséquent prélever la glutamine pour la synthèse d'urée ou libérer de la glutamine vers le rein selon les conditions nutritionnelles. Le transfert de glutamine entre le foie et le rein joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie acido-basique en favorisant l'élimination d'ammoniaque via l'ammoniagénèse au niveau rénal (Brosnan 2003). La libération nette de glutamine par le foie serait augmentée lors de l'administration de régimes à faible teneur en P, la glutamine libérée étant principalement utilisée par l'intestin pour satisfaire ses besoins énergétiques (Remesy *et al.* 1997).

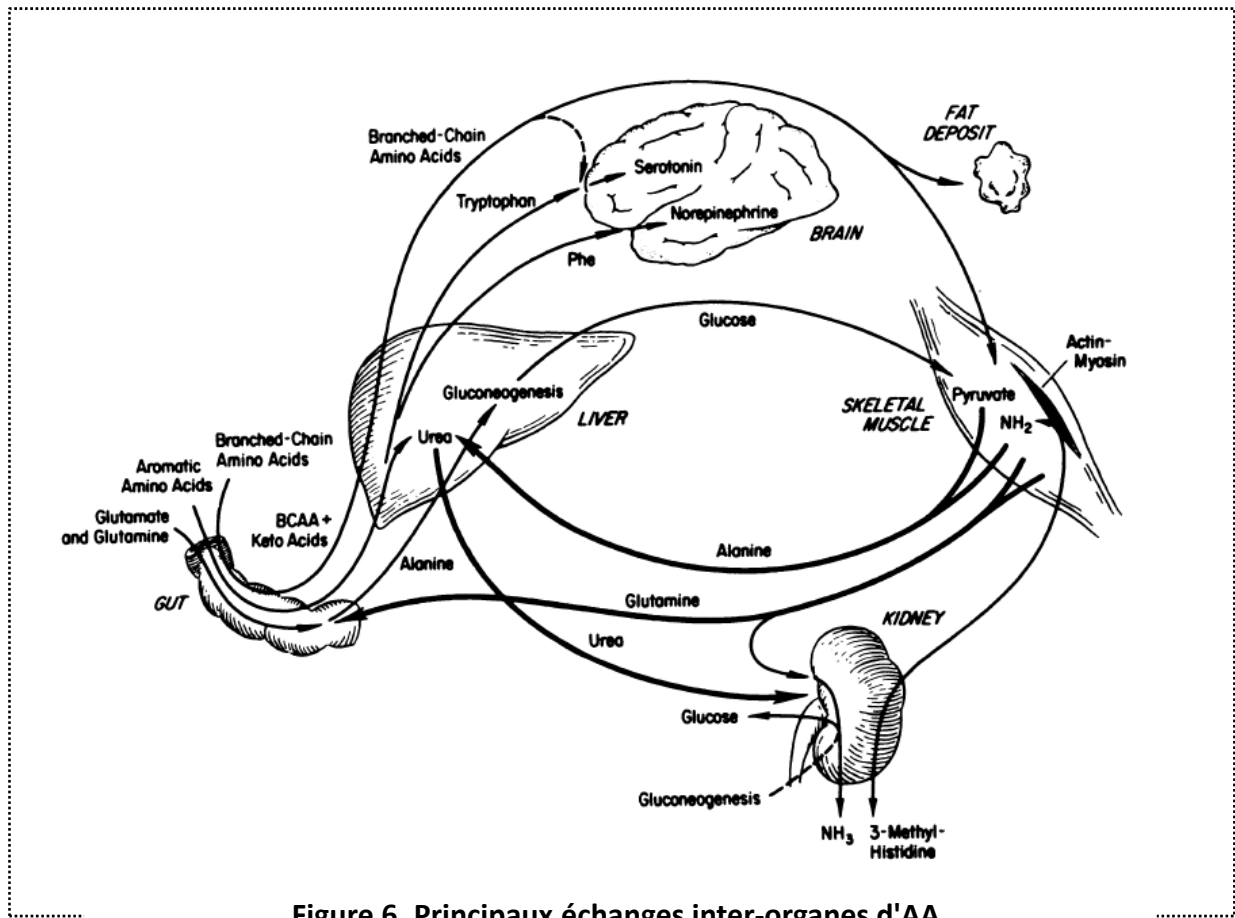


Figure 6. Principaux échanges inter-organes d'AA.

La glutamine est libérée par le muscle et est majoritairement prélevée par l'intestin (pour la synthèse d'alanine) et par le rein (pour l'ammoniagénèse). L'alanine, qui est libérée par le muscle et l'intestin, est captée en grande partie par le foie. Les AACR sont peu prélevés par la zone splanchnique et sont transférés vers la zone périphérique où ils sont principalement utilisés par le cerveau et le muscle.

D'après Young & Marchini (1990)

L'alanine semble également jouer un rôle clé dans les échanges d'AA entre la zone splanchnique et le muscle. L'alanine est libérée en quantité importante par l'intestin et le muscle, le flux de libération d'alanine représentant 30% du flux net total de libération d'AA par le muscle (Elia 1991) (Figure 7). Elle est essentiellement extraite par le foie, où elle participe à la synthèse d'urée et de glucose via la néoglucogénèse (Felig 1975). Ce jeu complexe d'échanges pourrait permettre l'adaptation à des conditions dans lesquelles la disponibilité globale en AA est modifiée et contribuer ainsi à préserver les fonctions vitales essentielles assurées par certains tissus. Ainsi, le muscle pourrait être considéré comme un réservoir de P et d'AA, capable de fournir de la glutamine et de l'alanine lors de conditions de stress pour préserver la fonction immunitaire et peut-être intestinale (Waterlow 2006; Reeds *et al.* 1993).

Il ressort globalement de ces informations que les transferts d'AA entre tissus ne consistent pas seulement en un ensemble de flux de prélèvement et libération vers un pool d'AA central dans lequel les tissus seraient en compétition pour l'utilisation des AA disponibles, mais qu'il s'agit plutôt d'un réseau collaboratif finement régulé, dans lequel chaque compartiment corporel joue un rôle spécifique dans le maintien de l'homéostasie des AA, par le prélèvement ou la libération des certains AA. Cependant, il est difficile, par ces méthodes de bilans d'organes, d'obtenir des données quantifiées fiables sur les flux d'échanges entre tissus, étant donné les incertitudes inhérentes aux mesures de débit sanguin et de différences de concentrations. Ainsi, l'ensemble de ces études fournissent des informations essentiellement qualitatives sur les échanges d'AA entre tissus dans une situation particulière, et l'amplitude ou l'importance relative de ces différents flux ainsi que leurs modulations en réponse à des variations de conditions nutritionnelles ou physiologiques sont encore méconnues. Ces modulations sont vraisemblablement déterminantes dans la mise à disposition des AA pour les tissus et leur utilisation métabolique intra-tissulaire.

I.4. Utilisation anabolique des AA par les organes

Les transferts d'AA (alimentaires et endogènes) entre tissus permettent de fournir à chaque tissu des précurseurs pour son anabolisme, c.-à-d. principalement pour sa SP. Les P corporelles, qui constituent la majorité de l'azote corporel, assurent des fonctions très variées de structure (collagène, kératine), de transport (albumine, Hb), enzymatiques, hormonales (insuline), motrices (actine, myosine), immunitaires ... La préservation de la masse protéique corporelle, qui est donc primordiale d'un point de vue fonctionnel et métabolique, dépend du bilan entre les flux de SP et DP.

I.4.i. Fonctionnement général du renouvellement protéique corporel et tissulaire

Les protéines tissulaires sont continuellement renouvelées par des processus de SP et DP qui ont lieu simultanément. L'équilibre entre les cinétiques protéiques (SP et DP) détermine les quantités et le maintien des pools protéiques et est étroitement régulé *in vivo* afin de maintenir l'homéostasie protéique. Ainsi, chez l'homme adulte en bonne santé avec un apport en P adéquat, des quantités identiques de P sont synthétisées et dégradées sur 24h (environ 300g/j), ce qui assure un bilan neutre global pour la masse protéique corporelle (qui représente une dizaine de kg). Néanmoins, cet équilibre est susceptible d'être affecté par les conditions nutritionnelles et physio-pathologiques et la modulation

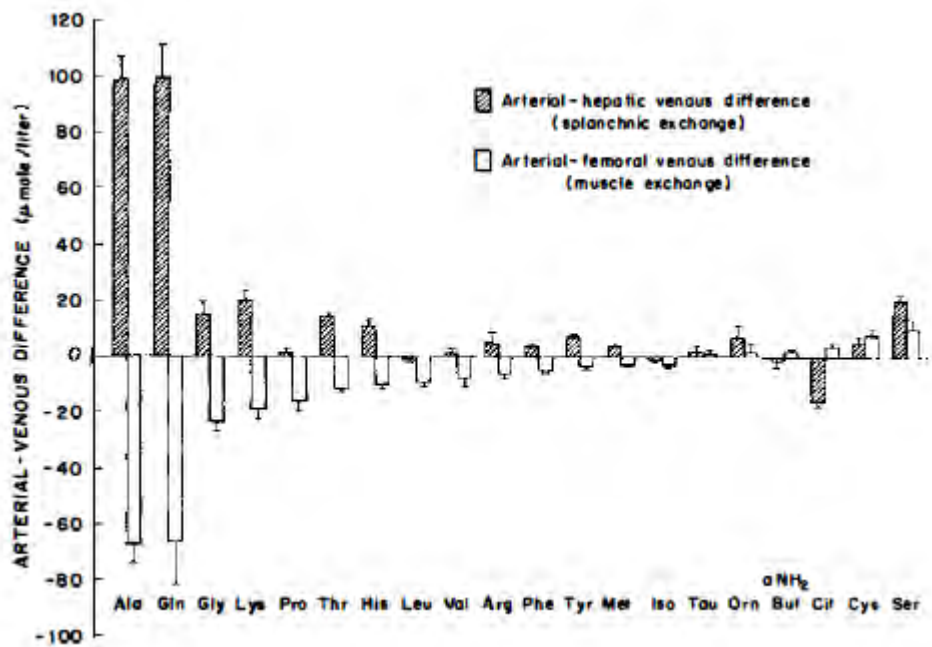


Figure 7. Flux net d'AA dans les zones périphérique et splanchnique à l'état postabsorptif chez l'homme.

Les flux nets d'AA dans les zones splanchnique et périphérique sont représentés respectivement par les barres hachurées et les barres vides. Les valeurs positives de bilan d'AA correspondent à un prélèvement net d'AA, alors que les valeurs négatives traduisent une libération nette.

→ La glutamine et l'alanine jouent un rôle clé dans les flux d'AA entre les zones splanchnique et périphérique : elles représentent plus de 50% des AA libérés par la zone périphérique et sont captées par la zone splanchnique.

D'après Felig (1975)

relative des flux de SP et DP, qui permet de s'adapter à des variations du bilan azoté, entraîne des variations de la masse protéique. En conditions anaboliques (phase postprandiale, croissance ...), SP est supérieure à DP et permet une accréation protéique nette, tandis qu'il y a perte protéique en conditions cataboliques (jeûne, vieillissement, certains états pathologiques) lorsque DP excède SP. Il est important de noter la dissociation entre des variations du renouvellement protéique (**FSR**, qui correspond à la proportion du pool protéique qui est renouvelé par jour), de SP et de masse protéique : une augmentation du FSR n'induit pas nécessairement d'augmentation de masse protéique, si les taux de SP et DP sont augmentés similairement, de même qu'une augmentation de SP n'est pas forcément associée à un gain protéique si DP varie également.

La DP libère des AA dans le pool intracellulaire. Le maintien de la taille du pool d'AA libres dépend de l'équilibre entre les flux SP et DP mais également entre les flux d'apport d'AA alimentaires, de synthèse de novo dans le cas des AANE et de dégradation irréversible par oxydation conduisant à la formation d'urée et de CO₂ (Figure 8).

1.4.ii. Détermination des cinétiques protéiques tissulaires par des méthodes basées sur l'incorporation de traceurs isotopiques

La détermination des cinétiques protéiques (SP et DP) est indispensable pour comprendre les mécanismes impliqués dans des altérations des masses et fonctions des tissus maigres de l'organisme.

Mesure des cinétiques protéiques à l'échelle corps-entier

En raison des difficultés d'accès aux pools métaboliques azotés régionaux d'intérêt chez l'homme, les méthodes d'estimation du renouvellement protéique ont dans un premier temps été développées au niveau corps entier. Ces méthodes sont principalement basées sur des techniques isotopiques utilisant des AA traceurs et sur la description du métabolisme protéique par un modèle simple à 2 compartiments, dont l'un représente le pool métabolique constitué des AA libres et l'autre le pool protéique (Annexe 2). Les méthodes d'estimation du renouvellement protéique corps entier ont notamment permis de mettre en évidence des variations des cinétiques protéiques entre les phases postabsorptive et postprandiale, induisant des phases de déplétion et réplétion protéiques (McNurlan & Garlick 1989) (Garlick *et al.* 1991). Néanmoins, les variations constatées au niveau du renouvellement protéique à l'échelle corps entier ne traduisent pas systématiquement des variations similaires dans les différents compartiments protéiques, et un renouvellement protéique inchangé ou un équilibre global maintenu peuvent cacher des déséquilibres régionaux entre SP et DP ou des variations inverses ou compensées de FSR tissulaires.

Des méthodes régionales d'exploration des flux métaboliques ont été développées dans le but d'étudier plus en détails la distribution des taux de SP et DP entre les différents tissus et ses modulations en fonction des conditions nutritionnelles et physiologiques.

Mesure du taux de SP à l'échelle tissulaire par l'utilisation d'AA traceurs

- Principe général et principales méthodes utilisées :

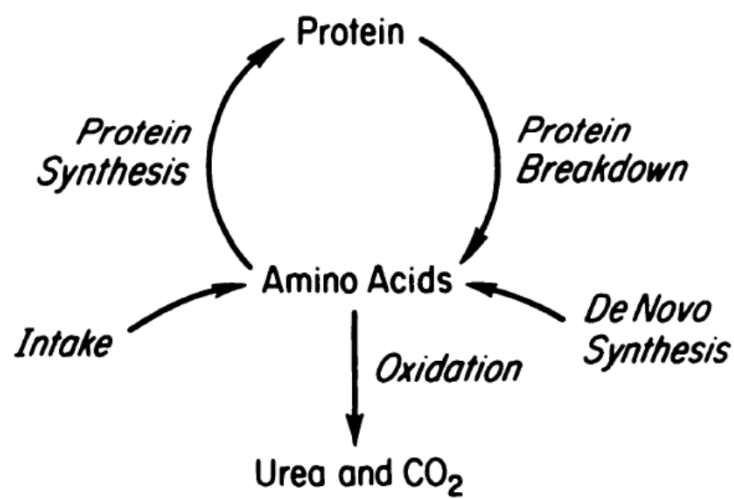


Figure 8 : Représentation schématique des principaux flux impliqués dans le maintien de l'homéostasie des AA et des P à l'échelle corps-entier.

D'après Young & Marchini (1990)

Un effort considérable a notamment été mis en œuvre pour le développement de techniques d'estimation des vitesses de synthèse des P circulantes ou tissulaires, absolues (ASR pour "absolute synthesis rate", en g de P synthétisées par jour) ou relatives (FSR pour "fractional synthesis rate", en % du pool protéique renouvelé par jour). La très grande majorité des méthodes utilisées sont des méthodes précurseur-produit qui consistent à suivre l'incorporation dans les P tissulaires d'un AA marqué (au ^{13}C , ^{15}N ou ^2H) après son administration prolongée ou ponctuelle (sous forme de bolus) dans l'organisme. Le principe de ces méthodes est d'estimer le FSR par la vitesse d'incorporation des AA marqués dans le pool protéique, en mesurant la pente d'augmentation de l'enrichissement isotopique dans le pool protéique et en la rapportant à l'enrichissement présent dans le pool précurseur de la SP, et ce une fois que celui-ci est à l'état stationnaire isotopique (c.-à-d., avec un enrichissement stable et constant sur l'ensemble de la période de mesure). La formule utilisée pour le calcul du FSR à partir de ces données d'enrichissement isotopique implique la représentation du métabolisme protéique tissulaire par un modèle précurseur-produit simple à 2 compartiments, avec les AA libres comme précurseurs et les protéines (AA liés aux protéines) comme produits (Annexe 3). Les deux principales méthodes précurseur-produit utilisées sont la méthode de perfusion à vitesse continue et la méthode de la "large dose" ou de "surcharge", qui diffèrent par le mode d'administration et la quantité de traceur administré, ainsi que par la durée et la répartition des mesures (Rennie *et al.* 1994).

La méthode de la "perfusion continue" consiste à administrer un AA marqué par une perfusion intraveineuse continue sur une période suffisamment longue (plusieurs heures) pour que l'enrichissement dans le pool d'AA précurseur considéré (AA libres plasmatiques ou intratissulaires) atteigne une valeur stable (plateau) et que l'augmentation de l'enrichissement dans le pool protéique soit détectable et mesurable expérimentalement. Cette méthode nécessite de se placer sous des conditions stationnaires afin de maintenir stable l'enrichissement isotopique du précurseur de la SP. De ce fait, les FSR à l'état nourri ne peuvent être étudiés avec cette technique que dans des conditions non physiologiques où les nutriments sont administrés par perfusion intraveineuse continue ou oralement par division du bolus normal unique en une succession de petits bolus répétés à intervalles réguliers (Garlick *et al.* 1994).

La méthode de la "large dose" consiste à injecter une quantité importante d'AA marqués et non marqués de manière à inonder rapidement tous les pools d'AA libres plasmatiques et intracellulaires, y compris les pools d'AA-ARNt. Étant donné que les mesures sont réalisées sur des durées plus courtes (quelques dizaines de minutes chez le rat et 1 à 2h chez l'homme), cette méthode permet de mesurer les FSR de tissus à renouvellement rapide, et d'étudier des modulations à court terme des FSR dans des situations non stationnaires comme l'état nourri normal (Garlick *et al.* 1983). Cependant, les valeurs de FSR estimées par cette méthode sont généralement supérieures aux valeurs déterminées après une perfusion continue (Rennie *et al.* 1994; Pomposelli *et al.* 1985), et il a été suggéré que l'hyperaminoacidémie (HA) induite par l'administration de la large dose d'AA pourrait altérer, directement ou indirectement, les SP. L'effet de cette forte dose reste encore très controversé : plusieurs études ne mettent pas en évidence de modifications des FSR en présence d'une large dose d'AA

(McNurlan *et al.* 1979; Garlick *et al.* 1980; Jahoor *et al.* 1992; McNurlan *et al.* 1991), alors que d'autres études montrent que l'administration d'une large dose d'AAI induit une augmentation des FSR dans le foie ou le muscle (Smith *et al.* 1992; Smith *et al.* 1998), ou à l'inverse une diminution du FSR (Jahoor *et al.* 1992)(Figure 9).

- Principales limites des méthodes « précurseur-produit » :

Ces méthodes d'estimation des taux de SP basées sur l'utilisation d'AA marqués impliquent plusieurs hypothèses fondamentales : elles requièrent l'atteinte et le maintien d'un état stationnaire isotopique dans le pool précurseur, elles négligent le recyclage du traceur (c'est-à-dire la réutilisation d'AA marqués issus de la DP pour les SP) et elles considèrent que l'incorporation de l'AA traceur utilisé est représentative de la vitesse d'incorporation de l'ensemble des AA. Cependant, la principale faiblesse de ces méthodes d'estimation des FSR reste la difficulté de la détermination de l'enrichissement isotopique du vrai pool précurseur des SP, c'est-à-dire des AA réellement incorporés dans le pool protéique. En effet, la mesure de l'enrichissement des AA-ARNt, qui constituent le vrai pool précurseur des SP, est techniquement difficile, du fait du renouvellement rapide et de l'instabilité des AA-ARNt. Par conséquent l'enrichissement dans le pool précurseur est généralement estimé par la mesure de l'enrichissement dans un pool plus accessible (souvent le pool d'AA libres intracellulaires ou d'AA plasmatiques ou encore le KIC plasmatique lors de perfusion de leucine-¹³C) dont l'enrichissement est considéré proche de l'enrichissement dans le vrai pool précurseur. Cependant, plusieurs études ont mis en évidence des différences d'enrichissements isotopiques entre les différents pools d'AA dans le foie, le muscle et le plasma, le pool d'AA-ARNt ayant un enrichissement systématiquement inférieur au pool d'AA plasmatiques libres (Airhart *et al.* 1974; Baumann *et al.* 1994; Ljungqvist *et al.* 1997; Smith & Sun 1995; Toffolo *et al.* 2003; Vidrich *et al.* 1977; Watt *et al.* 1991), mais supérieur (Watt *et al.* 1991; Vidrich *et al.* 1977; Airhart *et al.* 1974) ou égal (Baumann *et al.* 1994; Ljungqvist *et al.* 1997; Smith & Sun 1995) au pool d'AA intracellulaires libres, et variable par rapport au KIC plasmatique (Waterlow 2006). Ces différences relatives indiquent que l'approximation de l'enrichissement du pool précurseur par l'enrichissement du pool d'AA plasmatiques, intra-cellulaires ou du KIC peut conduire à une sur- ou sous-estimation du FSR (Toffolo *et al.* 2003). Ce problème est en partie contourné dans le cas de l'administration d'une large dose d'AA marqués qui inonde tous les pools d'AA libres et minimise ainsi les différences d'enrichissement isotopique entre les AA plasmatiques et intracellulaires et les AA-ARNt (Davis *et al.* 1999; Smith & Sun 1995).

Par ailleurs, ces différences d'enrichissements isotopiques suggèrent une compartimentation du pool d'AA intracellulaire et questionnent la représentation du pool d'AA par un unique pool homogène d'AA précurseurs des SP telle que supposée dans les méthodes "précurseurs-produits". D'autres modèles ont été proposés pour rendre compte de la compartimentation dans le pool d'AA tissulaires et du métabolisme protéique tissulaire : ces modèles considèrent plusieurs sources possibles d'AA pour les SP et distinguent soit deux pools d'AA qui correspondent respectivement aux AA précurseurs des SP et aux AA issus de la DP (Hod & Hershko 1976; Mortimore *et al.* 1972; Airhart *et al.* 1974), soit trois pools d'AA :

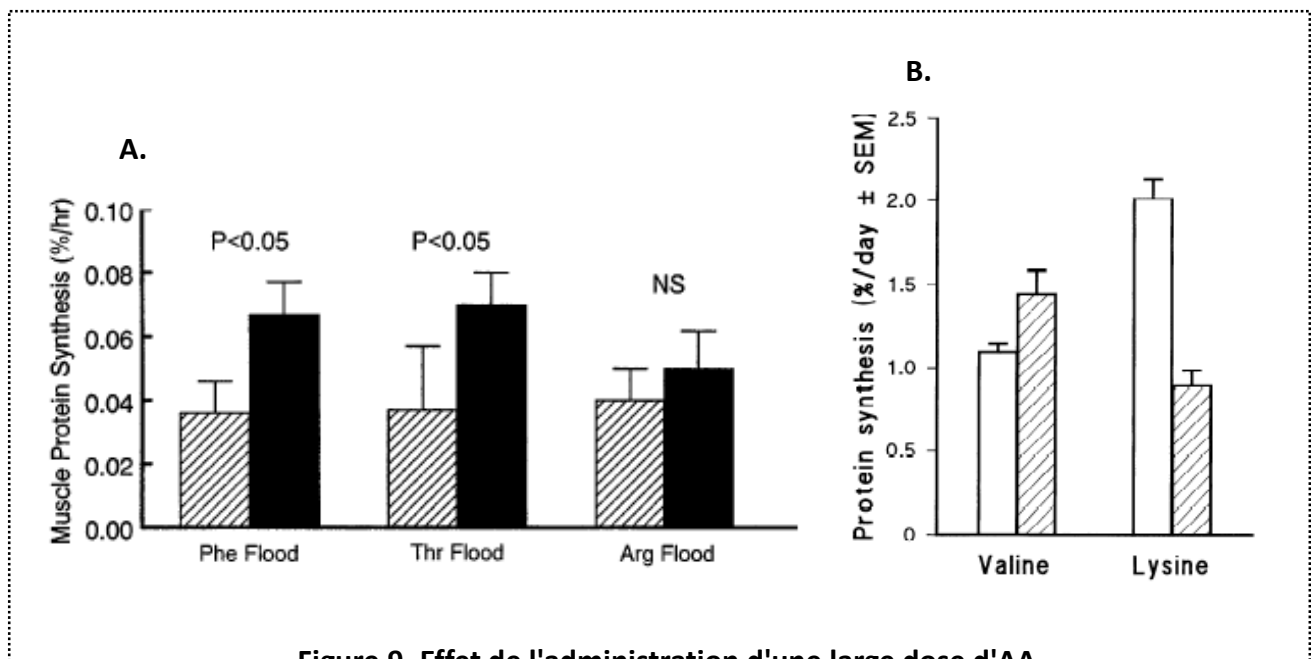


Figure 9. Effet de l'administration d'une large dose d'AA sur les estimations de FSR musculaire.

A. FSR mesurés avant (barres hachurées) et après (barres pleines) l'administration d'une large dose de phénylalanine, de thréonine et d'arginine, chez l'homme.
D'après Smith et al. (1998)

B. FSR mesurés avant (barres blanches) et après (barres hachurées) l'administration d'une large dose de valine chez l'homme, et d'une large dose de lysine chez le chien.
D'après Garlick et al. (1994)

→ L'effet d'une large dose d'AA sur les estimations de FSR est variable selon les études.

les AA extracellulaires et plasmiques, les AA intracellulaires et les AA-ARNt (Johnson *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2000). Selon ces représentations, les AA-ARNt précurseurs des SP peuvent être formés à partir des AA intracellulaires, ou préférentiellement à partir des AA issus de la DP (c.-à-d. un taux de recyclage élevé), ou encore directement à partir des AA extracellulaires, sans que ceux-ci ne se mélangent aux AA intracellulaires (c.-à-d. un fort taux de "channeling") (Figures 10 & 11). Cette hétérogénéité des sources d'AA expliquerait les différences d'enrichissements isotopiques observées entre les AA-ARNt et les pools d'AA libres extracellulaires et intracellulaires (Johnson *et al.* 1999b; Toffolo *et al.* 2003). De plus, l'importance relative des processus de "channeling" et recyclage varie vraisemblablement selon les tissus et l'AA traceur considéré (Johnson *et al.* 2001; Johnson *et al.* 2000).

Mesure du taux de DP à l'échelle tissulaire

La mesure du taux de DP (**FBR** pour "fractional breakdown rate") en complément du FSR est nécessaire pour comprendre l'ensemble du renouvellement protéique, cependant, contrairement au FSR, peu de méthodes directes ont été développées pour son estimation *in vivo*. En général, les mesures du renouvellement protéique étant réalisées à l'état stationnaire, le FBR est supposé égal au FSR. A l'état non stationnaire, il peut être estimé indirectement par la différence entre le FSR et le taux de variation de la masse protéique (ou taux de croissance). Dans le muscle, une méthode indirecte d'estimation de la DP consiste à mesurer l'excrétion urinaire de 3-méthylhistidine. Par ailleurs, le taux de DP peut également être déterminé directement *in vivo* par l'utilisation d'AA traceurs, selon une version adaptée des méthodes précurseur-produit (Zhang *et al.* 1996) (Annexe 4). Enfin, la combinaison de la technique du bilan d'organe par cathétérisme artériovoineux avec l'utilisation d'AA traceurs permet de mesurer concomitamment les taux de SP et de DP, par des bilans d'AA marqués et non-marqués à travers un tissu, après la perfusion continue d'un AA traceur (Wolfe & Chinkes 2005).

I.4.iii. Hétérogénéité des cinétiques protéiques tissulaires :

Malgré le problème persistant de l'identification du pool précurseur des SP et les incertitudes qui en résultent sur l'estimation des FSR tissulaires, les méthodes basées sur l'incorporation d'AA traceurs ont permis d'estimer de taux de synthèses tissulaires dans un grand nombre de conditions et de tissus, principalement chez le rat, mais également chez quelques autres espèces animales, telles que le mouton ou le porc, et chez l'homme. L'ensemble de ces données montre une importante variabilité inter-espèces des FSR tissulaires (par ex., les FSR sont beaucoup plus rapides chez le rat que chez l'homme), et au sein d'une espèce, une forte variabilité des FSR entre tissus, le FSR de la muqueuse intestinale étant par exemple 10 fois plus élevé que le FSR du muscle et 2 fois plus élevé que le FSR du foie, ces différences relatives entre tissus étant bien conservées entre les espèces (Tableau 3). De plus, il existe également une hétérogénéité intra-tissulaire des FSR, car les différentes P individuelles au sein d'un même tissu peuvent avoir des FSR très différentes. Par exemple le foie et la muqueuse intestinale synthétisent à des vitesses différentes leurs P constitutives et exportées, ces dernières correspondant principalement pour l'intestin aux enzymes et mucoprotéines sécrétées dans la lumière intestinale et pour le foie à l'albumine et au fibrinogène sécrétés dans le plasma. De même, les différents types de fibres musculaires, dont la

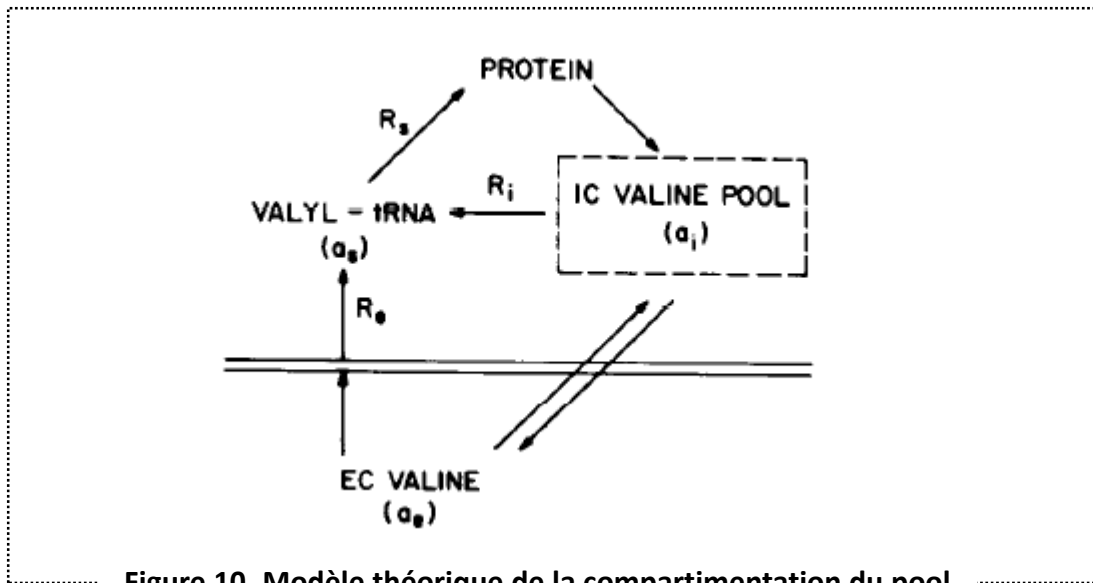


Figure 10. Modèle théorique de la compartimentation du pool précurseur des synthèses protéiques.

Le pool d'AA intracellulaires (IC valine pool) est alimenté par les AA issus de la dégradation protéique et les AA extracellulaires (EC valine). Les AA-ARNt précurseurs des synthèses protéiques (valyl-tRNA) sont formés soit à partir des AA du pool intracellulaire soit directement à partir des AA extracellulaires (phénomène de channeling).

D'après Hod & Hershko (1976)

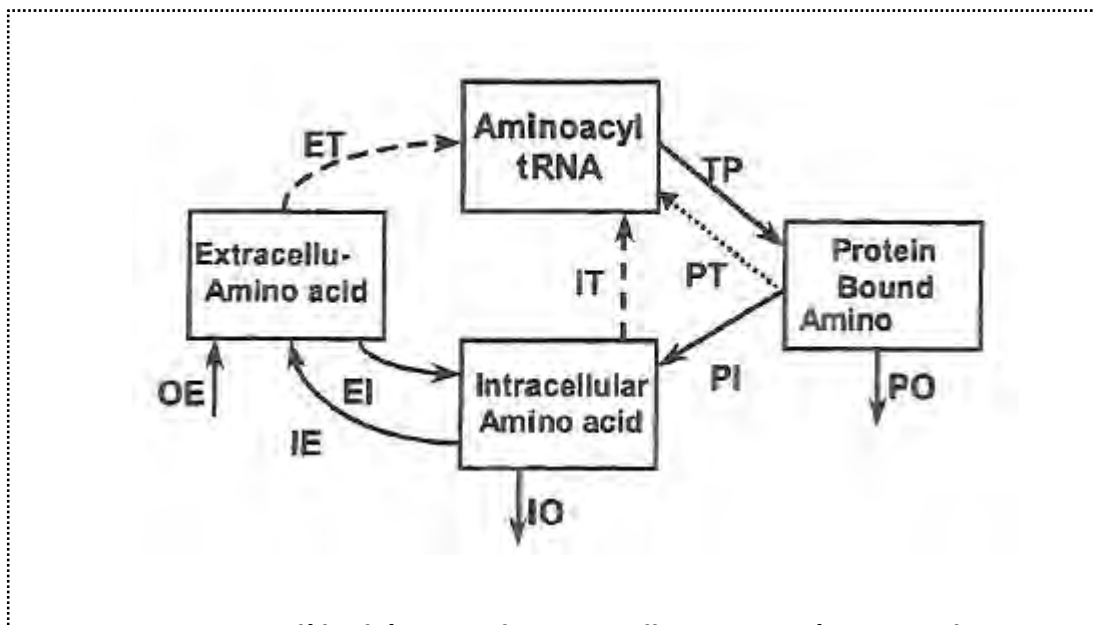


Figure 11. Modèle théorique du renouvellement protéique tissulaire.

Le modèle considère 1 pool protéique et 3 pools d'AA : les AA extracellulaires et plasmatiques, les AA intracellulaires et les AA-ARNt. Les AA-ARNt précurseurs des synthèses protéiques peuvent être formés à partir des AA intracellulaires (IT), à partir des AA issus de la dégradation des P (PT, recyclage) ou directement à partir des AA extracellulaires (ET, channeling).

D'après Johnson et al. (2003)

teneur varie selon les types de muscles, présentent des FSR spécifiques (Garlick *et al.* 1989). La variabilité des FSR tissulaires et protéiques est liée à la diversité des fonctions assurées par les tissus et P, les P de structure du muscle étant par exemple renouvelées beaucoup plus lentement que les P inflammatoires ou les enzymes produites par le foie, dont le renouvellement rapide assure la bonne capacité d'adaptation de l'organisme. Chaque tissu participe de manière différente au renouvellement protéique global, la contribution relative d'un tissu dépendant à la fois de son importance quantitative et de la rapidité de son renouvellement. Par exemple, les organes splanchniques, bien que représentant une masse protéique plus faible que celle des muscles (5-10% vs 50%), contribuent au renouvellement protéique total de manière équivalente voire supérieure par rapport au muscle du fait de leur vitesse de renouvellement élevée. La peau est également un contributeur important, puisque son renouvellement représente environ 17% du renouvellement protéique total. Le renouvellement protéique tissulaire est modulé par de nombreux facteurs, tels que l'âge (Bates & Millward 1981; Obled & Arnal 1992; Goldspink & Kelly 1984), l'état nutritionnel, et particulièrement l'alternance des phases postabsorptive et postprandiale (Mosoni *et al.* 1995), ou l'état pathologique.

En conclusion, si les méthodes isotopiques "précurseur-produit" ont permis la détermination du FSR dans de nombreux tissus, les valeurs de FSR mesurées sont très variables selon les études et semblent fortement dépendantes de la méthode et de l'AA utilisé ainsi que des conditions nutritionnelles. Ainsi malgré le nombre important d'études, les vitesses de renouvellement des tissus et leurs modulations en fonction des conditions nutritionnelles sont encore mal établies.

I.5. Coordination des flux d'échanges inter et intra-organes et représentations régionales ou globales

Les données présentées dans les parties précédentes fournissent des informations locales et indépendantes sur, d'une part les flux d'échanges inter-organes d'AA, et d'autre part les flux intra-organes de SP et DP. Or ces flux d'échanges inter- et intra-organes sont liés : des modulations des flux d'échanges d'AA entre tissus peuvent affecter l'utilisation intra-tissulaire des AA pour les SP en modifiant leur mise à disposition pour le tissu, et réciproquement, des modulations de l'amplitude des flux de SP et DP dans un tissu peuvent perturber les transferts inter-tissulaires d'AA en modifiant les quantités d'AA libérés ou prélevés par le tissu. Des modèles multi-compartimentaux permettent d'avoir une vision plus globale de l'interaction de ces différents flux.

I.5.i. Au niveau tissulaire : détermination conjointe des échanges inter- et intra-organes d'AA par des modèles à 3 compartiments

Principe des méthodes

L'utilisation combinée de la technique du bilan d'organe par cathétérisme artériovoineux et d'AA traceurs permet de quantifier simultanément, pour un tissu, les flux de SP et de DP ainsi que les flux de transferts d'AA entre le plasma et le tissu considéré. Cette approche repose sur la représentation du système par un modèle multi-compartimental, incluant notamment 3 compartiments d'AA : un compartiment d'AA artériels (plasma en amont du tissu considéré), un compartiment d'AA veineux (en

Tableau 3. FSR mesurés dans différents tissus chez le rat

	Valeurs de FSR (%/j)*		n	Références
	moyenne	variations		
Foie	70	[35 - 106]	25	(3-9; 13; 14; 16; 19-25; 28; 31; 34; 37 - 40; 43)
Muscle	10	[5-20]	31	(1-9; 11; 13; 16-20; 24; 25; 28-30; 33; 34; 36-38; 40-44)
Rein	53	[29 - 84]	8	(4; 7-9; 14; 19; 24; 37)
Peau	24	[9 - 64]	7	(3; 4; 7; 19; 28; 36; 44)
Intestin†	118	[83 - 218]	18	(4; 7-13; 19-24;26; 32; 37; 39)
Cœur	17	[11 - 20]	8	(8; 9; 13; 20; 35; 37; 38; 43)
Albumine	52	[18 - 75]	3	(5; 15; 27)

*Les FSR ont été mesurés par des méthodes isotopiques de type "précurseur-produit" utilisant des AA traceurs administrés sous la forme d'une large dose ou par perfusion continue (à l'exception de la référence (34), dans laquelle les FSR sont mesurés par la méthode de l'eau deutérée). Les valeurs rapportées concernent des mesures à la fois en phases postabsorptive et postprandiale et ont été obtenues chez des rats de poids variables (de 100 à 550g). †les valeurs rapportées concernent la muqueuse intestinale et le jéjunum.

Références : (1) Baillie & Garlick, 1991a; (2) Baillie & Garlick, 1992; (3) Chereil et al., 1991b; (4) Chevalier et al., 2009; (5) Chevalier et al., 2010; (6) Danicke et al., 1999; (7) El Yousfi et al., 2003; (8) Estornell et al., 1994; (9) Estornell et al.,1995; (10) Faure et al., 2002; (11) Faure et al., 2005; (12) Faure et al., 2007; (13) Garlick et al.,1980; (14) Goldspink & Kelly, 1984; (15) Jeejeebhoy et al., 1972; (16) Jepson et al.,1986; (17) Jepson et al., 1988; (18) Laurent et al., 1984; (19) Masanes et al., 1999; (20) McNurlan et al., 1982; (21) McNurlan et al., 1981; (22) McNurlan & Garlick, 1980; (23) McNurlan et al., 1979; (24) Mercier et al., 2002; (25) Mosoni et al., 1995; (26) Obled et al., 2002; (27) Papet et al., 2003; (28) Preedy et al., 1983; (29) Preedy & Garlick, 1983; (30) Reeds et al., 1986; (31) Ruot et al., 2002; (32) Samuels et al., 1996; (33) Taillandier et al., 1996; (34) Yuan et al., 2008; (35) Biggs & Booth, 1990; (36) Chikenji et al., 1983; (37) Fern & Garlick, 1974; (38) Fern & Garlick, 1973; (39) Garlick et al., 1972; (40) Glick et al., 1982; (41) Millward et al., 1976; (42) Millward et al., 1975; (43) Pain & Garlick, 1974; (44) Obled & Arnal, 1992.

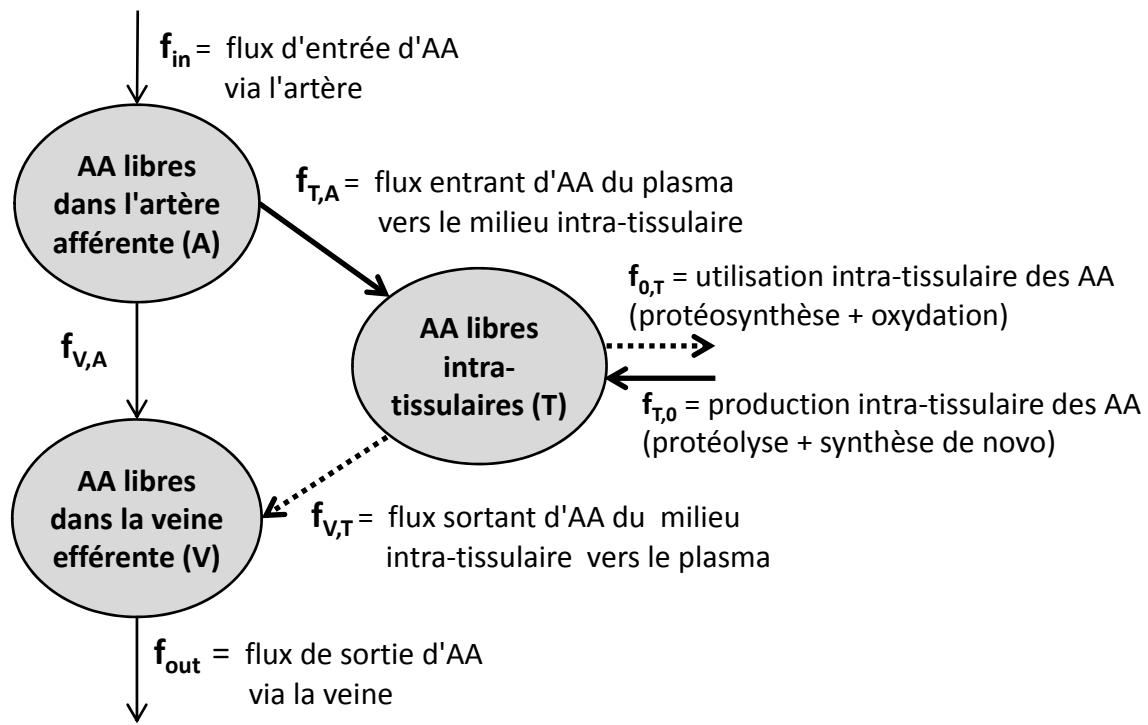
aval du tissu considéré) et un compartiment d'AA libres intracellulaires (Biolo *et al.* 1992a; Tessari *et al.* 1995) (Figure 12). Les différents flux d'AA (flux d'utilisation pour les SP, de libération par protéolyse, flux entrant depuis le plasma vers le milieu intracellulaire et flux sortant du milieu intracellulaire vers le plasma) sont calculés à partir des mesures de bilans d'AA marqués et non-marqués à travers le tissu et d'équations dérivées de ce modèle (Annexe 5). L'estimation des flux de SP et de DP par cette approche repose sur les hypothèses habituelles des méthodes "précurseur-produit" présentées précédemment, c'est-à-dire le fait que le système est à l'état stationnaire, que les enrichissements isotopiques sont mesurés dans les différents pools à l'équilibre et que le pool d'AA libres intracellulaires est homogène. Cette estimation présente également les mêmes incertitudes liées à la détermination de l'enrichissement du vrai pool précurseur des SP, qui est approximé par l'enrichissement du pool d'AA libres intratissulaires (Biolo *et al.* 1992a) ou du KIC plasmatique (Tessari *et al.* 1995).

Apports de ces approches concernant les flux azotés au niveau tissulaire

L'analyse des variations des taux de transfert d'AA vers le milieu intra-tissulaire est notamment intéressant en terme de disponibilité des AA intra-tissulaires, étant donné que plusieurs processus intracellulaires, tels que la synthèse protéique, sont susceptibles d'être directement affectés par la disponibilité des AA. Ainsi, la proportion des AA prélevés par le tissu depuis le plasma qui sont utilisés pour les SP ($f_{T,A}/f_{0,T}$ dans la représentation de Biolo, Figure 12), varie de façon importante selon l'AA considéré (Biolo *et al.* 1995b; Biolo *et al.* 1997) et selon le tissu étudié : cette proportion est particulièrement plus faible dans la peau (Zhang *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2003) (Tableau 4). La contribution relative du transport d'AA depuis le plasma à l'alimentation du pool d'AA intracellulaire ($f_{T,A}/R_{aT}$, selon la Figure 12) est également différente selon les tissus. Elle est par exemple très faible dans la peau où les AA libres intra-tissulaires proviennent majoritairement de la DP (Zhang *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2003), alors que dans le muscle, les AA libres tels que la phénylalanine ou la leucine, sont alimentés en proportions similaires par le transport depuis le plasma et la DP (Biolo *et al.* 1995b). Ces différences d'origine des AA libres intra-tissulaires peuvent expliquer le fait que la peau semble moins sensible que les autres tissus aux conditions nutritionnelles.

De plus, l'utilisation de leucine comme AA traceur dans ces approches couplées de bilan d'organe et d'AA traceurs présente l'avantage supplémentaire de permettre de quantifier les flux de transamination et de désamination, et d'évaluer ainsi le devenir métabolique tissulaire de la leucine transférée depuis le plasma (c.-à-d. la quantité relative de leucine oxydée par rapport à son utilisation pour les SP). Bien que rapportée dans peu d'études, la proportion d'oxydation de la leucine par rapport à son utilisation pour les SP semble varier selon l'état nutritionnel : elle serait par exemple augmentée dans l'intestin en réponse à un apport alimentaire, mais inchangée dans le foie (Yu *et al.* 1990) (Tableau 4).

Concernant les rôles particuliers de l'intestin et du foie dans les échanges d'AA, ces techniques de cathétérisme artério-veineux couplées à l'administration d'isotopes distincts d'AA traceurs par voies intragastrique et intraveineuse ont permis de mettre en évidence chez l'animal que les AA alimentaires



$$R_{aT} = \text{flux total d'entrée des AA dans le pool intratissulaire} = f_{T,0} + f_{T,A}$$

$$R_{dT} = \text{flux total de sortie des AA du pool intratissulaire} = f_{0,T} + f_{V,T}$$

Figure 12. Modèle à 3 compartiments représentant les flux d'AA au niveau tissulaire.

Le modèle représente les flux d'échange d'AA entre le plasma et le tissu ($f_{T,A}$ et $f_{V,T}$) et les flux intra-tissulaires d'utilisation ($f_{0,T}$, protéosynthèse et oxydation) et de production des AA ($f_{T,0}$, protéolyse et synthèse de novo)

D'après Biolo et al. (1992a)

étaient la source préférentielle des SP intestinales et hépatiques (Baracos *et al.* 2000; Berthold *et al.* 1995; Stoll *et al.* 1999). Chez le porcelet par exemple, la phénylalanine utilisée pour la SP est à 60% d'origine alimentaire dans l'intestin et presque totalement d'origine portale dans le foie (Stoll *et al.* 1999). De même, chez le mini-porc, la cystéine alimentaire serait extraite à 60% par les tissus drainés par la veine porte alors que ces tissus ne prélèveraient pas de leucine depuis la circulation artérielle (Remond *et al.* 2011). La sensibilité de la stimulation des SP intestinale et hépatique vis-à-vis de l'origine des AA est confirmée par des études montrant, chez le porcelet, une atrophie de l'intestin et une diminution de la SP intestinale en réponse à une alimentation uniquement parentérale vs entérale (Dudley *et al.* 1998; Bertolo *et al.* 1999) et, chez le chien, une stimulation de SP hépatique par l'administration d'AA par la voie portale mais pas par voie périphérique (Dardevet *et al.* 2008) (Figure 13). Dans le foie, ces observations pourraient être liées à la zonation des hépatocytes et le fait que la synthèse des P exportées aurait lieu majoritairement et avec un taux plus rapide dans les hépatocytes périportaux que périvénaux. Elles suggèrent également une possible compartimentation métabolique du pool d'AA précurseurs des SP tissulaires, les AA exogènes étant directement orientés vers la SP sans se mélanger avec le pool d'AA intracellulaires (Stoll *et al.* 1999; Johnson *et al.* 2001). De plus, le devenir métabolique des AA alimentaires extraits est différent dans l'intestin et le foie : le catabolisme oxydatif représente le devenir majeur des AA dans l'intestin, alors que dans le foie, la majorité des AA extraits sont utilisés pour la SP. En effet, chez le porcelet, seulement 10 à 20% de la leucine, lysine et phénylalanine perfusées par voie entérale sont incorporés dans les P intestinales, alors que dans le foie 50 à 90% de ces AA extraits de la veine porte sont utilisés pour la synthèse de P constitutives et exportées (Stoll *et al.* 1998a; Stoll *et al.* 1998b). Le devenir métabolique pourrait néanmoins différer selon les AA, et par exemple, dans le cas de la thréonine, l'utilisation pour les SP (notamment pour la synthèse de mucines) prédomine par rapport à l'oxydation dans l'intestin (Schaart *et al.* 2005). L'extrapolation des conclusions de ces études est cependant limitée par le fait qu'elles ont été réalisées sur des animaux très jeunes, dont il a par ailleurs été montré que le comportement de l'intestin était significativement différent de celui de l'adulte, notamment chez le porc. De manière générale, les flux estimés selon ces méthodes concernent généralement un AA particulier (souvent la leucine ou la phénylalanine) et l'extrapolation de ces valeurs à l'ensemble des AA libres n'est pas évidente étant donné qu'on observe une variabilité importante des valeurs de flux estimées à partir d'AA traceurs différents.

Si les mesures régionales des flux azotés sont particulièrement informatives par rapport au métabolisme tissulaire des AA et P, les phénomènes de compétition ou d'interaction entre les différents tissus pour l'utilisation et l'échange d'AA sont susceptibles de moduler le métabolisme régional, et plus particulièrement dans des conditions où les quantités et/ou le profil des AA disponibles sont modifiés. Par conséquent, il est nécessaire d'acquérir des données concernant les flux azotés entre tissus pour avoir une vision plus intégrée de la distribution et la régulation de ces flux à l'échelle de l'organisme.

Tableau 4. Flux régionaux d'AA¹ : relations entre les flux de transport depuis le plasma, les flux d'utilisation pour les synthèses protéiques et les flux d'oxydation

En phase postabsorptive

AA traceur	Muscle		Peau	Tissus splanchniques	IG		Rein
	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu
$TI = f_{T,A}/f_{0,T}$ ²	0,9 - 3,1	1,8 - 3,8	0,2 - 0,5	1,9 - 2	1,9	1,2	0,9
$f_{0,T}/R_{aT}$ ³	22 - 41%	13 - 32%	66 - 79%	26 - 27%	24%	55%	43%
$f_{T,A}/R_{aT}$ ⁴	35 - 71%	50 - 65%	18 - 34%	48 - 53%	46 - 63%	66%	37%
pOx ⁵	15 - 23%			15 - 17%	8%		58%
références	(1-6;9)	(1-3;6;7;10)	(10;11)	(5;8)	(1;8)	(1)	(5)
<i>Espèces</i>	Chien, Homme	Homme, Chien, Lapin	Lapin	Homme, chien	Chien	Chien	homme

A l'état nourri ou après perfusion d'AA et/ou d'insuline

AA traceur	Muscle		Peau	Tissus splanchniques	IG
	Leu	Phe	Phe	Leu	Leu
$TI = f_{T,A}/f_{0,T}$ ²	1,1 - 3,2	2,6 - 6,3	0,5 - 0,6	1,7	2
$f_{0,T}/R_{aT}$ ³	26 - 55%	14 - 26%	63 - 68%	37%	31%
$f_{T,A}/R_{aT}$ ⁴	39 - 82%	67 - 90%	35 - 36%	61%	62%
pOx ⁵	9 - 17%			23%	16%
références	(3;6;9)	(3;6;7;10)	(10)	(8)	(8)
<i>Espèces</i>	Homme	Homme, Lapin	Lapin	Chien	Chien

¹Les flux sont définis selon la représentation de Biolo *et al.* (Figure 12). ²TI représente l'index de transport, c'est-à-dire le rapport entre le flux d'apport d'AA depuis le plasma et le flux d'utilisation des AA pour les synthèses protéiques; ³le rapport $f_{0,T}/R_{aT}$ représente la part du flux total d'alimentation en AA du pool intracellulaire utilisée pour les synthèses protéiques; ⁴le rapport $f_{T,A}/R_{aT}$ représente la contribution relative du transport d'AA depuis le plasma à l'alimentation du pool d'AA intracellulaire; ⁵pOx représente le rapport entre le flux d'oxydation des AA et le flux d'utilisation pour les synthèses protéiques.

Références : (1) Biolo *al.*, 1995c; (2) Biolo *al.*, 1995b; (3) Biolo *al.*, 1997; (4) Tessari *al.*, 1995 ; (5) Tessari *al.*, 1996; (6) Volpi *al.*, 1998; (7) Volpi *al.*, 1999; (8) Yu *al.*, 1990; (9) Zanetti *al.*, 1999; (10) Zhang *al.*, 1998; (11) Zhang *al.*, 2003. Les données des références (1;8) ont été obtenues chez le chien; celles des références (10;11) chez le lapin et celle des références (2-7;9) chez l'homme.

1.5.ii. À l'échelle corps-entier : détermination et représentation des flux azotés par des modèles multi-compartimentaux

L'utilisation de modèles compartimentaux semble particulièrement appropriée pour rendre compte de la complexité des flux d'azote dans l'organisme. En effet, les modèles multi-compartimentaux dynamiques permettent à la fois de rendre compte du caractère fortement structuré du métabolisme protéique, en distinguant des compartiments métaboliques distincts ayant chacun un comportement homogène, et d'étudier la dynamique des flux d'échanges entre compartiments, en représentant les transferts d'azote par des lois simples de proportionnalité. Dans le domaine des sciences animales, différents modèles compartimentaux dynamiques plus ou moins complexes ont été développés chez le porc ou l'agneau en croissance (Gill *et al.* 1989; Halas *et al.* 2004), chez le veau pré-ruminant (Gerrits *et al.* 1997), et chez la truie ou la vache en lactation (Baldwin *et al.* 1987; Pettigrew *et al.* 1992), afin de simuler le devenir des nutriments ingérés pour le métabolisme protéino-énergétique et en particulier de prédire la déposition protéique dans un objectif d'optimisation des stratégies alimentaires. Ces modèles considèrent en général un pool unique d'AA libres (certains séparant les AAI des AANE), et distinguent plusieurs compartiments de P (souvent 2 à 4, dont principalement les os, les muscles et les tissus viscéraux) (Pettigrew *et al.* 1992; Baldwin *et al.* 1987; Gerrits *et al.* 1997; Halas *et al.* 2004), à l'exception du modèle développé par Gill *et al.*, qui intègre jusqu'à dix compartiments de P, correspondant chacun à un tissu (foie, peau, TGI, rein ...), et qui distingue, pour chaque tissu, un compartiment d'AA libres échangeant avec le pool circulant d'AA libres (Gill *et al.* 1989). Dans ces modèles, les transferts d'azote entre compartiments sont décrits par des lois cinétiques semi-empiriques qui permettent de simuler notamment les variations des flux de transfert et de SP et de DP en réponse à un apport alimentaire. Ces modèles prédisent ainsi la composition corporelle et l'accrétion protéique dans le muscle en fonction du régime, de la quantité de P ingérées (Gerrits *et al.* 1997) et plus particulièrement de la teneur en certains AAI comme la lysine (Halas *et al.* 2004; Pettigrew *et al.* 1992).

En physiologie de la nutrition, outre les modèles régionaux présentés dans la partie précédente (Tessari *et al.* 1995; Biolo *et al.* 1992a) et le modèle global avec un compartiment P unique développé par Cobelli (Cobelli *et al.* 1991), quelques modèles du renouvellement protéique à l'échelle corps-entier distinguant plusieurs compartiments P ont été développés chez l'animal (Carraro *et al.* 1991; Johnson *et al.* 1999a). Le modèle de Johnson distingue 3 compartiments de P (selon leurs valeurs de FSR lente, intermédiaire ou rapide) et 3 compartiments d'AA libres (extracellulaire, intracellulaire, et AA-ARNt) (Figure 14). Le modèle de Carraro est constitué de 7 tissus (foie, intestin, muscle, rein, peau, poumons et autres organes) divisés chacun en 2 compartiments de P et d'AA libres en échanges via SP et DP, les compartiments d'AA libres tissulaires échangeant également par transport avec le pool circulant d'AA libres. Bien qu'à l'échelle corps-entier, ces modèles s'intéressent essentiellement au sous-système constitutif des P et AA corporels, sans intégrer les sous-systèmes absorptif et d'élimination : ils permettent d'estimer les flux de SP et DP des différents tissus mais pas d'investiguer l'ensemble des transferts d'AA inter-organes.

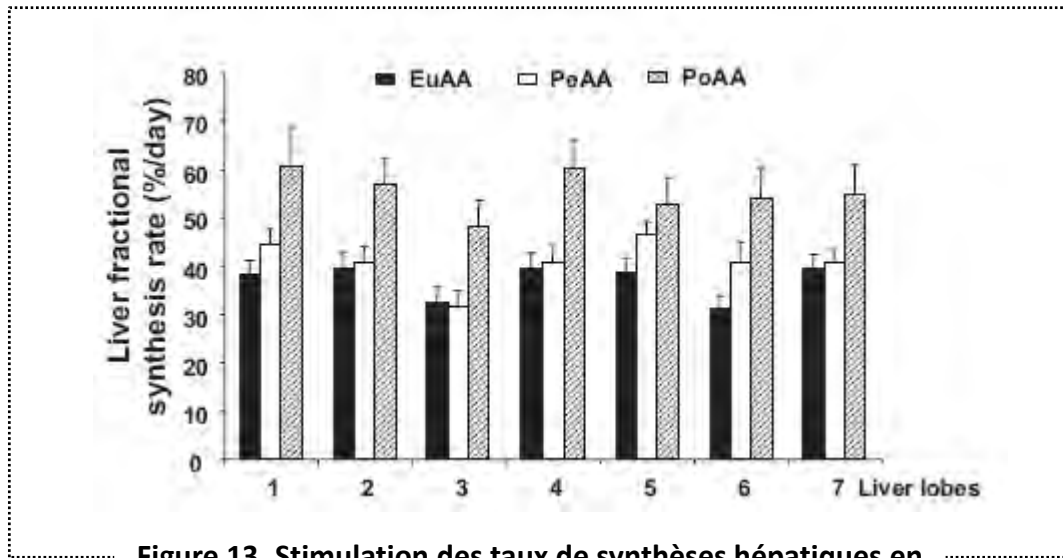


Figure 13. Stimulation des taux de synthèses hépatiques en réponse à une hyperaminoacidémie.

Dans le groupe EuAA (euaminoacidémie), des AA sont perfusés par voie périphérique pour maintenir les concentrations plasmatiques d'AA à des concentrations correspondant à la phase postabsorptive. Dans les groupes PeAA et PoAA des quantités plus importantes d'AA sont administrées par voie périphérique (PeAA) ou portale (PoAA) afin de mimer l'hyperaminoacidémie induite par l'ingestion d'un repas.

→ La stimulation de la synthèse protéique hépatique est sensible à l'origine des AA : la synthèse protéique est stimulée par l'administration d'AA par voie portale mais pas par voie périphérique.

D'après Dardevet et al. (2008).

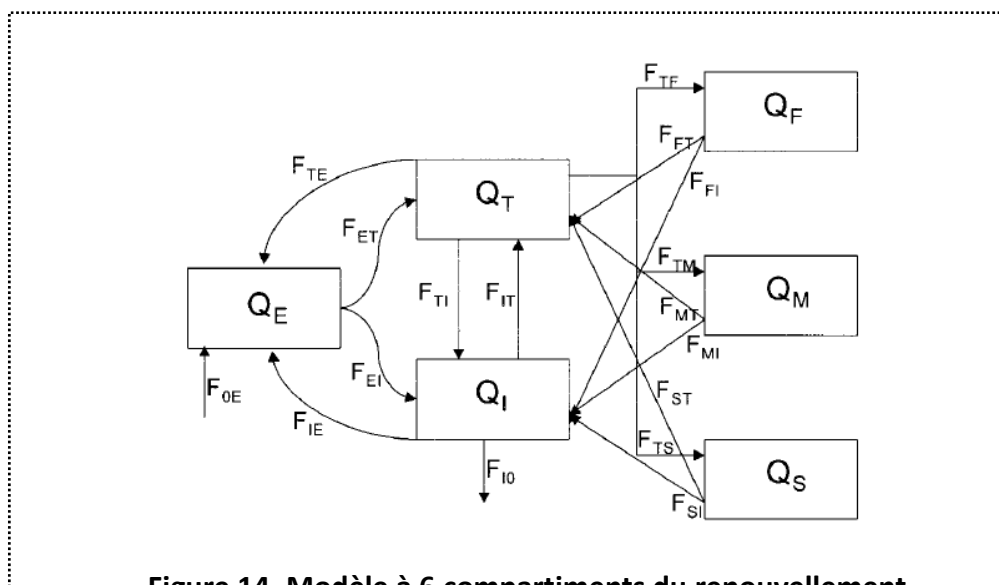


Figure 14. Modèle à 6 compartiments du renouvellement protéique chez la souris.

QE, QI et QT représentent respectivement les pools d'AA extracellulaires (plus plasma), d' AA intracellulaires et d' aminoacyl-ARNt ; QF, QM, QS représentent des pools protéiques à renouvellement rapide, moyen et lent ; FIT représente le flux de leucine depuis le pool intracellulaire vers le pool des aminoacyl-ARNt ; FET représente le flux de leucine depuis le pool extracellulaire vers le pool des aminoacyl-ARNt (« channeling ») ; FTF, FTM, FTS représentent respectivement les flux d'AA depuis le pool des aminoacyl-ARNt vers les pools protéiques à renouvellement rapide, moyen et lent, c.-à-d. les flux de synthèse protéique ; FFT, FMT, FST représentent respectivement les flux d'AA issus de la dégradation protéique à partir des pools protéiques à renouvellement rapide, moyen et lent, vers le pool des aminoacyl-ARNt (« recycling »); FIO représente le flux de leucine oxydée depuis le pool intracellulaire.

D'après Johnson et al. (1999)

Les modèles globaux du métabolisme azoté, distinguant plusieurs tissus, sont peu nombreux chez l'homme, en raison de la difficulté d'accès expérimental aux différents pools métaboliques. Des modèles multi-compartimentaux ont néanmoins été développés pour étudier le devenir spécifique de l'azote alimentaire en phase postprandiale non stationnaire chez l'homme (Fouillet *et al.* 2003; Fouillet *et al.* 2000; Fouillet *et al.* 2009; Fouillet *et al.* 2002b). Ces modèles, qui distinguent 2 compartiments protéiques sur la base de leur vitesse de renouvellement (lente pour les P périphériques et rapide pour les P splanchniques), simulent les flux postprandiaux d'azote alimentaire à travers les sous-systèmes absorbif (compartiments du TGI), constitutif (AA et P splanchniques, plasmatiques et périphériques, et urée plasmatique) et d'élimination (effluents iléaux et urée et ammoniacque urinaire) (Figure 15). Les flux d'azote entre compartiments sont estimés à partir de données expérimentales (cinétiques isotopiques mesurées dans certains compartiments accessibles après l'ingestion de repas constitués de P marquées au ^{15}N).

Ces modèles ont notamment permis d'évaluer les effets de la qualité et de la quantité des P alimentaires sur la rétention, la distribution et l'incorporation postprandiales de l'azote alimentaire dans les protéines périphériques et splanchniques constitutives et exportées. Ces informations, qui ont fortement contribué à améliorer la compréhension de la modulation des flux azotés d'origine alimentaire en phase postprandiale, ne peuvent cependant être extrapolées ni à l'azote endogène ni à la phase postabsorptive.

Nous avons montré à travers cette partie que de nombreuses méthodes ont été développées pour l'estimation des flux azotés. La forte diversité des méthodes existantes, malgré l'utilisation prépondérante de traceurs isotopiques, est liée à la diversité des systèmes d'études et des flux métaboliques impliqués dans le métabolisme des AA et P. Une technique particulière est souvent associée à la mesure d'un type spécifique de flux azoté : par exemple, le marquage d'azote alimentaire pour l'estimation des flux au niveau du TGI, le marquage de l'urée pour la détermination des flux de recyclage, le marquage des AA pour la mesure des flux de SP et DP, les techniques de cathétérisme artério-veineux pour les mesures de bilans d'organes... Ces données mettent en évidence la forte compartimentation du métabolisme azoté, mais également la complexité des nombreux transferts d'azote entre les différents tissus et zones. L'ensemble de ces flux implique une étroite collaboration entre les différents pools métaboliques et est nécessairement finement régulé à l'échelle de l'organisme afin de maintenir l'homéostasie protéique malgré des modulations des conditions nutritionnelles et / ou physio-pathologiques.

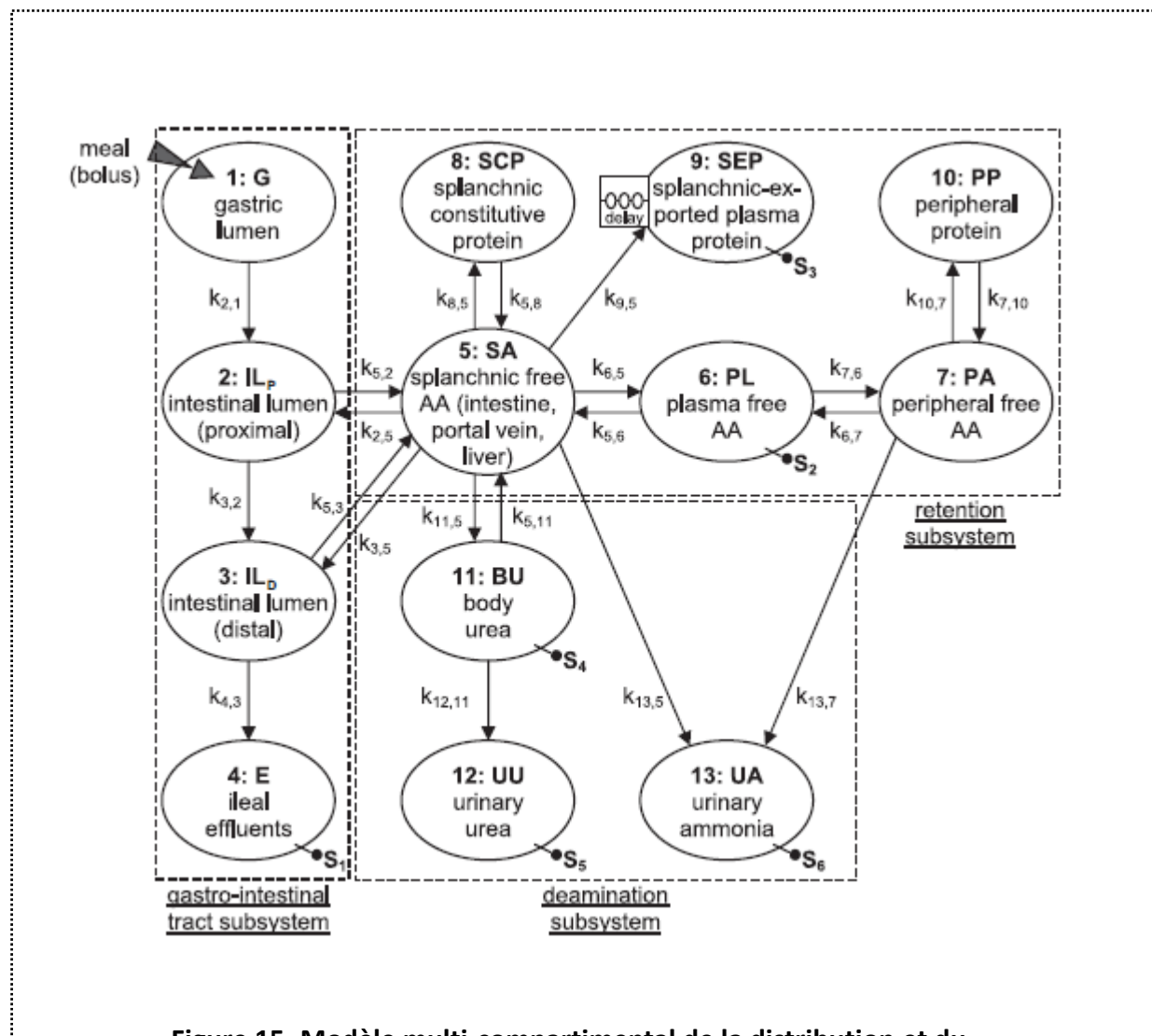


Figure 15. Modèle multi-compartmental de la distribution et du métabolisme de l'azote alimentaire en phase postprandiale chez l'homme.

D'après Fouillet et al. (2009)

II. Régulations et modulations nutritionnelles et physio-pathologiques des flux azotés dans l'organisme

Les flux azotés décrits précédemment sont régulés et modulés de manière coordonnée à l'échelle de l'organisme, d'une part à court terme, en réponse à la discontinuité de l'apport alimentaire, et d'autre part à plus long terme, afin de s'adapter à des modifications des conditions nutritionnelles ou physio-pathologiques. Nous montrerons dans un 1^{er} temps comment les flux azotés sont modulés, à court terme, lors de l'alternance des phases postprandiale et postabsorptive afin de maintenir un bilan azoté globalement neutre sur 24h, en mettant en avant l'implication de la régulation par les AA et l'insuline. Puis nous présenterons des modulations à plus long terme des flux métaboliques en réponse à des variations des conditions nutritionnelles et physio-pathologiques, à travers des exemples de modulations fines et adaptatives induites par des variations qualitatives ou quantitatives de l'apport alimentaire en P ou de modulations plus sévères ou pré-pathologiques induites par un stress nutritionnel ou un syndrome métabolique (associant insulino-résistance et obésité).

II.1. Variabilité temporelle et régulation homéostatique à court terme des flux azotés

II.1.i. Variations nycthémérales des flux azotés

L'apport alimentaire au cours du nycthémère est discontinu, avec une alternance de phases postprandiales ou absorptives, suivant l'ingestion d'un repas, et postabsorptives ou interprandiales, correspondant à un état de jeûne. En raison de cette discontinuité des apports, le système métabolique est perpétuellement à l'état non-stationnaire et alterne entre des situations de réplétion et de mobilisation des réserves. Cependant, le bilan azoté moyen sur 24h est maintenu nul grâce à l'alternance et l'enchaînement coordonnés de processus anaboliques et cataboliques dans les différents tissus, qui impliquent des variations plus ou moins bien identifiées des différents flux azotés (Tableau 5). La mise en place de cette dynamique complexe du métabolisme des AA et des P, basée sur des processus homéodynamiques, assure le maintien de l'homéostasie azotée.

Variations des cinétiques protéiques à l'échelle corps entier

Le bilan azoté varie selon un cycle quotidien suivant l'alternance des phases postabsorptive et postprandiale : pendant la phase postabsorptive, le bilan azoté est négatif du fait de l'existence de pertes obligatoires liées aux besoins métaboliques, mais devient positif en phase postprandiale grâce à l'apport en P alimentaires qui permet la réplétion des pertes protéiques postabsorptives et une déposition protéique nette (Millward 2000). Les différentes études mesurant les flux de SP et DP et d'oxydation des AA à l'échelle corps entier chez l'homme s'accordent sur le fait que l'oxydation des AA est fortement augmentée en phase postprandiale par rapport à la phase postabsorptive (Waterlow 2006; De Feo 1998; Arnal *et al.* 1987), avec une élévation souvent supérieure à 50%. Cette augmentation de l'oxydation serait directement liée à une augmentation de la taille du pool d'AA et serait donc dose-dépendante. À l'inverse les mécanismes responsables de l'augmentation de l'anabolisme protéique en phase postprandiale ne sont pas clairement établis. En effet, certaines études montrent que le dépôt de P en

Tableau 5. Variations nyctémérales des flux azotés lors du passage de la phase postabsorptive à la phase postprandiale.

Cinétiques corps entier

↗ oxydation	Waterlow <i>et al.</i> , 2006 ; DeFeo <i>et al.</i> , 1998 ; Arnal <i>et al.</i> , 1987 ; McNurlan <i>et al.</i> , 1989
↘ DP	Motil <i>et al.</i> , 1981 ; Melville <i>et al.</i> , 1989 ; Bouteloup <i>et al.</i> , 1998 ; Garlick <i>et al.</i> , 1991
↗ SP	Pacy <i>et al.</i> , 1994 ; Collin-vidal <i>et al.</i> , 1994 ; El-Khoury <i>et al.</i> , 1995 ; Volpi <i>et al.</i> , 1996 ; Forslund <i>et al.</i> , 1998 ; Boirie <i>et al.</i> , 1997b ; Yuan <i>et al.</i> , 2008

Cinétiques tissulaires

Dans le foie :

↗ SP totales	Chevalier <i>et al.</i> , 2010 ; Mosoni <i>et al.</i> , 1995 ; Yuan <i>et al.</i> , 2008
= SP totales	Chevalier <i>et al.</i> , 2009 ; Garlick <i>et al.</i> , 1973
↗ SP exportées	DeFeo <i>et al.</i> , 1992 ; Cayol <i>et al.</i> , 1997 ; Barber <i>et al.</i> , 200 ; Hunter <i>et al.</i> , 1995
↘ DP totales	Garlick <i>et al.</i> , 1973 ; Chevalier <i>et al.</i> , 2010

Dans l'intestin :

↗ SP	Yu <i>et al.</i> , 1990 ; Chevalier <i>et al.</i> , 2009
= SP	Bouteloup-Demange <i>et al.</i> , 1998.

Dans le muscle :

↗ SP	Chevalier <i>et al.</i> , 2010 ; Baillie & Garlick, 1991 ; Garlick <i>et al.</i> , 1973 ; Mosoni <i>et al.</i> , 1995 ; Yuan <i>et al.</i> , 2008 ; Rennie <i>et al.</i> , 1982 ; Tessari <i>et al.</i> , 1996 ; Cheng <i>et al.</i> , 1987.
= SP	McNurlan <i>et al.</i> , 1993 ; Baillie & Garlick, 1992 ; Chevalier <i>et al.</i> , 2009
↘ DP	Tessari <i>et al.</i> , 1996 ; Cheng <i>et al.</i> , 1987

Dans la peau :

↗ SP	Zhang <i>et al.</i> , 1998
↗ DP	Zhang <i>et al.</i> , 1998

Bilans nets tissulaires d'AA¹

Dans le muscle :

< 0 (PA) → > 0 (PP)	Tessari <i>et al.</i> , 2000 ; Luiking <i>et al.</i> , 2011
↗ prélèvement AACR	Tessari <i>et al.</i> , 2000 ; Luiking <i>et al.</i> , 2011
= libération AAG	Luiking <i>et al.</i> , 2011 ; Remesy <i>et al.</i> , 1997 ; Tessari <i>et al.</i> , 2000 ; Elia <i>et al.</i> , 1989

Dans la zone splanchnique :

> 0 (PA) → < 0 (PP)	Capaldo <i>et al.</i> , 1999
↗ libération AACR	Felig <i>et al.</i> , 1975 ; Barrett <i>et al.</i> , 1986 ; Yu <i>et al.</i> , 1990
= prélèvement AAG	Barrett <i>et al.</i> , 1986 ; Bloomgarden <i>et al.</i> , 1981

Flux d'urée

= production	El-Khoury <i>et al.</i> , 1996 ; Waterlow <i>et al.</i> , 1999
↘ hydrolyse et recyclage	El-Khoury <i>et al.</i> , 1996 ; Waterlow <i>et al.</i> , 1999
↗ excrétion	El-Khoury <i>et al.</i> , 1996 ; Beliveau-Carey <i>et al.</i> , 1993

P, protéines ; SP, synthèse protéique; DP, dégradation protéique; AACR, acides aminés à chaîne ramifiée ; AAG, acides aminés glucoformateurs ; PA, phase postabsorptive ; PP, phase postprandiale ; ↗, augmentation ; ↘, diminution ¹un bilan positif (>0) correspond à un prélèvement net alors qu'un bilan négatif (<0) correspond à une libération nette d'AA par le tissu.

phase nourrie est due à une diminution de DP (Motil *et al.* 1981; Bouteloup-Demange *et al.* 1998; Melville *et al.* 1989), alors que d'autres mettent également en évidence une augmentation de SP (Pacy *et al.* 1994; Collin-Vidal *et al.* 1994; El-Khoury *et al.* 1995; Volpi *et al.* 1996; Forslund *et al.* 1998; Boirie *et al.* 1997b; Yuan *et al.* 2008) (Figure 16). Ces différences pourraient s'expliquer par la forme de l'apport azoté, un apport sous la forme d'un repas unique stimulant la SP, contrairement à un apport continu (Waterlow 2006).

Variations des FSR tissulaires

Le gain protéique net global observé pendant la phase postprandiale n'est pas réparti de manière uniforme sur les différents tissus, et la participation de la zone splanchnique à cette accréation protéique totale serait majoritaire par rapport à la contribution de la zone périphérique. Chez le chien recevant une perfusion intra-gastrique constante d'AA, il a été mis en évidence une augmentation de la contribution de la région splanchnique à la SP corporelle totale de 22% à 73% lors du passage de la phase postabsorptive à la phase postprandiale, ainsi qu'une augmentation de la contribution à l'oxydation totale de 13% à 41% (Yu *et al.* 1990). Cependant, les variations des cinétiques métaboliques tissulaires au cours du nyctémère sont mal établies et les données disponibles sont souvent contradictoires.

Au niveau hépatique, peu de données sont disponibles chez l'homme concernant la modulation des FSR à l'état nourri en raison de la difficulté d'accès aux P hépatiques constitutives. Concernant les P hépatiques exportées, plusieurs études ont rapporté une augmentation de 20 à 90% du FSR de l'albumine après l'ingestion d'un repas (De Feo *et al.* 1991; Cayol *et al.* 1997; Barber *et al.* 2000; Hunter *et al.* 1995) sans variation du FSR du fibrinogène. Chez le rat, les résultats des études sont contradictoires, certaines rapportant une augmentation de 8 à 40% de la SP hépatique totale en phase nourrie (Chevalier *et al.* 2010; Mosoni *et al.* 1995; Yuan *et al.* 2008) alors que d'autres ne mettent pas en évidence de différence du FSR hépatique entre les phases postabsorptive et postprandiale (Chevalier *et al.* 2009; Garlick *et al.* 1973). Par ailleurs, les résultats de plusieurs études suggèrent que la DP hépatique pourrait être inhibée pendant la phase nourrie (Garlick *et al.* 1973; Chevalier *et al.* 2010). La façon dont l'état nutritionnel module la SP dans la muqueuse intestinale est également mal définie : il semble que chez l'homme la SP intestinale ne soit pas modifiée après l'ingestion d'un repas (Bouteloup-Demange *et al.* 1998), contrairement à chez l'animal où une augmentation de la SP est observée en phase nourrie vs à jeun (Chevalier *et al.* 2009; Yu *et al.* 1990).

En ce qui concerne le muscle, la majorité des études chez l'homme (Rennie *et al.* 1982; Tessari *et al.* 1996b; Cheng *et al.* 1987) et l'animal (Chevalier *et al.* 2010; Baillie & Garlick 1991; Garlick *et al.* 1973; Mosoni *et al.* 1995; Yuan *et al.* 2008) mettent en évidence une augmentation de la SP lors du passage de la phase PA à la phase PP variant de 20 à 100%, bien que dans certaines études la SP musculaire ne soit pas ou très peu modifiée entre ces 2 phases (McNurlan *et al.* 1993; Baillie & Garlick 1992; Chevalier *et al.* 2009). D'après les quelques études ayant concomitamment mesuré les modulations de la DP et de la SP, l'ingestion d'un repas induirait une déposition protéique musculaire nette à la fois en inhibant fortement DP et en stimulant SP (Cheng *et al.* 1987; Tessari *et al.* 1996b).

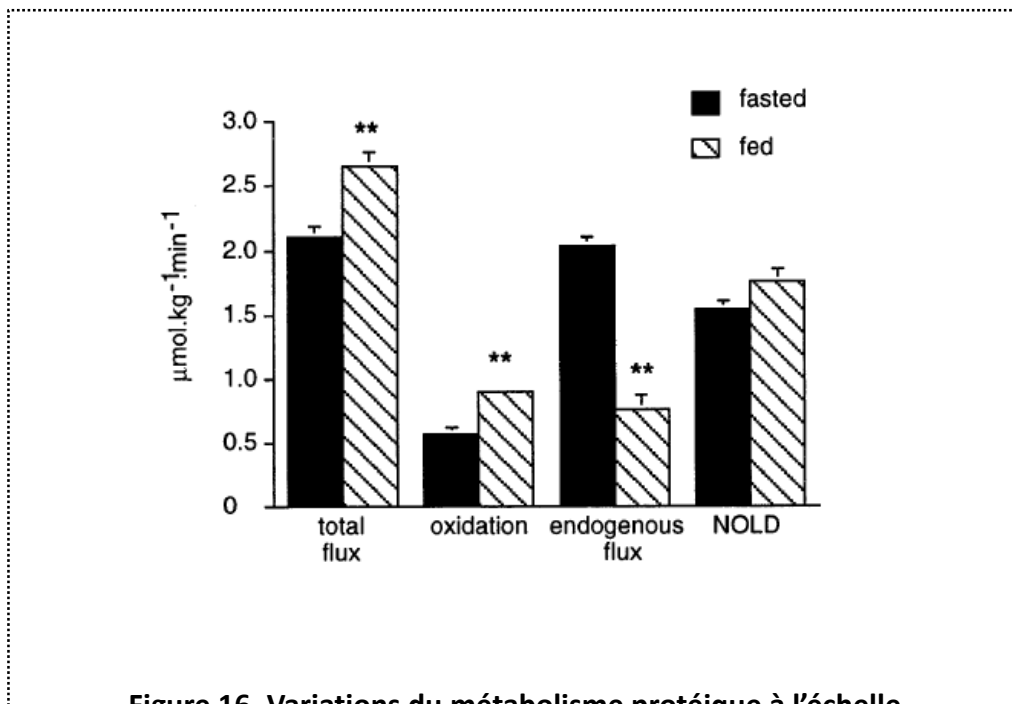


Figure 16. Variations du métabolisme protéique à l'échelle corps-entier lors des phases postabsorptive et postprandiale.

Le taux de renouvellement corporel total (total flux) et les flux corporels d'oxydation, de dégradation protéique (endogenous flux) et d'utilisation pour les synthèses protéiques (NOLD) ont été mesurés en phase postabsorptive (fasted) et à l'état nourri (fed). Les valeurs rapportées correspondent aux flux corporels totaux de leucine estimés lors d'une perfusion continue de ¹³C- leucine.

→ A l'état nourri, au niveau corps-entier, l'oxydation des AA est augmentée et la dégradation protéique est diminuée.

D'après Bouteloup-Demange et al. (1998)

Contrairement au muscle, la masse protéique de la peau serait peu sensible à l'état nutritionnel, les taux de SP et DP étant fortement corrélés et augmentant conjointement lors du passage de la phase PA à la phase PP. Ceci serait dû à une réutilisation préférentielle pour SP des AA issus de la DP par rapport aux AA alimentaires (Zhang *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2003).

Variations des échanges d'AA entre tissus

Les échanges inter-organes d'AA sont également modifiés lors du passage de l'état postabsorptif à l'état nourri. Globalement, les études de bilan d'AA réalisées en phase postabsorptive chez l'homme et l'animal montrent l'existence d'un flux net d'AA du muscle vers la circulation systémique, ces AA étant majoritairement captés par la région splanchnique. En phase postprandiale, ce flux est inversé : la zone splanchnique passe d'un bilan net positif d'AA (prélèvement net) à un bilan net négatif et libère ainsi 30 à 40% des AA alimentaires vers la zone périphérique (Capaldo *et al.* 1999), alors que le flux net d'AA devient positif dans le muscle (Tessari & Garibotto 2000; Luiking *et al.* 2011) (Figure 17). Plus spécifiquement, le passage à l'état nourri, induit une libération nette par la zone splanchnique des AACR (via une diminution de l'extraction hépatique) qui sont captés par les tissus périphériques, et principalement le muscle, dans lequel ils jouent un rôle prépondérant dans la réplétion de la masse protéique en phase postprandiale (Felig 1975; Barrett *et al.* 1986; Aoki *et al.* 1976). À l'inverse, les flux nets d'AA autres que les AACR, et plus particulièrement ceux d'AAG, seraient peu modifiés. En effet, dans la zone splanchnique, l'augmentation de la libération d'AAG tels que l'alanine et la glycine est accompagnée d'une augmentation identique du prélèvement de ces AA par le foie, ce qui se traduit par un flux net inchangé d'AAG entre les 2 phases (Barrett *et al.* 1986; Bloomgarden *et al.* 1981). Les tissus périphériques continuent à relâcher des AAG, et principalement la glutamine et l'alanine (Luiking *et al.* 2011), qui sont utilisés respectivement par l'intestin et le rein, et par le foie, de la même manière qu'en phase PA (Remesy *et al.* 1997; Tessari 2000; Elia *et al.* 1989) (Figure 18).

Variations de flux d'élimination et de recyclage de l'urée

Il est généralement admis que la quantité d'urée excrétée varie de manière cyclique au cours de la journée, suivant l'apport alimentaire : elle est augmentée pendant la phase postprandiale et diminue pendant la phase postabsorptive (El-Khoury *et al.* 1996; Beliveau Carey *et al.* 1993). L'amplitude de ces variations est augmentée lors d'une augmentation du niveau d'apport protéique (Price *et al.* 1994; Quevedo *et al.* 1994; Waterlow 1999) (Figure 19). À l'inverse la quantité d'urée produite est relativement stable au cours d'un nyctémère et par conséquent la quantité d'urée hydrolysée varie de façon inverse à la quantité d'urée excrétée, étant plus faible pendant la phase nourrie que pendant la phase de jeûne (Waterlow 1999; El-Khoury *et al.* 1996).

II.1.ii. Régulation du métabolisme azoté par les AA et l'insuline

Le maintien de l'homéostasie azotée à court terme (sur 24h) est le résultat d'interactions complexes entre les effets des substrats (AA) et de plusieurs hormones (principalement l'insuline) sur les flux d'azote, notamment SP et DP mais également les voies de mise à disposition (transports d'AA) et d'élimination (oxydation) des AA. L'arrivée des nutriments en phase postprandiale provoque une

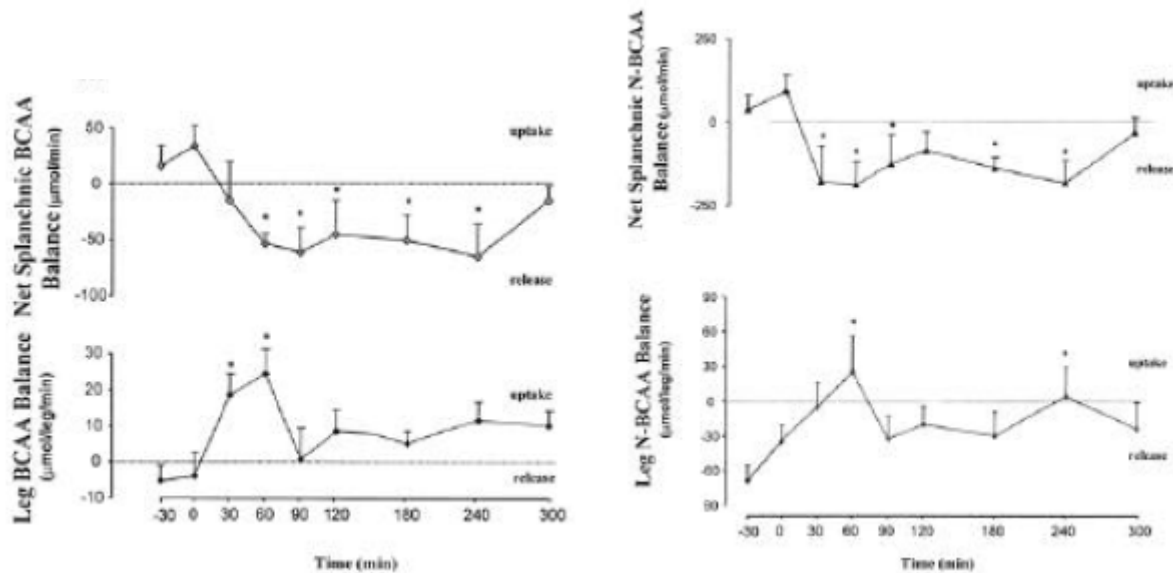


Figure 17. Bilans splanchniques et musculaires des acides aminés ramifiés (BCAA) et non ramifiés (N-BCAA) avant et après l'ingestion d'un repas mixte chez l'homme.

Les valeurs positives de bilan correspondent à un prélèvement net d'AA (uptake) et à l'inverse, les valeurs négatives correspondent à une libération nette (release).

→ Suite à l'ingestion d'un repas, le bilan net d'AA s'inverse dans la zone splanchnique qui libère des AA ramifiés et non ramifiés. Le muscle, qui a un bilan nul par rapport aux AA ramifiés en phase postabsorptive, prélève des AA ramifiés en phase nourrie et diminue sa libération d'AA non ramifiés.

D'après Capaldo et al. (1999)

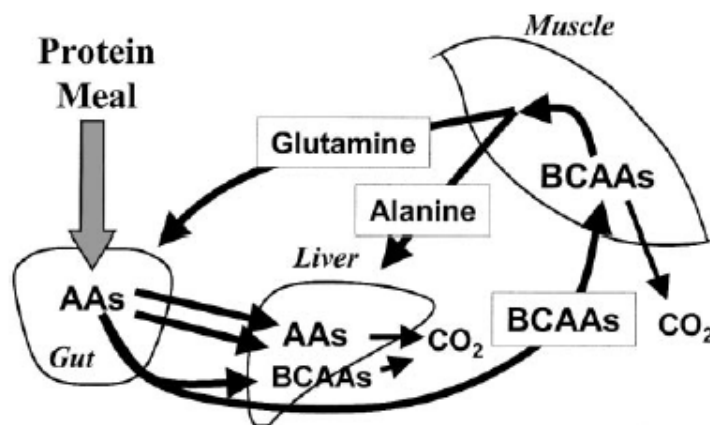


Figure 18. Modulation des échanges d'AA entre la zone splanchnique et le muscle lors de l'ingestion d'un repas.

→ Suite à l'ingestion d'un repas, les AA alimentaires (AAs) sont extraits en quantités importantes par la zone splanchnique, à l'exception des AACR (BCAAs) qui sont libérés dans la circulation systémique. Les AACR sont captés par le muscle qui continue à relâcher la glutamine et l'alanine.

D'après Matthews et al. (2005)

hyperaminoacidémie (**HA**) et une hyperinsulinémie (**HI**) transitoires qui participent au contrôle de ces différents flux d'AA.

L'effet spécifique de l'HA a été étudié par la comparaison de l'état postabsorptif à l'administration orale d'un mélange d'AA ou de P (Anthony *et al.* 2000a; Anthony *et al.* 2001a; Anthony *et al.* 2001b; Scornik *et al.* 1997; Volpi *et al.* 1999; Tipton *et al.* 1999; Nagasawa *et al.* 2002) ou à la perfusion intraveineuse d'AA (Mosoni *et al.* 1993; Fryburg *et al.* 1995; Volpi *et al.* 1998; Sheffield-Moore *et al.* 2000; Bennet *et al.* 1990b; Biolo & Tessari 1997) (Tableau 6). Concernant l'effet spécifique de l'HI, les données ont été obtenues de différentes manières : la majorité des études compare l'état postabsorptif à la perfusion d'insuline par voie intraveineuse avec des doses variables (Biolo *et al.* 1995a; Meek *et al.* 1998; Ahlman *et al.* 2001; De Feo *et al.* 1993; McNurlan *et al.* 1994; Tessari *et al.* 1991; Gelfand & Barrett 1987; Zanetti *et al.* 1999; Hillier *et al.* 1998), certaines études comparent l'état postabsorptif à l'ingestion d'un repas glucidique ou protéoprive (Anthony *et al.* 2000a; Yoshizawa *et al.* 1998; Volpi *et al.* 1996) et d'autres comparent des sujets diabétiques de type I traités ou non traités à l'insuline (Nair *et al.* 1995; Pacy *et al.* 1989)(Tableau 7).

Les tissus splanchniques sont à la fois particulièrement exposés à l'HA postprandiale, en raison de leur interposition entre le site d'absorption des AA alimentaires et les tissus périphériques, et à l'HI postprandiale, du fait que la majorité de l'insuline sécrétée dans la veine porte est extraite par le foie. Cependant, l'effet d'une HA et/ou d'une HI sur ces tissus n'est pas clairement établi, les données étant souvent contradictoires. Ainsi selon les études, l'HA diminuerait la dégradation des P hépatiques (Scornik *et al.* 1997; Mortimore *et al.* 1987), et augmenterait (Scornik *et al.* 1997; Shah *et al.* 1999) ou ne modifierait pas la SP hépatique (Anthony *et al.* 2001a; Mosoni *et al.* 1993). En ce qui concerne l'effet spécifique de l'HI, elle stimulerait la SP de l'albumine (De Feo *et al.* 1993; Volpi *et al.* 1996) et selon les études, diminuerait (Meek *et al.* 1998; Nair *et al.* 1995) ou ne modifierait pas (Ahlman *et al.* 2001; Yoshizawa *et al.* 1998) la SP hépatique totale.

Au niveau musculaire, les rôles respectifs et conjoints de HA et HI sont mieux identifiés, car des études plus nombreuses, basées sur l'utilisation couplée d'AA traceurs avec des techniques de cathétérisme artériovoineux et des modèles à 3 compartiments du métabolisme protéique musculaire, ont permis de détailler les effets de l'HA et l'HI sur les flux de SP et DP et les flux d'échanges d'AA entre plasma et tissus. Il est ainsi bien établi que l'HA induit une augmentation de SP sans affecter DP (Fryburg *et al.* 1995; Volpi *et al.* 1998; Sheffield-Moore *et al.* 2000; Bennet *et al.* 1990b; Biolo *et al.* 1997; Volpi *et al.* 1999; Tipton *et al.* 1999; Carroll *et al.* 2005) (Figure 20). La stimulation de SP serait liée à l'augmentation de la disponibilité des AA précurseurs et l'augmentation des flux de transport des AA vers le compartiment intracellulaire (Volpi *et al.* 1998; Volpi *et al.* 1999; Zanetti *et al.* 1999) (Figure 21). Les AACR, et notamment la leucine, semblent être les médiateurs principaux de l'effet de l'HA, puisque la perfusion de leucine seule (vs de valine ou d'isoleucine) suffit à induire l'augmentation de la SP musculaire (Anthony *et al.* 2000a; Anthony *et al.* 2000b). A l'inverse, l'HI améliore le bilan net d'AA et favorise l'anabolisme protéique, vraisemblablement en inhibant DP plutôt qu'en stimulant SP (Figure 22). En effet, la majorité des études montrent une diminution de DP dans le muscle suite à la perfusion

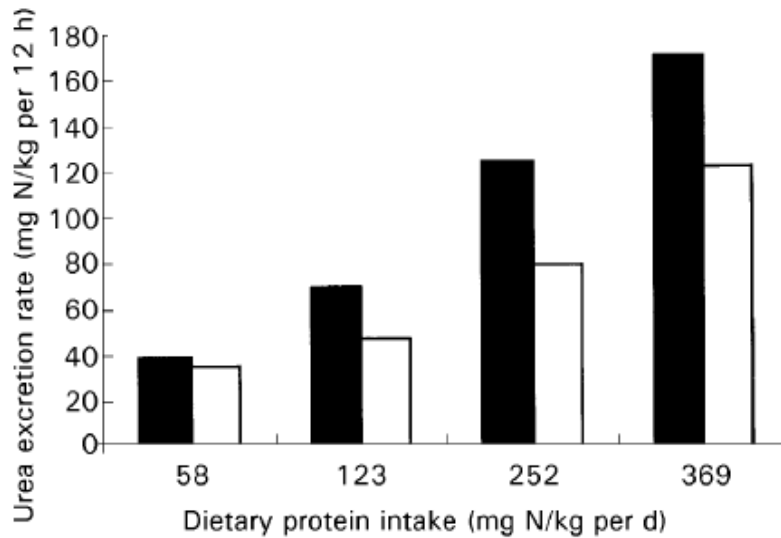


Figure 19. Variations de l'excrétion urinaire lors des phases postabsorptive et postprandiale en fonction du niveau d'apport protéique.

→ La quantité d'urée excrétée est plus élevée pendant la phase postprandiale (barres noires) que pendant la phase postabsorptive (barres blanches). La quantité de protéines ingérées modifie l'amplitude de la différence entre les quantités d'urée excrétée en phases postabsorptive et postprandiale, avec une augmentation supérieure de l'excrétion à l'état nourri par rapport à l'état de jeûne.

D'après Waterlow (1999)

d'insuline (Meek *et al.* 1998; Ahlman *et al.* 2001; Gelfand & Barrett 1987; Nair *et al.* 1995; Zanetti *et al.* 1999; Bennet *et al.* 1990a; Hillier *et al.* 1998). Les résultats concernant les effets de l'HI sur la SP sont plus partagés, avec, selon les études, aucun effet (Meek *et al.* 1998; McNurlan *et al.* 1994; Nair *et al.* 1995; Gelfand & Barrett 1987; Pacy *et al.* 1989; Anthony *et al.* 2000a; Yoshizawa *et al.* 1998; Zanetti *et al.* 1999) ou une stimulation (Biolo *et al.* 1995a; Bennet *et al.* 1990a; Hillier *et al.* 1998). Les résultats différents obtenus selon les études concernant l'effet de l'HI sur la modulation de SP pourraient être liés aux différentes doses d'insuline perfusées (Hillier *et al.* 1998) et/ou à l'effet hypoaminoacidémiant de l'insuline qui limiterait la disponibilité des AA pour la SP (Rooyackers & Nair 1997).

Globalement, à l'échelle corps entier, l'HA postprandiale stimule l'anabolisme protéique en stimulant la SP, principalement au niveau musculaire, et en inhibant la DP, essentiellement dans la zone splanchnique, alors que l'effet stimulateur de l'insuline sur les SP n'est pas ou peu mis évidence dans le cas d'une HI isolée. En revanche, l'action combinée de l'HA et de l'HI induirait une augmentation plus importante de la SP corporelle totale que l'HA seule, ce qui suggère un effet d'interaction entre HI et HA, l'HI étant susceptible d'augmenter la stimulation de SP en modulant son efficacité (Kimball *et al.* 2002). L'effet de l'HI postprandiale semble largement dépendante des concentrations plasmatiques d'AA et est par conséquent difficile à isoler de l'effet de l'HA postprandiale. Réciproquement, un niveau minimal d'insuline serait nécessaire pour permettre la stimulation de la SP par l'HA (Kimball *et al.* 2002). Par ailleurs, l'HI serait associée à une diminution des transaminations et de l'oxydation des AA, et ce de manière plus importante dans le muscle que dans la zone splanchnique (Meek *et al.* 1998; Nair *et al.* 1995). Le muscle étant le site majeur des désaminations des AACR, leur utilisation pour la SP serait favorisée par une diminution de leur désamination. Ainsi, en limitant les processus de désamination et de transamination, l'insuline favoriserait la biodisponibilité des AA, et notamment des AACR dans le muscle, et par conséquent l'anabolisme protéique (Meek *et al.* 1998). Enfin des études plus récentes ont montré que l'insuline augmente le débit sanguin et le recrutement des capillaires dans le muscle via une action sur les cellules endothéliales (Rattigan *et al.* 2007), et suggèrent que son effet anabolique serait en partie lié à sa capacité à augmenter l'alimentation en AA du muscle par la circulation systémique (Fujita *et al.* 2006; Timmerman *et al.* 2010).

En conclusion, la succession naturelle de périodes de réplétion et de mobilisation des réserves semble assurer le renouvellement, le remodelage et le maintien à moyen et à long terme des pools protéiques de l'organisme. L'ensemble des données disponibles souligne le fait que le maintien de l'homéostasie des AA et des P, au cours de l'alternance de phases de jeûne et d'alimentation, requière la mise en place d'un jeu des modulations complexes, mais nécessairement coordonnées, des différents flux métaboliques, dont les régulations spatiales et temporelles sont encore largement méconnues en raison du nombre très restreint d'études réalisées à un niveau intégré.

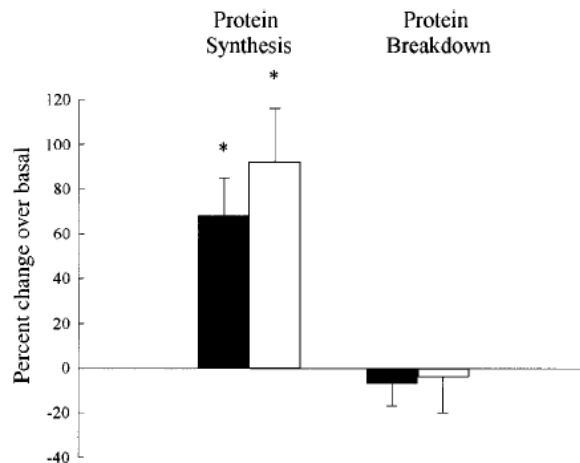


Figure 20. Variations des flux de synthèse (SP) et dégradation (DP) protéiques musculaires en réponse à une hyperaminoacidémie.

Les flux de SP et DP ont été mesurés chez des sujets jeunes (barres noires) et âgés (barres blanches) après l'administration orale d'AA. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales.

→ L'hyperaminoacidémie induit une augmentation de la SP musculaire mais ne modifie pas la DP.

D'après Volpi et al. (1999)

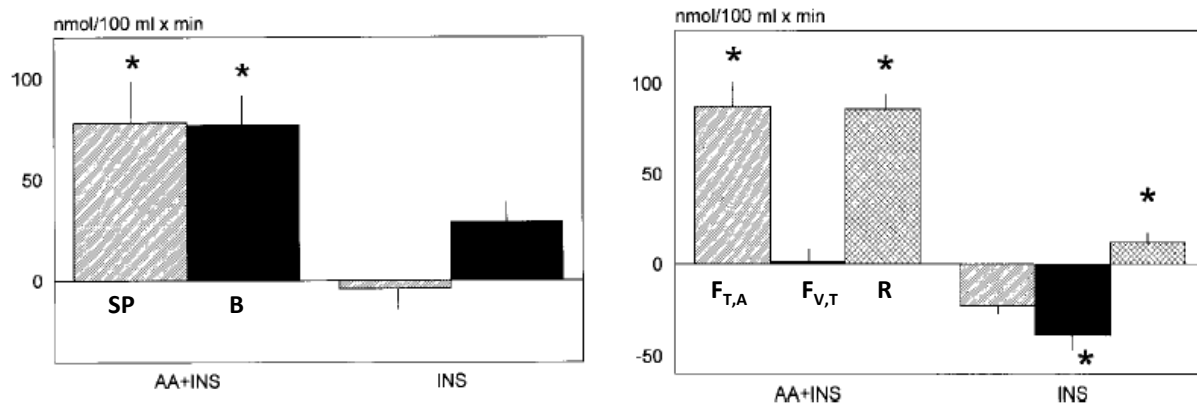


Figure 21. Variations des flux musculaires de leucine en réponse à une hyperinsulinémie seule ou associée à une hyperaminoacidémie.

SP représente le flux d'utilisation de la leucine pour les synthèses protéiques musculaire, B son bilan net, $F_{T,A}$ le flux de leucine du plasma vers le muscle, $F_{V,T}$ le flux de libération de leucine du muscle vers le plasma, et R la rétention nette de leucine. Les flux ont été mesurés après la perfusion d'insuline seule (INS) ou accompagnée d'un mélange d'AA riche en AACR (AA+INS).

→ Au niveau musculaire, l'hyperaminoacidémie associée à une hyperinsulinémie induit une augmentation de la SP et une augmentation du flux de transport des AA vers le pool intracellulaire.

D'après Zanetti et al. (1999)

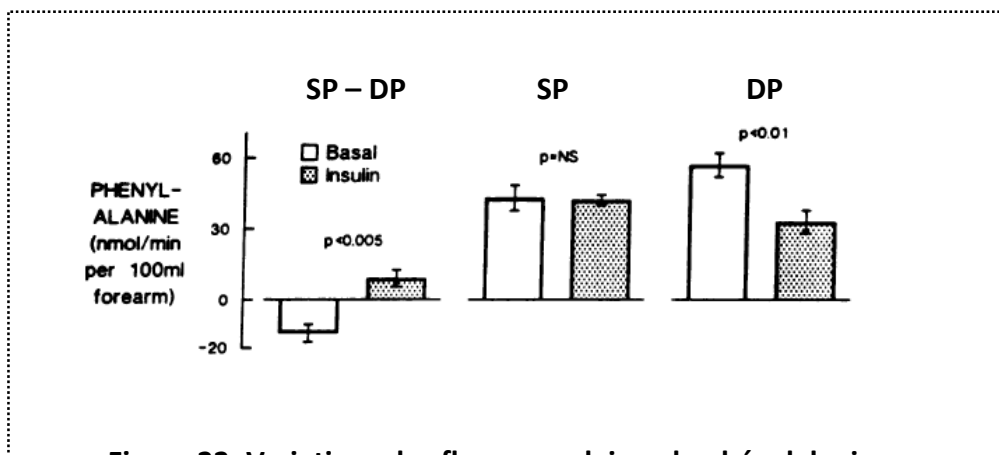


Figure 22. Variations des flux musculaires de phénylalanine en réponse à une hyperinsulinémie.

SP, synthèse protéique; DP, dégradation protéique.

→ Au niveau musculaire, l'hyperinsulinémie induit une inversion du bilan net d'AA, qui passe d'une libération nette à un prélèvement net, en diminuant la DP mais sans affecter la synthèse protéique.

D'après Gelfand et al. (1987)

Tableau 6. Effet d'une hyperaminoacidémie sur les cinétiques protéiques

Foie		
SP	↗	Scornick <i>et al.</i> , 1997 ; Shah <i>et al.</i> , 1999
	=	Anthony <i>et al.</i> , 2001a; Moson <i>et al.</i> , 1993
DP	↘	Scornick <i>et al.</i> , 1997; Mortimore <i>et al.</i> , 1987
Muscle		
SP	↗	Fryburg <i>et al.</i> , 1995; Volpi <i>et al.</i> , 1998; Sheffield-Moore <i>et al.</i> , 2000; Bennet <i>et al.</i> , 1990b; Biolo <i>et al.</i> , 1997; Volpi <i>et al.</i> , 1999; Tipton <i>et al.</i> , 1999 ; Carroll <i>et al.</i> , 2005
DP	=	Volpi <i>et al.</i> , 1998; Sheffield-Moore <i>et al.</i> , 2000; Bennet <i>et al.</i> , 1990b; Biolo <i>et al.</i> , 1997; Volpi <i>et al.</i> , 1999; Tipton <i>et al.</i> , 1999 ; Carroll <i>et al.</i> , 2005

P, protéines; SP, synthèse protéique; DP, dégradation protéique; ↗, augmentation; ↘, diminution.

Tableau 7. Effet d'une hyperinsulinémie sur les cinétiques protéiques

Corps entier		
SP	↘	De Feo <i>et al.</i> , 1993 ; Nair <i>et al.</i> , 1995
	=	Volpi <i>et al.</i> , 1996
	↗	Bennet <i>et al.</i> , 1990a
DP	↘	Nair <i>et al.</i> , 1995 ; Bennet <i>et al.</i> , 1990a
	=	Volpi <i>et al.</i> , 1996
Foie		
SP totales	↘	Meek <i>et al.</i> , 1998; Nair <i>et al.</i> , 1995
	=	Ahlman <i>et al.</i> , 2001; Yoshizawa <i>et al.</i> , 1998
SP albumine	↗	De Feo <i>et al.</i> , 1993; Volpi <i>et al.</i> , 1996
SP fibrinogène	↘	Ahlman <i>et al.</i> , 2001; De Feo <i>et al.</i> , 1993
	=	Volpi <i>et al.</i> , 1996
Muscle		
SP	=	Meek <i>et al.</i> , 1998; McNurlan <i>et al.</i> , 1994; Nair <i>et al.</i> , 1995; Gelfand <i>et al.</i> , 1987 ; Pacy <i>et al.</i> , 1989; Anthony <i>et al.</i> , 2000a; Yoshizawa <i>et al.</i> , 1998; Zanetti <i>et al.</i> , 1999
	↗	Biolo <i>et al.</i> , 1995c; Bennet <i>et al.</i> , 1990a; Hillier <i>et al.</i> , 1998
DP	↘	Meek <i>et al.</i> , 1998; Ahlman <i>et al.</i> , 2001; Gelfand <i>et al.</i> , 1987; Nair <i>et al.</i> , 1995; Zanetti <i>et al.</i> , 1999; Bennet <i>et al.</i> , 1990a; Hillier <i>et al.</i> , 1998

P, protéines; SP, synthèse protéique; DP, dégradation protéique; ↗, augmentation; ↘, diminution.

II.2. Modulations des flux azotés en réponse à des modifications quantitatives et qualitatives de l'apport en P

Dans le cas de modifications qualitatives ou quantitatives des P ingérées restant dans les limites de la couverture des besoins azotés, la modulation et la redistribution des différents flux azotés de l'organisme permettent de maintenir l'homéostasie protéique et de s'adapter à ces nouvelles conditions.

II.2.i. Effet de la qualité protéique

Estimation de la qualité d'une protéine

La qualité d'une P alimentaire recouvre sa capacité à satisfaire les besoins en AA pour la croissance et/ou le maintien de la masse protéique. Différents indices ont été développés afin d'évaluer la qualité ou valeur nutritionnelle d'une P alimentaire. Chez l'homme, les plus couramment utilisés sont : le PD-CAAS (Protein Digestibility Corrected AA Score) qui consiste à comparer la composition en AA indispensables de la P étudiée à celle d'une P de référence, tout en tenant compte de sa digestibilité (FAO/WHO 1991), la "valeur biologique" (BV) et l'indice d'utilisation (postprandiale) protéique nette (U(P)PN) (Annexe 6). Ces deux derniers indices rendent compte de la capacité d'une P alimentaire à être absorbée et à assurer le renouvellement et éventuellement le gain protéique (Bos *et al.* 2005a). Cependant, les différentes méthodes disponibles fournissent des valeurs de qualité protéique qui peuvent être très variables (Tableau 8) et ne rendent pas compte de modulations métaboliques fines telles que des modulations régionales de l'utilisation de l'N et des cinétiques protéiques. Plusieurs études chez l'homme et l'animal ont montré que l'ingestion de deux P de qualité similaire et ayant des indices d'efficacité de rétention azotée comparables, telles que les P de lait et de soja ou de lait et de colza, pouvait conduire à des modulations significativement différentes de l'utilisation régionale de l'azote alimentaire (Boutry *et al.* 2011; Lohrke *et al.* 2001; Deutz *et al.* 1998; Morens *et al.* 2003; Fouillet *et al.* 2002b).

Dans cette partie, nous présenterons les données disponibles concernant l'effet de la nature des P alimentaires sur les variations des flux métaboliques azotés à court et long terme, en s'attachant plus particulièrement aux différences induites par l'ingestion de P de lait vs soja (l'ensemble de ces données est synthétisé dans le Tableau 9). Bien que ces deux P soient de bonne qualité et permettent de satisfaire les besoins en AA lorsque leur apport est quantitativement adéquat, les P de soja sont considérées être de qualité légèrement inférieure en raison de leur plus faible digestibilité et de leur teneur inférieure en AAI (notamment en méthionine et lysine) et AACR par rapport aux P de lait (Luiking *et al.* 2011; Sarwar 1997).

Modulations des flux N dans le TGI

Les vitesses d'évacuation gastrique, de transit intestinal et d'absorption pourraient chacune être indépendamment ralenties après l'ingestion de P de lait par rapport à des P de soja (Bos *et al.* 2003; Fouillet *et al.* 2009) : la vidange gastrique des P de lait serait plus lente du fait de la précipitation des caséines à pH acide dans l'estomac, et chez le rat, le transit intestinal serait 25% plus rapide après l'ingestion de P de soja par rapport à l'ingestion de caséine, sans corrélation apparente avec la vitesse de

Tableau 8. Mesures de la qualité de différentes protéines alimentaires chez l'homme et le rat selon différents indices.

Protéine	Mesures chez l'homme			Mesures chez le rat	
	UPPN	VB	PD-CAAS	UPN	PD-CAAS
Lactosérum	67 (1)	70 (1)	100 (2)	82 (10)	100 (2)
Caséine	74 (1)	78 (1)	100 (2)	60 - 70 (10; 12; 13)	84 - 85 (2; 15)
P. de lait totales	74 - 81 (3; 4; 5)	78 - 85 (3; 4; 5)	100 (2)	62 - 76 (10; 12; 14)	74 (2)
Soja	71 - 78 (5; 6)	78 - 86 (5; 6; 7)	100 (2)	46 - 66 (10; 12; 13; 14)	62 - 76 (2; 15)
Blé	66 (8)	73 (8)		23 - 40 (10; 13; 14)	33 (15)
Colza	71 (9)	84 (9)			
Maïs					58 (15)
Poisson				83 (10)	55 (15)

U(P)PN, Utilisation (Postprandiale) Protéique Nette; VB, Valeur Biologique. Les significations et méthodes de calcul des indices sont détaillés dans l'annexe 6.

Références : (1) Lacroix et al., 2006; (2) Sarwar, 1997; (3) Bos et al., 1999; (4) Gaudichon et al., 1999; (5) Morens, et al., 2003; (6) Mariotti et al., 1999; (7) Mariotti et al., 2000; (8) Bos et al., 2005a; (9) Bos et al., 2007; (10) Miller & Bender, 1955; (11) Mitchell, 1924; (12) Lin & Huang, 1986; (13) Mokady & Zimmermann, 1969; (14) Sotelo-Lopez & Lucas-Florentino, 1978; (15) Carias et al., 1995.

vidange gastrique (Hara *et al.* 1992). Cet effet postprandial aigu joue un rôle déterminant sur les cinétiques de mise à disposition des AA alimentaires pour l'organisme. Chez l'homme, il a été montré que le transit et l'absorption plus rapide des P de soja par rapport aux P de lait au niveau intestinal, seraient associés à une apparition plus rapide des AA alimentaires dans le plasma et à une orientation plus importante de ces AA vers les voies de désamination et de SP hépatique pendant la phase postprandiale après l'ingestion de P de soja (Bos *et al.* 2003; Fouillet *et al.* 2009; Fouillet *et al.* 2002b). Ainsi, de manière plus générale, on peut distinguer deux types de P selon leur vitesse de digestion : les P rapides, telles que les P de soja ou du lactosérum, sont associées à une augmentation importante, rapide et transitoire de l'aminocidémie plasmatique et stimulent davantage le catabolisme des AA et la SP durant la phase postprandiale, alors que les P lentes comme la caséine induisent une HA moins importante mais plus prolongée et inhibent davantage la DP, favorisant ainsi la rétention azotée postprandiale (Boirie *et al.* 1997a; Dangin *et al.* 2001). Peu de données existent en revanche sur les modulations des flux de réabsorption de l'azote d'origine endogène selon les P alimentaires.

Modulations des cinétiques de production, recyclage et excrétion urinaire de l'urée

Il est bien établi que la qualité de la P alimentaire influence l'oxydation des AA hépatiques et la production d'urée (Bos *et al.* 2003; Fouillet *et al.* 2009; Fouillet *et al.* 2002b; Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2011). Plusieurs études, dont des études expérimentales comparant l'ingestion de P de soja vs de lait chez le porc et l'homme (Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2011) et des études de modélisation comparant l'ingestion de P végétales (blé, soja) vs de lait chez l'homme (Fouillet *et al.* 2008; Fouillet *et al.* 2009; Fouillet *et al.* 2002b), ont ainsi montré que l'uréogénèse postprandiale est plus importante lorsque la qualité de la P alimentaire diminue. La concentration d'urée corporelle et l'excrétion urinaire sont parallèlement augmentées lors de l'ingestion d'une P de moyenne ou mauvaise qualité (Hayase *et al.* 1980; Lohrke *et al.* 2001) ou de régimes déficients en certains AA tels que la méthionine ou la thréonine (Hayase *et al.* 1980). Ces derniers résultats suggèrent que l'augmentation de la production et de l'excrétion d'urée sont liées à une orientation préférentielle des AA hépatiques vers les voies du catabolisme lors de l'ingestion de P dont le profil en AA est moins en adéquation avec la composition du pool d'AA hépatique, l'activité des enzymes impliquées dans le cycle de l'urée n'étant pas modifiée (Hayase *et al.* 1980). Par ailleurs, le recyclage entéro-hépatique de l'urée, qui permet de récupérer une partie de l'urée produite par un effet d'épargne, serait également stimulé en parallèle lorsque la P est de mauvaise qualité et compenserait, totalement ou en partie, la plus grande production d'urée entre P végétales et de lait (Fouillet *et al.* 2008; Fouillet *et al.* 2009) (Figure 23).

Modulations de l'accrétion et du renouvellement protéique à l'échelle corps entier

Chez l'homme, Il a été montré que l'accrétion protéique totale en phase postprandiale est plus élevée après l'ingestion d'un repas contenant des P de lait que de soja. Ce meilleur bilan protéique net serait lié à une augmentation plus importante des SP lors du passage de la phase postabsorptive à la phase postprandiale après l'ingestion de P de lait, alors que la diminution de la DP serait identique avec les deux régimes (Luiking *et al.* 2005). Globalement, la nature de la P alimentaire ingérée modifierait

l'efficacité d'utilisation anabolique des AA, en fonction de la capacité de son profil en AA à favoriser l'adéquation entre la composition du pool précurseur et celle des P synthétisées, les AA alimentaires non utilisés étant oxydés (Benevenga *et al.* 1993). Par exemple, chez le chien, un régime dépourvu d'AACR diminuerait l'utilisation de la leucine pour les SP totales ainsi que son oxydation (Nissen & Haymond 1986). Chez l'homme, un régime déficient en isoleucine induirait une plus faible utilisation de la leucine pour les SP mais une orientation plus importante vers les voies d'oxydation (Lecavalier *et al.* 1991). Ainsi, la déficience en un seul AAI, en limitant la SP, induirait une orientation préférentielle des autres AAI vers les voies d'oxydation plutôt que de SP (Benevenga *et al.* 1993; Hartman & Prior 1992).

Modulations des cinétiques protéiques splanchniques

Comme indiqué plus haut, il est bien établi qu'une P alimentaire de moindre qualité est associée à une augmentation de l'oxydation des AA hépatiques et de la production d'urée (Bos *et al.* 2003; Fouillet *et al.* 2009; Fouillet *et al.* 2002b; Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2011). En revanche, les résultats portant sur les effets de la qualité protéique ou de la composition en AA du régime sur les cinétiques protéiques splanchniques chez l'homme et l'animal sont très disparates et parfois contradictoires. Certaines études rapportent une augmentation de la rétention de l'azote alimentaire dans la zone splanchnique et une plus grande efficacité de son incorporation dans les P splanchniques en phase postprandiale après l'ingestion de P de soja (Fouillet *et al.* 2002b; Bos *et al.* 2003) ou de colza (Boutry *et al.* 2011) par rapport à des P de lait, mais sans augmentation du renouvellement protéique dans le cas des P de colza. A l'inverse, d'autres études ont montré que l'ingestion de P de soja induisait une stimulation moins importante de la SP splanchnique ou hépatique en phase postprandiale comparativement à l'ingestion de caséine (Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2011). Les différences observées entre ces études pourraient s'expliquer par le fait que la source protéique modifie l'utilisation différentielle des AA alimentaires vs endogènes pour la SP. De plus, une rétention plus importante de l'azote alimentaire pourrait être liée à une diminution de la DP dans la zone splanchnique après l'ingestion de P de soja (Deutz *et al.* 1998). Les résultats concernant les modulations de la SP hépatique dans le cas de P d'encore moins bonne qualité ou de régimes déficients en certains AA sont également très contradictoires : chez le rat, la consommation de légumes, comparativement à des P de lait, serait associée à une altération de la croissance et induirait une légère augmentation de la SP hépatique (Martinez *et al.* 1987) alors que celle-ci serait diminuée lors de l'ingestion de régimes déficients en tryptophane ou en leucine (Anthony *et al.* 2001b) mais resterait inchangée lors de l'ingestion de régimes déficients en glycine ou thréonine (Anthony *et al.* 2001b; Sidransky & Verney 1965).

Modulations de l'accrétion et des cinétiques protéiques périphériques

Les tissus périphériques pourraient être moins directement sensibles à la qualité de la P alimentaire que les tissus splanchniques, car le profil des AA mis à disposition de la zone périphérique dépend largement de l'utilisation des AA par la zone splanchnique et est, par conséquent, différent du profil des AA alimentaires. Il semble néanmoins qu'une altération de la qualité de la source protéique induit une diminution de la rétention azotée et des SP dans la zone périphérique et principalement dans

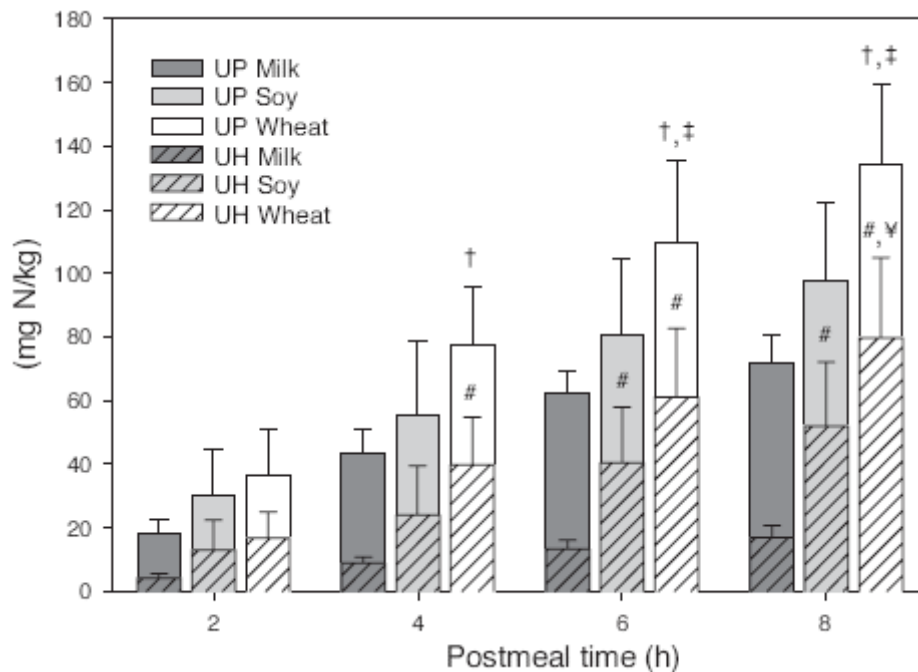


Figure 23. Effet de la qualité des P alimentaires sur la production et l'hydrolyse de l'urée en phase postprandiale chez l'homme.

Les valeurs de production (UP) et d'hydrolyse (UH) d'urée ont été prédites à partir de l'analyse par modélisation compartimentale des cinétiques d'enrichissement isotopique mesurées dans l'urée plasmatique et l'urée urinaire après l'administration de P marquées.

→ Lorsque la qualité de la P alimentaire est moindre, l'uréogénèse postprandiale est plus importante et le recyclage entéro-hépatique de l'urée (UH) est davantage stimulé.

D'après Fouillet et al. (2008)

Tableau 9. Effet de la nature et du profil en AA des P alimentaires sur les flux azotés.

	Effet ¹	Source P	Espèce	référence
Flux azotés dans le tractus gastro-intestinal				
Vidange gastrique	↗	Soja vs. caséine	Rat	Hara <i>et al.</i> , 1992
Transit intestinal	↗	Soja vs. lait	Homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2002b; Bos <i>et al.</i> , 2003; Fouillet <i>et al.</i> , 2009
		Soja vs. caséine	Rat	Hara <i>et al.</i> , 1992
Absorption intestinale	↗	Soja vs. lait	Homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2002b; Bos <i>et al.</i> , 2003; Fouillet <i>et al.</i> , 2009
Flux de leucine au niveau corps-entier				
SP	< (phase PP)	Soja vs. caséine	homme	Luiking <i>et al.</i> , 2005
		Déficienc en AACR	Chien	Nissen <i>et al.</i> , 1986
	=<	Déficienc en isoleucine	Homme	Lecavalier <i>et al.</i> , 1991
		Soja vs. caséine	Rat	Schadereit <i>et al.</i> , 1999
DP	=< (phase PP)	Déficienc en thréonine	Homme	Lecavalier <i>et al.</i> , 1991
		Soja vs. caséine	homme	Luiking <i>et al.</i> , 2005
	>	Soja vs. caséine	Rat	Schadereit <i>et al.</i> , 1999
		Déficienc en AACR	Chien	Nissen <i>et al.</i> , 1986
Oxydation	<	Déficienc en isoleucine	Homme	Lecavalier <i>et al.</i> , 1991
		Déficienc en AACR	Chien	Nissen <i>et al.</i> , 1986
		Déficienc en thréonine	Homme	Lecavalier <i>et al.</i> , 1991
Flux d'urée				
production d'urée	> (phase PP)	Soja vs. caséine	Porcs	Deutz <i>et al.</i> , 1998
		Soja vs. lait	Homme	Luiking <i>et al.</i> , 2005
		Blé vs. lait	Homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2008
		Blé vs. lait	Homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2008
Excrétion urinaire d'urée	>	Soja vs. caséine	Porc	Lohrke <i>et al.</i> , 2001
		Casein vs. egg	Rat	Hayase <i>et al.</i> , 1980
		Déficienc en méthionine	rat	Hayase <i>et al.</i> , 1980
	=<	Déficienc en thréonine		
		Soja ou blé vs. lait	Homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2008
Recyclage de l'urée*	>	Soja ou blé vs. lait	Homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2008

¹ l'effet indiqué correspond à l'effet d'une détérioration de la qualité de la protéine alimentaire ou du profil d'AA dans le régime. *le recyclage de l'urée correspond à la part d'urée produite qui est transférée vers le côlon et hydrolysée, soit : quantité urée hydrolysée / quantité urée produite. ↗, accélérée ; <, inférieur; >, supérieur; =, pas de différence; P, protéine; SP, synthèse protéique; DP, dégradation protéique; AACR, acides aminés à chaîne ramifiée; PA, postabsorptive; PP, postprandiale.

Tableau 9 (suite) : Effet de la nature et du profil en AA des P alimentaires sur les flux azotés

	Effet ¹	Source P	Espèce	références
Flux azotés dans la zone splanchnique				
SP	< (phase PP)	Soja vs. caséine	Porc homme	Deutz <i>et al.</i> , 1998 Luiking <i>et al.</i> , 2005
	> (phase PP)	Soja vs. lait	homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2002b Bos <i>et al.</i> , 2003
	= (phase PP)	colza vs. caséine	rat	Boutry <i>et al.</i> , 2011
SP : P hépatiques totales	▪	Légume vs. lait	Rat	Martinez <i>et al.</i> , 1987
	<	Déficience en AACR / leucine / tryptophane	Rat	Anthony <i>et al.</i> , 2001b
	=	Déficience en glycine Déficience en thréonine	Rat Rat	Anthony <i>et al.</i> , 2001b Sidransky <i>et al.</i> , 1965
SP : P exportées (albumine & fibrinogène)	=	Déficience en isoleucine Déficience en thréonine	Homme Homme	Lecavalier <i>et al.</i> , 1991 Lecavalier <i>et al.</i> , 1991
	DP	< (phase PP)	Soja vs. caséine	porc
Oxydation	>	Soja vs. caséine	Porc homme	Deutz <i>et al.</i> , 1998 Luiking <i>et al.</i> , 2005
		Soja vs. lait	homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2002b; Bos <i>et al.</i> , 2003; Fouillet <i>et al.</i> , 2009
Flux azotés dans le muscle				
SP	< (phase PP)	Soja vs. lait	homme	Fouillet <i>et al.</i> , 2002b; Fouillet <i>et al.</i> , 2009
		Caséine vs. lactosérum P appauvries en leucine	homme Rat	Pennings <i>et al.</i> , 2011 Rieu <i>et al.</i> , 2007
		Légume vs. lait Déficience en thréonine	Rat Rat	Martinez <i>et al.</i> , 1987 Sidransky <i>et al.</i> , 1965
	> (taux de synthèse)	Soja vs. caséine	porc	Deutz <i>et al.</i> , 1998
	= (phases PA & PP)	Soja vs. lait	homme	Luiking <i>et al.</i> , 2011
	DP	>	Soja vs. caséine	Rat Porc
= (phases PA & PP)		Soja vs. caséine	homme	Luiking <i>et al.</i> , 2011

¹ l'effet indiqué correspond à l'effet d'une détérioration de la qualité de la protéine alimentaire ou du profil d'AA dans le régime.*le recyclage de l'urée correspond à la part d'urée produite qui est transférée vers le côlon et hydrolysée, soit : quantité urée hydrolysée /quantité urée produite. <, inférieur; >, supérieur; =, pas de différence; P, protéine; SP, synthèse protéique; DP, dégradation protéique; AACR, acides aminés à chaîne ramifiée; PA, postabsorptive; PP, postprandiale.

le muscle en phase postprandiale. Cette observation a été rapportée dans plusieurs études comparant l'effet de l'ingestion de P de soja par rapport à des P de lait (Fouillet *et al.* 2009; Fouillet *et al.* 2002b), de caséine par rapport à des P de lactoserum (Pennings *et al.* 2011), de P plus ou moins riches en leucine (Rieu *et al.* 2007), de régimes déficients en thréonine (Sidransky & Verney 1965), ou encore dans des études comparant l'effet de la consommation de régimes à base de P végétales sous la forme de légumes par rapport à des régimes à base de caséine (Martinez *et al.* 1987). Néanmoins, une augmentation du renouvellement protéique musculaire a été mise en évidence chez le porc en croissance après l'ingestion de P de soja par rapport à des P de lait (Deutz *et al.* 1998), mais il semble que cette stimulation du taux de SP ne soit pas accompagnée d'une augmentation de la SP nette. Les données concernant l'effet de la source protéique sur la DP périphérique sont plus rares et contradictoires : selon les études, la DP musculaire serait augmentée (Schadereit *et al.* 1999; Lohrke *et al.* 2001) ou inchangée (Luiking *et al.* 2011) lors de l'ingestion de P de soja comparativement à des P de lait. Ces différences pourraient être en partie expliquées par un effet chronique vs aigu de la source protéique, la diminution de la DP étant observée chez des animaux ayant été adaptés pendant 2 semaines aux différents régimes.

En conclusion, il est difficile, étant donnée la disparité des résultats et des conditions d'études, de faire ressortir un effet général de la nature des P alimentaires sur les cinétiques protéiques à court et long termes. Il semble néanmoins que la composition des P alimentaires ait un effet différentiel selon les tissus, avec une augmentation de l'orientation préférentielle des AA vers les voies d'oxydation dans la zone splanchnique et une diminution des SP dans la zone périphérique. Ces différences pourraient être liées au fait que chaque tissu a des besoins spécifiques en AA et des vitesses de renouvellement différentes. L'effet de la composition en AA des P alimentaires sur le métabolisme régional dépendrait donc de leur teneur relative en certains AA, mais également de la quantité de P ingérées et du statut nutritionnel des individus.

II.2.ii. Effet du niveau d'apport protéique (excessif vs normal)

Le niveau d'apport en P est susceptible d'affecter le métabolisme protéique à la fois de manière aiguë, en modulant les réponses postprandiales immédiates des cinétiques protéiques, et de manière chronique, en induisant une adaptation à plus long terme du métabolisme protéique. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux modulations des cinétiques protéiques et des flux azotés induites, à plus long terme, par la consommation de régimes hyperprotéiques par rapport à des régimes normo-protéiques couvrant les besoins azotés, c'est-à-dire par une augmentation de l'apport en P au-delà du besoin azoté.

Modulations des cinétiques de production, de recyclage entéro-hépatique et d'excrétion de l'urée

L'augmentation du niveau d'apport protéique au-delà du besoin azoté moyen se traduit globalement par une augmentation de l'excrétion urinaire d'urée (Schimke 1962; Forslund *et al.* 1998; Fouillet *et al.* 2008), qui constitue la partie variable des pertes azotées et qui permet donc d'adapter le niveau des pertes au niveau des apports et de maintenir ainsi un bilan azoté neutre. Cette réponse n'est

cependant pas instantanée et la rééquilibration du bilan azoté nécessite environ 30 heures chez le rat et jusqu'à 10 jours chez l'homme (Waterlow 1999).

S'il est bien établi que l'excrétion urinaire d'urée augmente avec l'apport en P, les données concernant les variations de la production d'urée en fonction de l'apport en P sont plus controversées : si la plupart des études rapportent une augmentation proportionnelle de la production d'urée avec la quantité de P ingérées (Young *et al.* 2000; Child *et al.* 1997; Morens *et al.* 2001; Russell *et al.* 2000), certaines études montrent que la production d'urée reste stable quel que soit le niveau d'apport en P, lorsque ce niveau est égal ou supérieur aux besoins (Jackson 1999; Langran *et al.* 1992). L'effet de l'apport en P sur les quantités d'urée hydrolysée et recyclée est également encore controversé. Selon certaines études, l'hydrolyse et le recyclage de l'urée représenteraient une part fixe de la production d'urée et seraient indépendants de l'apport protéique (Young *et al.* 2000; Russell *et al.* 2000). A l'inverse, d'autres études ont montré une diminution des quantités d'urée hydrolysée pour des apports protéiques plus élevés et concluent à une diminution de l'efficacité du recyclage entéro-hépatique lorsque le niveau d'apport protéique est augmenté au-delà des besoins azotés (Forslund *et al.* 1998; Fouillet *et al.* 2008).

Par ailleurs, l'augmentation de la quantité de P ingérées induirait une augmentation de la production d'ammoniaque par le rein, vraisemblablement liée à l'effet acidifiant des P plus qu'à leur niveau d'apport per se.

Modulations des cinétiques protéiques et des flux d'oxydation

- Au niveau corps-entier

Il est clairement établi que l'oxydation corporelle totale est augmentée lorsque l'apport en P augmente. A l'inverse, les résultats obtenus dans différentes études comparant les cinétiques protéiques corporelles totales chez des sujets adaptés à différents niveaux d'apport en P pendant des périodes d'au moins 7 jours suggèrent que la SP quotidienne moyenne n'augmente pas ou faiblement (moins de 20%) lorsque l'apport en P augmente (de 100 à 250% selon les études) (Waterlow 1999; Motil *et al.* 1981; Harber *et al.* 2005; Laurent *et al.* 1984), et que la DP est légèrement diminuée (Waterlow 1999; Motil *et al.* 1981; Grizard *et al.* 1995), bien que les modulations observées concernant cette dernière soient plus variables et que certaines études aient mis en évidence une augmentation à l'état postabsorptif (Motil *et al.* 1981; Harber *et al.* 2005). Ainsi, l'augmentation chronique du niveau d'apport en P au-delà du besoin n'a pas d'effet positif sur le bilan azoté corporel, le renouvellement protéique corporel quotidien moyen étant peu sensible à l'augmentation de l'apport en P (Holecek & Kovarik 2011) et la SP corporelle totale semblant atteindre un plateau pour des teneurs en P dans le régime supérieures à 20% (Laurent *et al.* 1984) (Figure 24).

En revanche, plusieurs études ont mis en évidence un effet aigu du niveau d'apport en P, qui module l'amplitude des variations nyctémérales du bilan azoté et des flux de SP et DP, sans modifier les taux quotidiens moyens de SP et DP sur l'ensemble des phases postprandiale et postabsorptive (Pacy *et al.* 1994; Price *et al.* 1994; Laurent *et al.* 1984). En effet, l'augmentation de la quantité de P dans le régime induit une stimulation plus importante des SP et de l'oxydation et une inhibition plus forte des DP

pendant la phase postprandiale (Motil *et al.* 1981; Pacy *et al.* 1994; Forslund *et al.* 1998), entraînant une augmentation du gain protéique pendant cette phase (Price *et al.* 1994). Cette augmentation de l'anabolisme postprandial pour des apports en P plus élevés est compensée par une augmentation des pertes azotées pendant la phase postabsorptive (Price *et al.* 1994), liée à une stimulation plus importante des DP (Pacy *et al.* 1994), la SP et l'oxydation n'étant pas modifiées (Laurent *et al.* 1984).

L'effet de l'augmentation de l'apport en P sur les cinétiques protéiques et l'oxydation observé en phase postprandiale serait lié à un effet direct de l'augmentation de la taille des pools d'AA libres précurseurs. Les AA ayant une plus grande affinité pour leurs ARNt-transférases que pour les enzymes de dégradation, les SP seraient rapidement stimulées par une augmentation modérée de la taille du pool d'AA alors que l'oxydation serait davantage stimulée par une élévation plus importante de la taille du pool d'AA. Il semble donc qu'à l'échelle corps entier, la SP soit prioritairement réalisée avec un taux relativement constant quel que soit le niveau d'apport et que les AA en excès par rapport aux besoins anaboliques soient secondairement éliminés par oxydation (Waterlow 1999).

- Aux niveaux tissulaires

Il est relativement bien admis et établi que l'augmentation chronique du niveau d'apport en P au-delà du niveau nécessaire pour satisfaire les besoins azotés n'a pas d'effet positif sur le bilan azoté des tissus, plusieurs études chez l'homme et l'animal ne mettant pas en évidence d'augmentation du contenu protéique dans le muscle (Holecek & Kovarik 2011; Masanes *et al.* 1999; Morens *et al.* 2001; Taillandier *et al.* 1996), le foie (Holecek & Kovarik 2011; Masanes *et al.* 1999; Morens *et al.* 2001; Chevalier *et al.* 2009), le rein (Holecek & Kovarik 2011; Masanes *et al.* 1999; Morens *et al.* 2001; Chevalier *et al.* 2010; Chevalier *et al.* 2009), l'intestin (Masanes *et al.* 1999) ou la peau (Masanes *et al.* 1999) pour des apports en P élevés.

Le métabolisme splanchnique semble particulièrement impliqué dans la réponse à une augmentation de l'apport alimentaire. Cependant, les effets de cette augmentation sur les cinétiques protéiques sont encore mal définis : selon les études, les FSR hépatiques mesurés chez le rat après l'adaptation à un régime hyperprotéique (50-65%) pendant 2 à 7 semaines sont soit augmentés (Masanes *et al.* 1999), soit inchangés (Haider & Tarver 1969), soit diminués (Chevalier *et al.* 2010; Chevalier *et al.* 2009) dans le cas des P constitutives et semblent inchangés dans le cas de l'albumine (Haider & Tarver 1969; Chevalier *et al.* 2010; Chevalier *et al.* 2009) en phases postabsorptive et postprandiale (Figure 25). La principale adaptation observée dans la zone splanchnique en réponse à l'augmentation de l'apport en P est la stimulation des voies cataboliques, c'est-à-dire une augmentation de l'oxydation des AA, qui se traduit par une augmentation de la production d'urée et des concentrations d'urée plasmatique (Masanes *et al.* 1999; Holecek & Kovarik 2011; Lacroix *et al.* 2004; Morens *et al.* 2001; Chevalier *et al.* 2010; Chevalier *et al.* 2009). L'augmentation du catabolisme des AA dans le foie limite l'accumulation des AA dans le plasma mais modifie également le profil des AA libérés vers la zone périphérique. En effet, lors de l'ingestion de régimes hyperprotéiques, il a été rapporté une diminution des concentrations plasmatiques de la majorité des AA, et plus particulièrement des AAG, mais une augmentation des concentrations d'ACR et d'arginine (Grizard *et al.* 1995; Morens *et al.* 2001; Chevalier

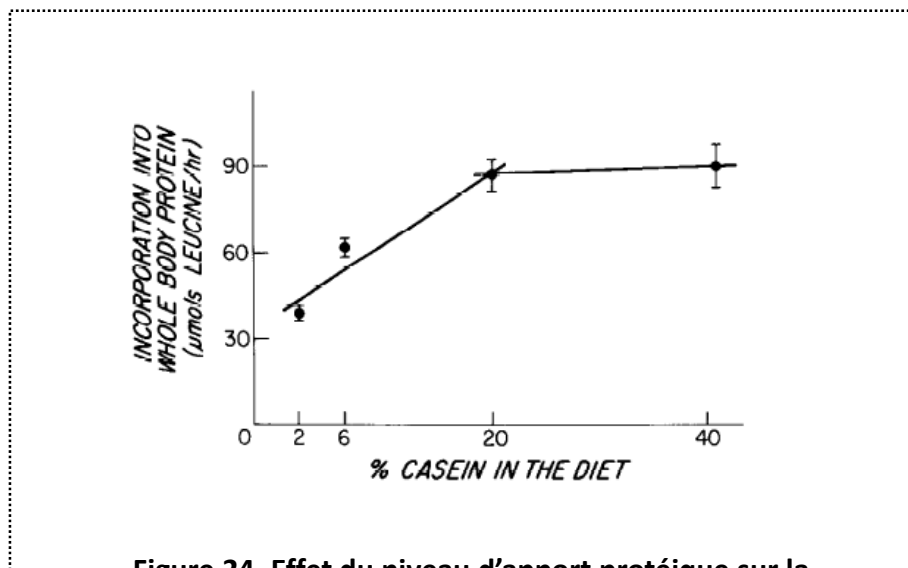


Figure 24. Effet du niveau d'apport protéique sur la synthèse protéique (SP) corporelle totale chez le rat.

→ La SP corporelle totale n'est pas augmentée lors d'une augmentation de la teneur en P dans le régime au delà de 20% .

D'après Laurent et al. (1984)

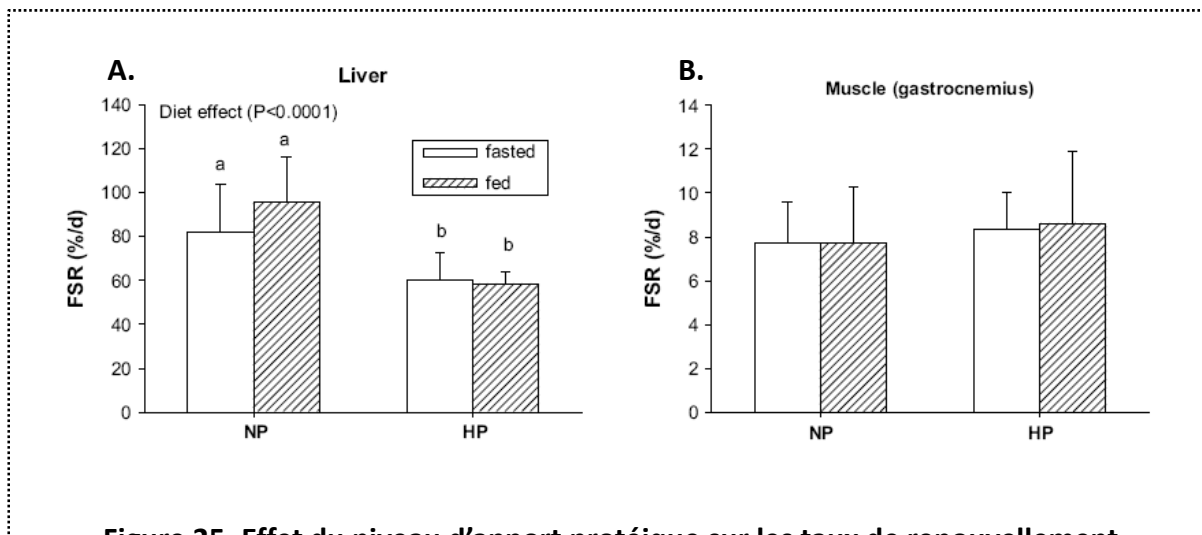


Figure 25. Effet du niveau d'apport protéique sur les taux de renouvellement hépatique et musculaire chez le rat.

Les FSR ont été mesurés dans le foie (A) et dans le muscle (B) en phases postabsorptive (fasted) et postprandiale (fed) chez des rats adaptés à des régimes normoprotéique (NP, 13%P) ou hyperprotéique (HP, 48%P) pendant 14 jours.

→ L'augmentation du niveau d'apport protéique induit une diminution du FSR hépatique mais ne modifie pas le FSR musculaire.

D'après Chevalier et al. (2009)

et al. 2010). La biodisponibilité des AA pour les tissus périphériques serait ainsi paradoxalement diminuée pour des niveaux d'apport en P élevés (Grizard *et al.* 1995).

Contrairement à la zone splanchnique, le muscle apparaît très peu sensible à une augmentation du niveau d'apport en P au-delà du niveau permettant de satisfaire les besoins. En effet, la SP et le renouvellement protéique ne semblent pas stimulés par une élévation du niveau d'apport en P, pour des apports couvrant les besoins (Grizard *et al.* 1995; Morens *et al.* 2001; Chevalier *et al.* 2010; Laurent *et al.* 1984), bien que des résultats contradictoires aient été obtenus dans certaines études, montrant un FSR musculaire augmenté (Harber *et al.* 2005; Frank *et al.* 2005) ou diminué (Masanes *et al.* 1999; Taillandier *et al.* 1996; Bolster *et al.* 2005) lors de la consommation de régimes hyperprotéiques. De plus, l'augmentation de la quantité de P ingérées ne semble pas induire d'augmentation de l'oxydation musculaire, malgré une augmentation des quantités d'AA libres dans le muscle, et principalement des AACR. Le fait que les AACR s'accumulent dans le pool d'AA libres dans le muscle sans être davantage utilisés pour les SP ou davantage éliminés via une stimulation de l'oxydation indique une faible capacité d'adaptation du métabolisme musculaire à des variations du profil d'AA circulants lors d'apports en P augmentés (Morens *et al.* 2001; Chevalier *et al.* 2009).

En ce qui concerne l'effet d'une augmentation du niveau d'apport en P sur les cinétiques protéiques des autres tissus périphériques, les données sont rares et contradictoires, montrant par exemple une augmentation (Chevalier *et al.* 2009) ou une diminution (Masanes *et al.* 1999) du FSR de la peau et une diminution (Chevalier *et al.* 2009) ou une absence de variation (Masanes *et al.* 1999; Holecek & Kovarik 2011) du FSR du rein chez le rat lors de la consommation de régimes hyperprotéiques vs normoprotéiques.

En conclusion, qualitativement, l'augmentation chronique de l'apport en P au-delà des besoins ne se traduit pas ou peu par une modification des cinétiques protéiques mais principalement par une augmentation de la production d'urée, la majeure partie des AA ingérés en excès étant orientés vers les voies d'oxydation. Le foie semble jouer un rôle prédominant dans les processus d'adaptation aux régimes hyperprotéiques : la forte stimulation de ces voies cataboliques limite la survenue d'une HA postprandiale excessive, assurant un approvisionnement quantitativement constant des AA vers la zone périphérique, mais module la disponibilité des AA plasmatiques, augmentant celle des AACR mais diminuant celle des AAG. Le muscle, à l'inverse, semble peu sensible à un apport augmenté en P et accumule dans son pool d'AA libres les AACR libérés en excès par la zone splanchnique. Cependant, l'effet d'une augmentation de l'apport en P sur les SP et DP dans les différents tissus est encore mal identifié.

II.3. Altérations des flux azotés dans des conditions nutritionnelles défavorables ou des situations physio-pathologiques particulières

Dans des conditions nutritionnelles défavorables, ne permettant pas de répondre aux besoins de l'organisme, telles qu'une restriction protéique importante et prolongée, ou dans des conditions physio-pathologiques le diabète, l'homéostasie azotée est perturbée et l'altération des flux métaboliques peut

conduire, dans certains cas extrêmes, à une perte de masse maigre globale ou tissulaire avec des répercussions métaboliques et fonctionnelles spécifiques de l'organe concerné, telles qu'une réduction de la masse musculaire.

II.3.i. Altérations associées à un stress nutritionnel sévère (régime protéoprive et jeûne)

La réponse métabolique à des régimes protéoprives ou au jeûne est différente en raison de différences de disponibilité des substrats énergétiques dans ces deux conditions : dans le cas de régimes protéoprives, les substrats énergétiques lipidiques et glucidiques sont toujours disponibles et par conséquent l'adaptation de l'organisme vise essentiellement à préserver la masse maigre des P corporelles, alors que dans des situations de jeûne l'organisme s'adapte dans un premier temps dans le but de maintenir l'homéostasie du glucose, puisant son énergie du tissu adipeux et/ou des P corporelles selon la durée du jeûne.

Variations des sources de substrats énergétiques et adaptations globales du métabolisme protéique au cours du jeûne

Les adaptations métaboliques au cours du jeûne peuvent être décrites selon 3 phases distinctes (Goodman *et al.* 1981; Grizard *et al.* 1995) :

- pendant la première phase, qui dure environ 2 jours, les taux de glucose plasmatique sont prioritairement maintenus constants, malgré l'absence d'apport exogène, par la production de glucose à partir du glycogène hépatique puis par la mobilisation des réserves lipidiques et des P corporelles (Meguid *et al.* 1981). Pendant cette première phase, le taux de SP corporelle totale est diminué alors que la DP est augmentée (Cherel *et al.* 1991). La dégradation des P pour l'utilisation des AA à des fins énergétiques conduit à l'altération d'une ou plusieurs fonctions nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, si bien que rapidement lors du jeûne, les adaptations métaboliques visent à épargner les P corporelles, dont la préservation est essentielle à la survie de l'organisme.
- La deuxième phase constitue ainsi une phase d'épargne azotée, avec des adaptations métaboliques qui visent principalement à préserver la masse des P corporelles. Les réserves lipidiques sont fortement mobilisées et deviennent la principale source d'énergie. L'épargne azotée au cours de cette phase se traduit par une diminution globale de la DP et une chute importante de l'excrétion urinaire d'urée (Cherel *et al.* 1991; Grizard *et al.* 1995). Cette phase peut durer plusieurs semaines, sa durée dépendant principalement de l'étendue des réserves lipidiques mobilisables par l'organisme.
- La troisième phase commence lorsque les réserves lipidiques sont épuisées. L'organisme utilise alors les AA issus de la dégradation des P corporelles comme source d'énergie. La masse protéique, et principalement la masse musculaire, diminue rapidement au cours de cette phase, en raison principalement d'une forte diminution de SP et d'une augmentation de DP dans certains tissus (Goodman *et al.* 1981; Cherel *et al.* 1991).

Ainsi, le métabolisme protéique est différemment modulé au cours de ces 3 phases, avec des modulations visant globalement à un maintien de la masse protéique pendant la 2^{ème} phase du jeûne, c'est-à-dire lors d'un jeûne court, et consistant en une mobilisation de cette masse au cours de la 3^{ème}

phase, soit lors d'un jeûne prolongé. Les modulations associées à une privation protéique sans restriction énergétique (régimes protéoprives) apparaissent comparables aux modulations observées pendant la phase 2 du jeûne. Nous présenterons dans cette partie les quelques données disponibles obtenues chez le rat concernant les modulations des cinétiques protéiques observées lors d'un jeûne court ou sous régime protéoprive et lors d'un jeûne prolongé.

Modulations des pertes azotées

L'excrétion urinaire d'urée étant la part la plus variable des pertes azotées, elle est prioritairement impactée lors d'un apport en P nul. Elle est diminuée lors d'un jeûne court ou sous régime protéoprive en raison de la forte baisse de la production d'urée, elle-même liée à une forte inhibition du catabolisme protéique musculaire. Ainsi, chez le rat soumis à un régime protéoprive pendant 4 jours, l'excrétion urinaire est diminuée de 80% (Schimke 1962). Un apport azoté nul pourrait également induire une diminution de la quantité d'urée hydrolysée en proportion de la quantité d'urée produite : chez l'homme, il a été montré que 6 à 8% de l'urée produite étaient hydrolysés dans ces conditions, au lieu de 20% en conditions normales (Young *et al.* 2000; Long *et al.* 1978). Lors d'un jeûne prolongé, l'excrétion urinaire d'urée est au contraire augmentée en raison du fort catabolisme protéique (Goodman *et al.* 1981) : par exemple, un jeûne de 7 jours chez le rat entraîne une augmentation de 200% de l'excrétion d'urée (Schimke 1962).

Modulations des cinétiques protéiques dans les tissus splanchniques

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la localisation particulière des tissus splanchniques entre la source alimentaire et la zone périphérique leur assure un approvisionnement prioritaire et privilégié en phase postprandiale, mais leur forte sensibilité aux apports alimentaires peut également contribuer à une perte rapide de masse protéique dans ces tissus lorsque cet apport est déficient ou annulé.

La masse protéique intestinale est diminuée dès les premiers jours du jeûne : une diminution d'environ 20-30% est rapportée chez le rat après respectivement 1 à 2 jours (Samuels & Attaix 2000; Samuels *et al.* 1996; McNurlan *et al.* 1979) et de presque 50% après 5 jours de jeûne (Samuels *et al.* 1996; McNurlan & Garlick 1981) ou 9 jours de régime protéoprive (McNurlan & Garlick 1981). Les mécanismes responsables de cette perte de masse protéique ne sont cependant pas clairement définis : certaines études montrent une diminution du FSR d'environ 20-30% et du flux absolu de SP (ASR) d'environ 60% lors du jeûne court ou sous régime protéoprive (McNurlan & Garlick 1981; McNurlan *et al.* 1979; Samuels *et al.* 1996; Garlick *et al.* 1982) alors que d'autres études ne montrent pas d'effet de la privation en P sur la SP intestinale (Preedy *et al.* 1988; Bouteloup-Demange *et al.* 1998; Samuels *et al.* 1996). Ces résultats contradictoires pourraient être liés aux différents stades de développement des animaux selon les études : la diminution de la masse protéique chez le rat adulte résulterait davantage d'une augmentation de la DP que d'une diminution de la SP, alors que chez le rat en croissance la diminution de la SP serait majoritairement responsable de la déplétion des P intestinales, la DP ne semblant pas affectée (Samuels & Attaix 2000; Samuels *et al.* 1996; Burrin *et al.* 1991).

Dans le foie, la synthèse et le renouvellement protéique total semblent relativement préservés lors du jeûne court ou d'un régime protéoprive, les FSR hépatiques observés chez le rat étant inchangés ou présentant une diminution inférieure à 20% après 2 à 3 jours dans ces conditions (Garlick *et al.* 1975; Garlick *et al.* 1982; Cherel *et al.* 1991; McNurlan *et al.* 1982; Preedy *et al.* 1988). Il est néanmoins rapporté une diminution non négligeable de la masse protéique dans le foie (Morgan & Peters 1971; McNurlan & Garlick 1981; Adibi & Mercer 1973; Haider & Tarver 1969; Preedy *et al.* 1988), qui, bien que très variable selon les études et les individus, suggère que la privation protéique induit une stimulation de la DP hépatique (McNurlan *et al.* 1979; Garlick *et al.* 1973; Garlick *et al.* 1975). Le fait que le bilan protéique dans le foie soit davantage régulé par la DP que la SP pourrait s'expliquer par son rôle dans la synthèse de P exportées, et notamment d'albumine. Cependant, plusieurs études ont montré que la concentration d'albumine plasmatique était fortement diminuée et que la synthèse de l'albumine était davantage affectée par l'ingestion d'un régime protéoprive que celle des P hépatiques constitutives : la quantité d'albumine synthétisée chuterait de 40 à 50% en proportion de la SP hépatique totale (Haider & Tarver 1969; Morgan & Peters 1971; Pain *et al.* 1978).

Modulations des cinétiques protéiques dans les tissus périphériques

Les résultats de plusieurs études chez le rat indiquent que la SP musculaire est nettement altérée dès les premiers jours d'un jeûne ou de l'adaptation à un régime protéoprive, des diminutions du FSR musculaire de 30 à 60% ayant été observées dans les 2 ou 3 premiers jours (Garlick *et al.* 1982; Garlick *et al.* 1975; Baillie & Garlick 1992; Preedy *et al.* 1988; McNurlan *et al.* 1982) et de 75 à 85% pour des durées plus longues (McNurlan *et al.* 1982; Garlick *et al.* 1975; Millward *et al.* 1983; Cherel *et al.* 1991). Malgré la forte diminution du FSR, la masse de P musculaires n'est pas ou seulement faiblement diminuée dans les premiers temps d'une privation protéique, les diminutions rapportées étant inférieures à 10% pour des durées de 1 à 9 jours (Garlick *et al.* 1975; Baillie & Garlick 1992; Preedy *et al.* 1988; Adibi & Mercer 1973; Mosoni *et al.* 1996), ce qui suggère une inhibition de la DP en parallèle de la diminution de la SP (Mosoni *et al.* 1996; Millward 1979; Garlick *et al.* 1975; Goodman *et al.* 1981; Kadowaki *et al.* 1989). La DP ne serait augmentée que plus tardivement, dans les phases ultérieures du jeûne, et conduirait alors à une déplétion des P musculaires (Goodman *et al.* 1981). Il a par exemple été montré que l'augmentation de la DP survenait plus tardivement chez des rats obèses (Goodman *et al.* 1981), ce qui semble cohérent avec l'idée que les P musculaires sont dégradées pour fournir des substrats énergétiques lorsque les réserves lipides sont épuisées.

Dans la peau, la SP serait initialement moins affectée que celle du muscle, mais diminuerait lors d'un jeûne prolongé (Cherel *et al.* 1991). La masse protéique de la peau serait maintenue relativement constante grâce à une réutilisation particulièrement efficace des AA issus de la DP (Zhang *et al.* 1998). Le rein et le cœur paraissent peu sensibles à une privation protéique courte, leurs masses protéiques étant maintenues et leurs FSR faiblement diminués dans les premiers jours d'un jeûne (Preedy *et al.* 1988; Yuan *et al.* 2008).

L'ensemble de ces résultats suggère que les tissus splanchniques et périphériques présentent des adaptations métaboliques différentes lors d'une privation protéique. Malgré des données parfois contradictoires, la SP serait plutôt préservée dans le foie, l'intestin et la peau dans les premiers temps d'un jeûne ou de l'adaptation à un régime protéoprive, alors qu'elle serait rapidement et fortement diminuée dans le muscle. Pendant la phase initiale du jeûne, la contribution relative des tissus splanchniques et de la peau à la SP corporelle totale serait donc augmentée et deviendrait supérieure à celle du muscle (Preedy *et al.* 1988; Cherel *et al.* 1991). La diminution de la SP observée à l'échelle corporelle reflèterait majoritairement une diminution de la SP musculaire. Paradoxalement, la masse protéique des tissus splanchniques serait rapidement déplétée, en raison d'une stimulation de la DP, alors que la masse protéique musculaire serait initialement maintenue grâce à une inhibition de la DP musculaire. Les données disponibles concernant les modulations du métabolisme protéique lors du jeûne sont cependant particulièrement disparates, en raison des durées variables de jeûne selon les études et de la forte variabilité inter-individuelle dans les réponses au jeûne. Les processus d'adaptation métabolique qui ont lieu dans ces conditions de stress nutritionnel sévère restent par conséquent encore largement méconnus et il est difficile de conclure clairement et de quantifier précisément les modulations des flux azotés dans ces conditions.

II.3.ii. Modifications du métabolisme azoté dans le contexte de l'obésité, du syndrome métabolique et du diabète de type 2

Le syndrome métabolique, qui associe entre autres obésité et insulino-résistance (**IR**), est une condition pré-pathologique, progressivement induite par l'excès d'apports de nutriments délétères, et qui peut conduire au diabète de type 2. Si on connaît bien les dysrégulations du métabolisme des glucides et des lipides qui adviennent dans le contexte du syndrome métabolique, on méconnaît encore largement comment le métabolisme des P et des AA est affecté dans ces conditions (Marliss & Gougeon 2002). L'IR associée au syndrome métabolique est susceptible d'influencer significativement le métabolisme protéique, puisque l'insuline est un facteur majeur de régulation des SP et DP. Si l'on dispose actuellement de peu d'informations sur la manière dont les flux protéiques sont modulés lors de l'initiation d'une IR, des études plus nombreuses ont montré des perturbations du métabolisme protéique dans le cadre du diabète de type 2 et de l'obésité associée ou non à l'IR. L'objectif de cette partie est de présenter les données disponibles concernant les modulations des flux azotés dans ces conditions.

Exemple du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est caractérisé par une IR qui se traduit par une altération du métabolisme du glucose avec une hyperglycémie à jeun. Chez le sujet sain, l'insuline joue un rôle particulièrement important dans la régulation des cinétiques protéiques postprandiales, puisqu'elle favorise l'anabolisme protéique après l'ingestion d'un repas en inhibant la DP, notamment au niveau musculaire. L'IR associée au diabète de type 2 pourrait donc affecter le métabolisme protéique principalement à court terme, en modifiant sa réponse à l'ingestion d'un repas (c.-à-d. lors du passage de la phase postabsorptive à la

phase postprandiale) mais également potentiellement sur le long terme, en modifiant les SP et DP basales (en phase postabsorptive).

La plupart des résultats des études, comparant les flux azotés à l'échelle corps-entier chez des sujets présentant un diabète de type 2 par rapport à des sujets non diabétiques et de poids comparables, s'accordent sur le fait que les flux de SP, de DP et d'oxydation ne sont pas modifiés à l'état basal lors d'un diabète de type 2, malgré des altérations marquées de l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose (Biolo *et al.* 1992b; Halvatsiotis *et al.* 2002; Luzi *et al.* 1993; Staten *et al.* 1986; Tessari *et al.* 2011; Tessari *et al.* 2005). Le renouvellement protéique musculaire ne semble pas non plus altéré dans ces conditions (Halvatsiotis *et al.* 2002). De rares études ont mis en évidence des flux moyens de SP et DP à l'échelle corps-entier plus élevés chez des sujets obèses et diabétiques par rapport à des sujets obèses non diabétiques (Gougeon *et al.* 2008; Denne *et al.* 1995) : chez les sujets diabétiques, le renouvellement protéique plus important est associé à un bilan protéique global négatif et à une perte de masse protéique (Gougeon *et al.* 2008) (Figure 26).

L'IR associé à un diabète type 2 ne semble pas non plus altérer la réponse anabolique protéique en phase postprandiale, l'augmentation de la SP et la diminution de la DP en réponse à l'ingestion d'un repas ou à la perfusion d'AA et d'insuline étant identiques chez des sujets présentant un diabète de type 2 et chez des sujets non diabétiques (Pereira *et al.* 2008; Luzi *et al.* 1993; Manders *et al.* 2008; Barazzoni *et al.* 2003; Biolo *et al.* 1992b) (Figure 27). Le FSR protéique musculaire est également stimulé de la même manière lors du passage à l'état nourri chez des sujets diabétiques vs. non diabétiques (Manders *et al.* 2008). Une moindre stimulation de la SP a cependant été rapportée chez des hommes obèses et diabétiques par rapport à des hommes obèses non diabétiques après l'ingestion d'un repas, alors que cette stimulation était normale chez les femmes (Pereira *et al.* 2008). Cet effet sexe pourrait être lié à la localisation de l'obésité qui est plutôt abdominale chez l'homme et ginoïde chez la femme, l'obésité abdominale étant davantage associée à une dysfonction du tissu adipeux. Cette différence homme / femme est retrouvée dans l'étude de Gougeon *et al.* qui montre une corrélation négative entre le bilan protéique et la glycémie à jeun chez l'homme mais pas chez la femme (Gougeon *et al.* 2008). Par ailleurs, les résultats d'une étude de métabolomique, qui mettent en évidence une augmentation du rapport des concentrations en leucine et isoleucine (interprété comme un marqueur de protéolyse) après l'administration orale de glucose, suggèrent une moindre inhibition de la protéolyse par l'insuline chez les sujets insulino-résistants (Shaham *et al.* 2008).

Bien que limités, l'ensemble de ces résultats indiquent qu'une altération de l'action de l'insuline sur le métabolisme du glucose n'est pas nécessairement associée à une altération des cinétiques protéiques globales que ce soit à l'état basal ou en réponse à l'ingestion d'un repas (Tableau 10). Cependant quelques données suggèrent que certaines étapes du métabolisme des AA pourraient être altérées. En effet, une augmentation des concentrations circulantes en AACR et une diminution des concentrations en AAG ont été observées chez des hommes et des rats présentant un diabète type 2 (Newgard *et al.* 2009; Wijekoon *et al.* 2004; Adeva *et al.*). Ces mêmes variations du profil des AA ont également été mises en évidence dans les pools d'AA libres hépatiques et musculaires (Wijekoon *et al.*

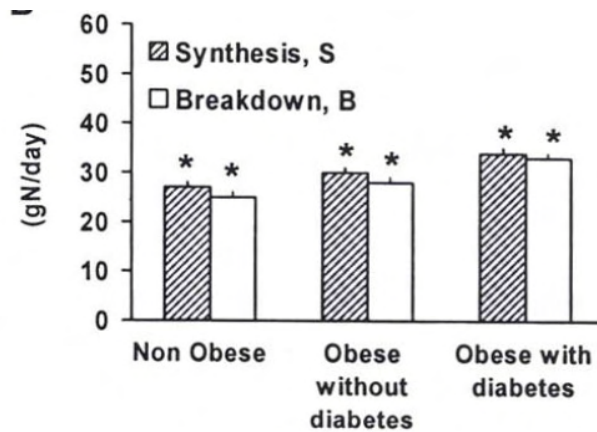


Figure 26. Effet du diabète de type 2 et de l'obésité sur les cinétiques protéiques à l'échelle corps-entier.

Les flux de dégradation (B) et synthèse (S) protéiques ont été mesurés chez des sujets non obèses et non diabétiques (Non Obese), chez des sujets obèses et non diabétiques et chez des sujets obèses et présentant un diabète de type 2. *indique une différence significative ($p < 0,05$) par rapport aux deux autres groupes pour S ou B.

→ Les flux de synthèse et dégradation protéiques sont augmentés chez les sujets obèses et encore davantage augmentés chez les sujets obèses et diabétiques.

D'après Gougeon et al. (2008)

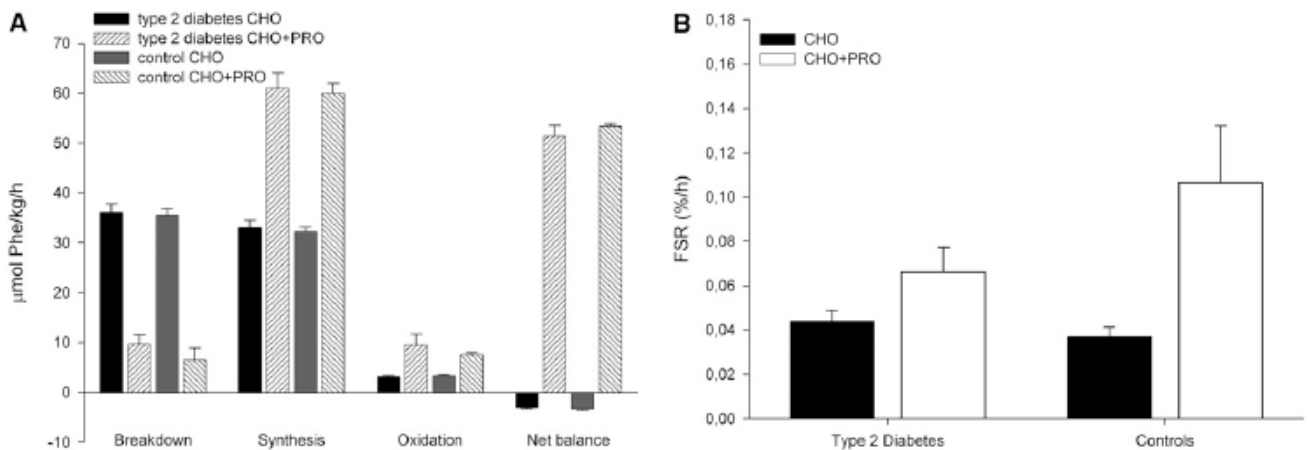


Figure 27. Effet du diabète de type 2 sur les cinétiques protéiques à l'échelle corps-entier et sur le taux de renouvellement protéique musculaire.

Les flux corps-entier d'oxydation, de dégradation et synthèse protéiques, et le bilan protéique net (A) ainsi que le FSR musculaire (B) ont été mesurés chez des sujets présentant un diabète de type 2 et chez des sujets sains, après l'ingestion de glucides seuls (CHO) ou de glucides et protéines (CHO+PRO).

→ Le diabète de type 2 n'altère pas la réponse des SP et DP corporelles totales et des SP musculaires à l'ingestion d'un repas.

D'après Manders et al. (2008)

2004). De plus, le diabète de type 2 serait associé à une augmentation des flux de transaminations (Halvatsiotis *et al.* 2002). Cependant, en l'absence de données à l'échelle tissulaire concernant les modulations des cinétiques protéiques chez les sujets diabétiques de type 2, il est difficile de conclure quant à l'effet de l'IR sur le métabolisme protéique, l'absence d'altérations des cinétiques protéiques totales pouvant masquer des redistributions des cinétiques métaboliques au niveau tissulaire.

Exemple de l'obésité

L'obésité est caractérisée par une élévation de la masse corporelle, principalement de la masse grasse et est associée à des altérations importantes du métabolisme des lipides et des glucides. Cependant, des variations de la masse maigre (diminution ou augmentation) sont également observées chez des sujets obèses, suggérant également une modulation du métabolisme protéique. Il est ainsi couramment considéré que le métabolisme protéique, en particulier musculaire, serait moins sensible à l'action de l'insuline chez des personnes obèses. Néanmoins, les études concernant les adaptations ou altérations du métabolisme protéique potentiellement liées à l'obésité, en termes de cinétiques protéiques et d'échanges d'AA, sont peu nombreuses et présentent des résultats souvent contradictoires (Tableau 11).

- Effet de l'obésité sur les cinétiques protéiques corps entier ou tissulaires en conditions basales postabsorptives

Concernant l'effet de l'obésité sur les SP et DP globaux corps-entier en conditions basales postabsorptives, certaines études rapportent une absence d'effet (Luzi *et al.* 1996; Solini *et al.* 1997), alors que d'autres montrent une augmentation des SP et DP et un renouvellement protéique global supérieur (Chevalier *et al.* 2005; Jensen & Haymond 1991), et qu'une étude rapporte une diminution de SP (Guillet *et al.* 2009). Au niveau musculaire, des altérations des cinétiques protéiques en phase postabsorptive ont également été rapportées lors de l'obésité. Le FSR musculaire est plus élevé chez des rats devenus obèses, mais n'ayant pas développé de dysfonctions du métabolisme glucidique, suite à la consommation de régimes hyper-lipidiques et/ou hyper-glucidiques (Chanseume *et al.* 2007; Estornell *et al.* 1994). Cette stimulation du FSR musculaire serait donc liée à l'apport excessif d'énergie et les FSR d'autres tissus tels que le foie, le rein, l'intestin et le cœur seraient également stimulés dans ces conditions (Estornell *et al.* 1994; Estornell *et al.* 1995). A l'inverse, le FSR musculaire postabsorptif basal n'est pas augmenté chez des souris obèses consommant un régime hyper-lipidique ou chez des rats Zucker obèses, ces animaux étant dans les deux cas également insulino-résistants (Fluckey *et al.* 2000; Anderson *et al.* 2008). Chez l'homme, il y aurait une diminution conjointe des SP et DP musculaires postabsorptives chez l'obèse (Guillet *et al.* 2009; Patterson *et al.* 2002). Enfin, l'obésité serait associée à des concentrations plasmatiques plus élevées d'AA, et notamment d'AACR (Guillet *et al.* 2011). Les origines de cette HA ne sont pas clairement identifiées : elle pourrait résulter d'une augmentation du catabolisme protéique musculaire ou d'une altération du métabolisme des AACR dans le foie et le tissu adipeux (She *et al.* 2007).

Tableau 10. Modulations des cinétiques protéiques associées au diabète de type 2

A. En conditions basales ou postabsorptives

Effet du T2DM ¹	Groupes comparés	références
Sur la synthèse protéique corporelle totale		
↗	♂ obèses avec vs sans T2DM	Gougeon <i>et al.</i> , 2008
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Luzi <i>et al.</i> , 1993
=	♂ avec vs sans T2DM	Tessari <i>et al.</i> , 2005
=	♂/♀ obèses avec ou sans T2DM	Halvatsiotis <i>et al.</i> , 2002
Sur la dégradation protéique corporelle totale		
↗	♂ obèses avec vs sans T2DM	Gougeon <i>et al.</i> , 2008
↗	♂/♀ avec vs sans T2DM	Denne <i>et al.</i> , 1995
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Luzi <i>et al.</i> , 1993
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Biolo <i>et al.</i> , 1992b
=	♂ avec vs sans T2DM	Barazzoni <i>et al.</i> , 2003
=	♂/♀ obèses avec vs sans T2DM	Halvatsiotis <i>et al.</i> , 2002
=	♀ obèses avec vs sans T2DM	Staten <i>et al.</i> , 1986
Sur le FSR musculaire		
=	♂/♀ obèses avec vs sans T2DM	Halvatsiotis <i>et al.</i> , 2002

B. En conditions hyper-insulinémiques et hyper-aminoacidémiques

Effet du T2DM ²	Groupes comparés	Schéma expérimental	références
Sur la stimulation de la synthèse protéique corporelle totale			
=	♀ obèses avec vs sans T2DM	Clamp hyper-I et iso-AA	Pereira <i>et al.</i> , 2008
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Boisson à base de glucides & protéines	Manders <i>et al.</i> , 2008
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Boisson à base de glucides & protéines	Manders <i>et al.</i> , 2008
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Clamp hyper-I et perfusion AA	Luzi <i>et al.</i> , 1993
↘	♂ obèses avec vs sans T2DM	Clamp hyper-I et iso-AA	Pereira <i>et al.</i> , 2008
Sur l'inhibition de la dégradation protéique corporelle totale			
=	♂ obèses avec vs sans T2DM	Clamp hyper-I et iso-AA	Pereira <i>et al.</i> , 2008
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Boisson à base de glucides & protéines	Manders <i>et al.</i> , 2008
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Repas mixte contenant 18% d'AA	Biolo <i>et al.</i> , 1992b
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Clamp hyper-I et perfusion AA	Luzi <i>et al.</i> , 1993
=	♂ avec vs sans T2DM	Clamp hyper-I et iso-AA	Barazzoni <i>et al.</i> , 2003
Sur la stimulation du FSR musculaire			
=	♂/♀ avec vs sans T2DM	Boisson à base de glucides & protéines	Manders <i>et al.</i> , 2008

T2DM, diabète de type 2 ; FSR, taux de synthèse fractionnaire ; AA, acides aminés; hyper-I, hyperinsulinémique; iso-AA, isoaminoacidémique ; ♂, homme ; ♀, femme. ¹ le signe "=" indique une absence d'effet du T2DM (i.e. valeurs identiques entre les 2 groupes pour le paramètre considéré) et le signe "↗" indique une augmentation du paramètre considéré chez les sujets avec un T2DM ; ² le signe "=" indique stimulation ou un inhibition identique dans les 2 groupes (i.e. absence d'effet du T2DM pour le paramètre considéré) et le signe "↘" indique une diminution de la stimulation chez les sujets avec un T2DM.

Tableau 11. Modulations des cinétiques protéiques associées à l'obésité**A. En conditions basales ou postabsorptives**

Effet obésité ¹	Groupes comparés		Métabolisme du glucose ²	référence
Sur la synthèse protéique corporelle totale				
↗	♀ obèses vs non obèses		=	Chevalier <i>et al.</i> , 2005
↘	♂ obèses vs non obèses		=	Guillet <i>et al.</i> , 2009
=	♀ obèses vs non obèses		≠	Solini <i>et al.</i> , 1997
=	♀ / ♂ obèses vs non obèses		≠	Luzi <i>et al.</i> , 1996
Sur la dégradation protéique corporelle totale				
↗	♀ obèses vs non obèses		=	Chevalier <i>et al.</i> , 2005
=	♀ obèses vs non obèses		ND	Patterson <i>et al.</i> , 2002
=	♂ obèses vs non obèses		=	Guillet <i>et al.</i> , 2009
=	♀ obèses vs non obèses		=	Jensen <i>et al.</i> , 1991
=	♀ obèses vs non obèses		≠	Solini <i>et al.</i> , 1997
=	♀ / ♂ obèses vs non obèses		≠	Luzi <i>et al.</i> , 1996
Sur le FSR musculaire				
↗	Rats adaptés à un régime HF-HC vs. régime standard		ND	Chanseau <i>et al.</i> , 2007
↗	Rats adaptés à un régime HF vs. régime standard		ND	Estornell <i>et al.</i> , 1994
=	Rats adaptés à un régime HF-HC vs. régime standard		=	Adechian <i>et al.</i> , 2009
=	Souris adaptées à un régime HF-LC vs. régime LF-HC		≠	Anderson <i>et al.</i> , 2008
=	Rats Zucker obèses vs. non obèses		ND	Fluckey <i>et al.</i> , 2000
↘	♂ obèses vs non obèses		=	Guillet <i>et al.</i> , 2009

B. En conditions hyper-insulinémiques et/ou hyper-aminoacidémiques

Effet obésité ¹	Groupes comparés	Schéma expérimental	Métabolisme du glucose ²	référence
Sur la stimulation de la SP corporelle totale				
↘	♀ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I	=	Chevalier <i>et al.</i> , 2005
=	♂ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I & hyper-AA	=	Guillet <i>et al.</i> , 2009
=	♀ / ♂ obèses vs non obèses	Clamp hyper-AA	≠	Luzi <i>et al.</i> , 1996
Sur l'inhibition de la DP corporelle totale				
=	♀ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I	=	Chevalier <i>et al.</i> , 2005
=	♂ obèses (obésité ginoïde) vs non obèses	Clamp hyper-I	=	Jensen <i>et al.</i> , 1991
=	♀ / ♂ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I (faible dose)	≠	Luzi <i>et al.</i> , 1996
↘	♀ / ♂ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I (forte dose)	≠	Luzi <i>et al.</i> , 1996
↘	♂ obèses (obésité abdominale) vs non obèses	Clamp hyper-I	=	Jensen <i>et al.</i> , 1991
↘	♂ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I et hyper-AA	=	Guillet <i>et al.</i> , 2009
Sur la stimulation du FSR musculaire				
=	♂ obèses vs non obèses	Clamp hyper-I et hyper-AA	=	Guillet <i>et al.</i> , 2009
↘	Souris obèses vs non obèses	régime HF-LC vs. régime LF-HC	≠	Anderson <i>et al.</i> , 2008

FSR, taux de synthèse fractionnaire ; AA, acides aminés ; HF, riche en lipides ; LF, pauvre en lipides ; LC, pauvre en glucides ; HC, riche en glucides ; ND, non déterminé. ¹ le signe "=" indique l'absence d'effet de l'obésité (i.e. valeurs identiques entre les 2 groupes) et les signes "↗" et "↘" indiquent respectivement une augmentation et une diminution du paramètre considéré chez les sujets obèses ; ² les signes "=" et "≠" indiquent que le métabolisme du glucose est respectivement non altéré ou altéré (i.e. les individus sont insulino-résistants : hyperglycémie à jeun et/ou altération de la tolérance au glucose) chez les individus obèses.

Le recyclage entéro-hépatique pourrait également être modifié lors de l'obésité : la quantité d'urée hydrolysée en proportion de l'urée produite serait augmentée chez des personnes obèses, en partie en relation avec la proportion plus importante de masse grasse (Child *et al.* 1997).

- Effet de l'obésité sur la régulation des cinétiques protéiques corps-entier ou tissulaires lors du passage à l'état nourri

Il est souvent considéré que l'action anabolique normale de l'insuline en phase postprandiale, via la stimulation de SP et l'inhibition de DP qu'elle induit lors du passage à l'état nourri en présence d'une HA, serait altérée lors de l'obésité mais cette hypothèse est encore largement controversée. Au niveau corps-entier, la SP serait normalement stimulée chez des sujets obèses par une HA seule et par une HA associée à une HI (Luzi *et al.* 1996; Guillet *et al.* 2009) alors que la DP serait moins inhibée par une HA associée à une HI chez des sujets obèses que chez des sujets non obèses (Guillet *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent une résistance à l'action anti-protéolytique de l'insuline chez les sujets obèses en phase postprandiale. Cependant, les données concernant l'effet de l'insuline seule sur les cinétiques protéiques lors de l'obésité, obtenues par la détermination des variations de ces cinétiques lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique chez des sujets obèses, sont contradictoires. Selon les études, la DP corporelle totale serait soit normalement inhibée (Chevalier *et al.* 2005; Solini *et al.* 1997; Luzi *et al.* 1996) soit plus faiblement inhibée par une HI seule (Luzi *et al.* 1996; Jensen & Haymond 1991) chez des sujets obèses. L'effet inhibiteur dépendrait, d'une part de la dose d'insuline perfusée, une faible dose ne permettant pas une inhibition normale de la DP contrairement à une plus forte dose (Luzi *et al.* 1996), et d'autre part de la forme de l'obésité, une obésité abdominale induisant une moindre inhibition de la DP par l'insuline contrairement à une obésité ginoïde (Jensen & Haymond 1991). Des résultats divergents ont également été obtenus concernant l'effet de l'insuline sur la stimulation de la SP, avec soit une stimulation identique chez des sujets obèses et non obèses (Solini *et al.* 1997), soit une stimulation plus faible chez les sujets obèses (Chevalier *et al.* 2005). En ce qui concerne plus spécifiquement le muscle, il a été rapporté, selon les études, une stimulation soit normale (Guillet *et al.* 2009; Adechian *et al.* 2009) soit atténuée (Anderson *et al.* 2008) du renouvellement protéique en condition d'HI et d'HA conjointes lors de l'obésité (Figures 28 & 29).

Ces données et conclusions divergentes ne permettent pas de conclure quant aux modulations des cinétiques protéiques associées à l'obésité. Ces divergences sont vraisemblablement dues au fait que les altérations du métabolisme protéique chez les sujets obèses pourraient également ou principalement être liées à d'autres facteurs et dysfonctions métaboliques associés, telles que l'IR et l'inflammation, l'absence ou la présence de ces dysfonctions selon les individus et les études constituant un facteur important non contrôlé de variation qui expliquerait les résultats contradictoires. Le fait que le maintien de l'effet anti-protéolytique normal de l'insuline chez l'obèse requière des doses supérieures d'insuline (Luzi *et al.* 1996) prouve le rôle clé du niveau d'IR dans les dysrégulations du métabolisme protéique liées à l'obésité, et le caractère confondant de la non maîtrise de ce facteur (Guillet *et al.* 2011). Par ailleurs, l'implication du statut inflammatoire dans les perturbations du métabolisme protéique a été mis en

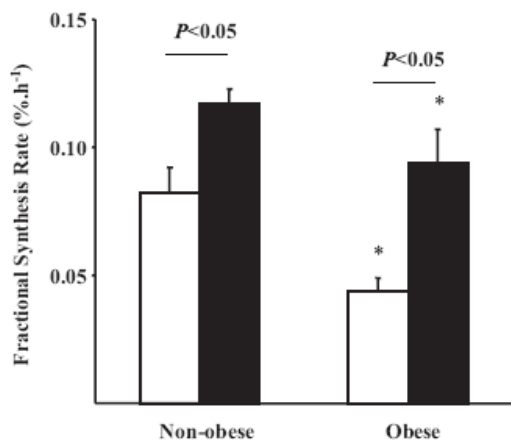


Figure 28. Effet de l'obésité sur le renouvellement protéique musculaire en phases postabsorptive et postprandiale chez l'homme.

Le FSR des P musculaires totales a été mesuré chez des sujets non obèses et chez des sujets obèses, en phase postabsorptive (barres blanches) et lors d'un clamp hyperinsulinémique, euglycémique et hyperaminoacidémique (barres noires).

→ Le FSR musculaire est diminué chez l'obèse à l'état postabsorptif comme à l'état postprandial, mais la stimulation du FSR lors du passage à l'état nourri est similaire chez les sujets obèses par rapport aux sujets non-obèses.

D'après Guillet et al. (2009)

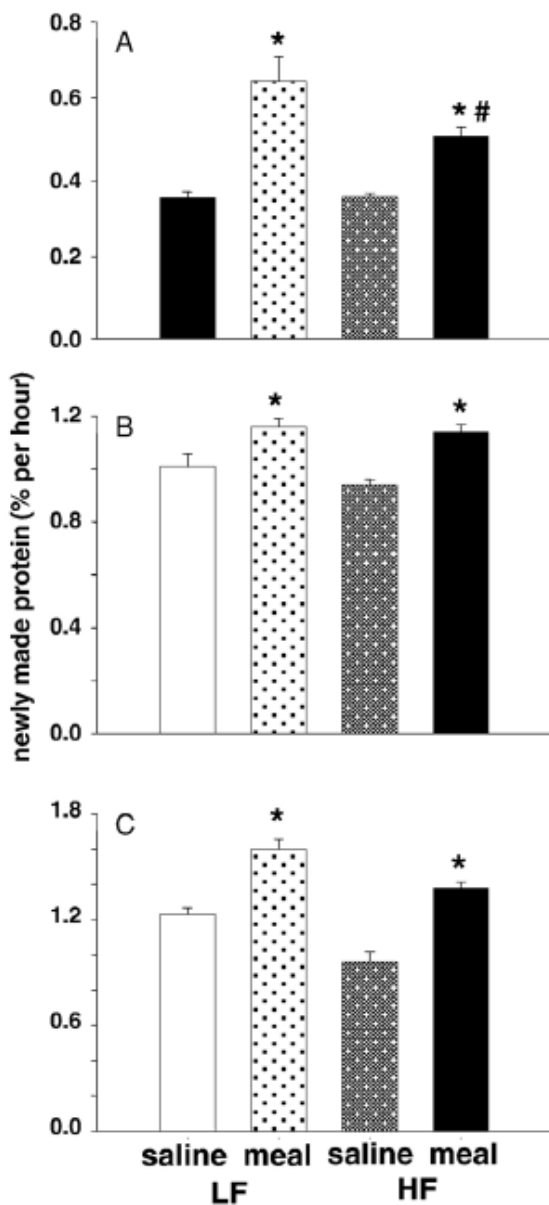


Figure 29. Effet de l'obésité sur le renouvellement protéique en phases postabsorptive et postprandiale chez la souris.

Les FSR des P musculaires (A), hépatiques (B) et plasmatiques (C) ont été mesurés en phases postabsorptive (saline) et postprandiale (meal) chez des souris ayant été nourries pendant 9 semaines avec un régime pauvre en lipides (LF, 10% lipides) ou riche en lipides (HF, 45% lipides).

* effet phase postabsorptive vs phase postprandiale ($P < 0,05$); # effet du régime en phase postprandiale ($P < 0,05$).

→ L'obésité, induite par voie nutritionnelle, atténue la stimulation du FSR musculaire lors du passage à l'état nourri, sans altérer ses valeurs basales, tandis qu'elle diminue légèrement les FSR hépatiques et plasmatiques postabsorptifs mais ne modifie pas leur stimulation en réponse à l'ingestion d'un repas.

D'après Anderson et al. (2008)

évidence chez des rats âgés, la stimulation postprandiale de la SP musculaire étant fortement diminuée chez des rats présentant une inflammation à bas bruit par rapport à des rats ayant un statut inflammatoire normal (Balage *et al.* 2010). Quelques résultats montrent néanmoins un lien direct entre adiposité et altérations du métabolisme protéique. Il a par exemple été mis en évidence une corrélation inverse entre le FSR musculaire postabsorptif et la masse grasse (Guillet *et al.* 2009) ainsi qu'entre les variations de la SP corporelle totale en réponse à une perfusion d'insuline et le rapport taille-hanche chez la femme (Pereira *et al.* 2008), et entre la DP et la SP corporelles totales lors d'une HI et la masse de graisse viscérale (Solini *et al.* 1997) (Figure 30).

- Effet de l'obésité sur le métabolisme et les flux d'échanges d'AA

De même que pour le diabète de type 2, l'obésité est associée à des concentrations plasmatiques plus élevées d'AACR, mais également des AA soufrés. Cette modification pourrait être due à une diminution de l'utilisation et de l'oxydation par les tissus de ces AA, une diminution de l'activité des enzymes impliquées dans le catabolisme oxydatif des AACR ayant été mise en évidence dans le foie et le tissu adipeux chez des individus obèses (Adams 2011). Par ailleurs, au niveau musculaire, l'obésité semble altérer les réponses hémodynamiques à l'insuline (Rattigan *et al.* 2007; Kubota *et al.* 2011) : une inhibition de l'augmentation du débit sanguin et du recrutement des capillaires sanguins normalement induits par l'insuline a été mise en évidence chez des sujets obèses (Clerk 2006; Keske *et al.* 2009) et chez des rats Zucker obèses (Wallis *et al.* 2002) (Figure 31). Ces altérations pourraient affecter les transferts d'AA au niveau musculaire.

Ainsi, en raison de la forte disparité des résultats et du faible nombre d'études à l'échelle tissulaire, qui concernent en outre quasi exclusivement le muscle, les altérations du métabolisme des P et AA dans des situations pré-pathologiques induites par l'alimentation comme le syndrome métabolique sont encore mal caractérisées.

En conclusion, notre compréhension actuelle de la régulation du métabolisme protéique au niveau corps-entier ou tissulaire dans différentes conditions nutritionnelles ou physiologiques est principalement basée sur des mesures de taux de synthèse et dégradation protéiques, qui sont soit des mesures globales, c'est-à-dire réalisées à l'échelle du corps entier, soit des mesures régionales isolées, réalisées à l'échelle tissulaire. De plus, les diverses techniques développées pour l'étude du métabolisme azoté, qui sont majoritairement des méthodes basées sur l'utilisation de traceurs isotopiques des AA, ont conduit à l'obtention de données sur des systèmes souvent isolés et il existe encore peu de données quantitatives sur les flux d'échanges entre organes ou sur des mesures de flux multi-tissus simultanées et intégrées à l'échelle de l'organisme. Malgré l'intérêt notable et prometteur du recours à la modélisation compartimentale dans cette optique, aucun modèle prédictif du métabolisme azoté corporel et des différents flux inter- et intra-organes d'azote total (alimentaire et endogène), au cours des phases postprandiales et postabsorptives, n'a encore été développé, et ceci en raison des limites méthodologiques pour l'obtention des données expérimentales nécessaires au développement d'un tel

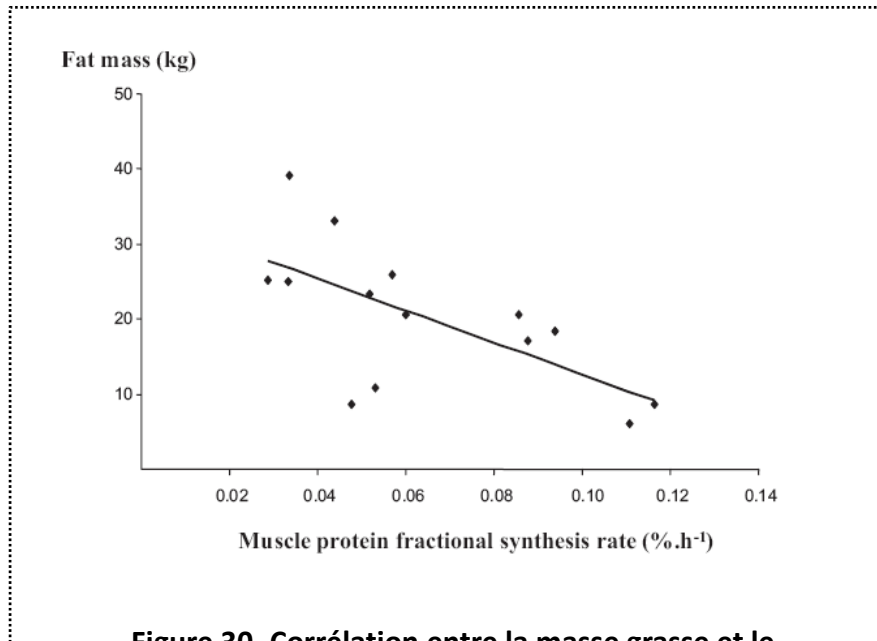


Figure 30. Corrélation entre la masse grasse et le renouvellement protéique musculaire chez l'homme.
D'après Guillet et al. (2009)

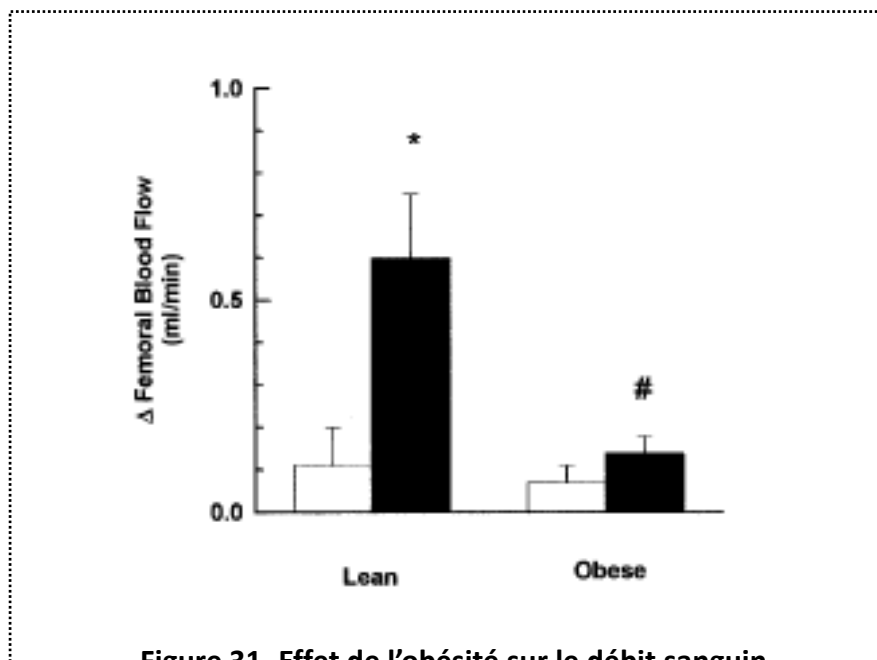


Figure 31. Effet de l'obésité sur le débit sanguin au niveau musculaire chez le rat.

La variation du débit sanguin dans l'artère fémorale en réponse à une administration intraveineuse d'insuline (barres noires) ou d'une solution saline (barres blanches, témoins) a été mesurée chez des rats non-obèses vs obèses. * effet administration insuline; # effet de l'obésité.

→ L'augmentation du débit sanguin musculaire, induite par l'insuline, est inhibée chez des individus obèses.

D'après Wallis et al. (2002)

modèle. Ainsi, il manque actuellement de méthodes permettant d'étudier le fonctionnement intégré de l'ensemble des processus métaboliques, et plus particulièrement ses régulations homéostatiques et ses modulations en fonction des conditions nutritionnelles et physio-pathologiques, qui sont encore mal comprises.

**B. LES ABONDANCES ISOTOPIQUES NATURELLES DE L'AZOTE :
**QUELLES INFORMATIONS PEUVENT-ELLES NOUS APPORTER SUR LE MÉTABOLISME PROTÉIQUE
 ET LES FLUX D'AZOTE DANS L'ORGANISME ?****

Les isotopes stables de l'azote sont largement utilisés en nutrition, métabolisme et physiologie pour l'estimation de différents flux azotés, et notamment des cinétiques protéiques, à travers les techniques de traceurs métaboliques, qui consistent à introduire dans l'organisme des composés azotés (AA, urée...) artificiellement enrichis en ^{15}N afin de suivre leurs transferts et/ou transformations métaboliques. Lors de l'utilisation de ces méthodes, les teneurs relatives en ^{15}N mesurées dans les pools suivis sont très élevées du fait de l'incorporation de ces traceurs fortement enrichis en ^{15}N . À l'état naturel, le ^{15}N est néanmoins présent dans l'organisme mais en très faibles quantités, si bien que les abondances isotopiques naturelles de l'azote sont faibles par rapport aux abondances obtenues lors de l'utilisation de traceurs isotopiques. Ces abondances naturelles sont fortement dépendantes du régime alimentaire mais varient de manière notable selon les tissus, selon les individus et également selon les conditions physio-pathologiques. Si ces variations inter-tissulaires et inter-individuelles des abondances naturelles en ^{15}N ont été très peu étudiées en nutrition, où seules les méthodes traceurs avec des niveaux artificiels d'enrichissement sont utilisées, elles ont, à l'inverse, été largement exploitées en écologie animale, par exemple pour évaluer le régime alimentaire et le statut nutritionnel des individus. En effet, ces abondances naturelles, en tant que paramètres intrinsèques des différents composés azotés, sont susceptibles de traduire l'état des flux azotés intra- et inter-organes et pourraient ainsi fournir une image plus intégrée du métabolisme azoté et de ses modulations dans des conditions nutritionnelles ou physio-pathologiques particulières. Cependant, l'utilisation actuelle des abondances isotopiques naturelles de l'azote est basée principalement sur une approche phénoménologique et les mécanismes responsables de leurs variations n'ont été que très peu explorés et restent encore largement méconnus, limitant leur interprétation en termes de fonctionnement du métabolisme azoté.

Dans cette partie, après avoir défini les notations utilisées pour les abondances naturelles et les phénomènes de fractionnement isotopique, nous montrerons, à partir des données bibliographiques, que les abondances isotopiques naturelles de l'azote, observées dans un organisme ou un tissu, résultent de divers processus métaboliques et sont étroitement liées au métabolisme azoté, et que de ce fait leurs variations peuvent constituer des marqueurs de l'impact métabolique de conditions nutritionnelles ou physio-pathologiques particulières. Nous mettrons également en évidence comment le recours à la modélisation mathématique permet d'extraire de ces abondances isotopiques des informations sur les flux et le métabolisme azotés, offrant ainsi des perspectives intéressantes pour leur utilisation en nutrition et métabolisme.

I. Abondances isotopiques naturelles et fractionnement isotopique : définitions, notations et principes généraux

I.1. Définitions, notations et méthodes de mesure

Deux isotopes d'un élément chimique sont deux atomes ayant le même nombre de protons mais un nombre de neutrons différent. Deux isotopes se distinguent donc par leur masse atomique différente. L'azote possède naturellement deux isotopes stables : le ^{14}N et le ^{15}N . L'isotope léger (^{14}N) est largement majoritaire, alors que l'isotope lourd (^{15}N) est plus rare mais présent naturellement dans tous les organismes à hauteur de 0,36% en moyenne. Il existe néanmoins des différences de teneur en ^{15}N entre les organismes ou composés biologiques.

La composition isotopique d'un échantillon peut être définie par son ratio isotopique R, qui correspond au rapport entre la quantité d'isotope lourd et la quantité d'isotope léger dans l'échantillon, ou par son abondance isotopique fractionnaire F, qui représente la quantité relative d'isotope lourd par rapport à la quantité d'azote total dans l'échantillon, selon les relations :

$$R = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \quad \text{et} \quad F = \frac{^{15}\text{N}}{(^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})}$$

Cependant, le ^{15}N étant largement minoritaire, les différences d'abondances isotopiques naturelles mesurées entre composés biologiques sont très faibles et sont généralement détectables seulement au niveau des 3^{ème} ou 4^{ème} décimales lorsqu'elles sont exprimées avec les notations F et R. Par conséquent, la composition isotopique d'un échantillon, pour des niveaux d'abondances naturelles, est classiquement exprimée par son enrichissement isotopique, défini comme la variation de la teneur relative en isotope lourd vs. léger dans l'échantillon par rapport à un standard de référence (l'air atmosphérique) et noté $\delta^{15}\text{N}$ (delta, exprimé en ‰).

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{échantillon}} - (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}} = \frac{R_{\text{échantillon}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}}$$

Pour l'azote, le matériel de référence (standard isotopique) est le N_2 atmosphérique ($R=0,0036765$, $\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰}$) et la plupart des composés biologiques présentent des $\delta^{15}\text{N}$ entre -30 et 30 ‰. Un échantillon est dit « enrichi en ^{15}N » si son $\delta^{15}\text{N}$ est positif et à l'inverse « appauvri en ^{15}N » si celui-ci est négatif.

La mesure des enrichissements isotopiques en abondance naturelle est réalisée par des techniques de spectrométrie de masse à ratio isotopique (IRMS), qui sont les seules techniques suffisamment sensibles et précises pour permettre la détection de différences de composition isotopique entre échantillons à des niveaux d'abondance naturelle. Le spectromètre de masse à ratio isotopique peut être associé à un analyseur élémentaire (EA) ou à un système de chromatographie gazeuse et de combustion (GC-C). Le couplage EA-IRMS, qui est le plus couramment utilisé, permet de séparer les atomes de carbone, azote, soufre, oxygène et hydrogène et donc de mesurer les enrichissements isotopiques globaux de chacun de ces atomes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$, $\delta^2\text{H}$ et $\delta^{18}\text{O}$) dans l'échantillon (Annexe 7). La séparation en amont des différents composés azotés (AA, P, urée ...) par des méthodes biochimiques permet de doser plus spécifiquement l'enrichissement en ^{15}N dans ces différentes fractions

azotées. Le couplage GC-C-IRMS permet de mesurer les enrichissements isotopiques naturels au niveau moléculaire, par exemple le $\delta^{15}\text{N}$ spécifique de certains AA.

I.2. Fractionnement et effet isotopiques

I.2.i. Définitions et notations

De nombreux processus biochimiques catalysés par des enzymes sont sensibles à la légère différence de masse entre les deux isotopes de l'azote : ce phénomène est appelé « effet isotopique ». En général le ^{14}N est utilisé préférentiellement ou réagit plus rapidement que le ^{15}N car l'énergie de dissociation d'une liaison intramoléculaire impliquant l'isotope léger est plus faible que celle d'une liaison impliquant l'isotope lourd. La différence de comportement entre les deux isotopes au cours de processus biochimiques conduit à des différences de composition isotopique entre les substrats et les produits de ces réactions. La différence d'enrichissement isotopique entre espèces chimiques résultant d'un effet isotopique est définie comme le fractionnement isotopique (Figure 32).

Si le fractionnement isotopique est nécessairement la conséquence d'un effet isotopique, l'existence d'un effet isotopique ne conduit pas systématiquement à un fractionnement isotopique observable. Deux conditions doivent être satisfaites pour qu'un effet isotopique associé à une réaction induise un fractionnement isotopique observable entre le substrat et le produit de cette réaction. La première est que cet effet isotopique soit suffisamment important pour induire une différence d'enrichissement isotopique détectable par la méthode de mesure utilisée. La deuxième est que la réaction soit incomplète. En effet, si la réaction est complète, tous les atomes du substrat seront convertis en produit, et par conséquent la composition isotopique finale du produit sera identique à celle initiale du substrat : un fractionnement isotopique, visible au cours de la réaction, ne sera plus visible à la fin (Hayes 2001; Schoeller 1999).

Il existe deux types d'effet isotopique :

- L'effet isotopique cinétique est associé à une réaction irréversible dont la vitesse d'avancement est sensible à la masse atomique des substrats, les molécules contenant l'isotope léger réagissant généralement plus vite que celles contenant l'isotope lourd.
- L'effet isotopique d'équilibre est associé à une réaction réversible et induit généralement l'accumulation préférentielle de l'isotope lourd dans le constituant chimique possédant l'énergie de liaison la plus forte, une fois l'équilibre réactionnel atteint.

Comme présenté en détails dans l'Annexe 8, l'effet isotopique associé à une réaction biochimique est classiquement exprimé et quantifié par un facteur de fractionnement isotopique noté α ou ϵ . Le facteur α est défini, pour toute transformation d'un substrat S en produit P, comme le rapport entre le ratio isotopique du produit instantané de la transformation (R_{Pi}) et le ratio isotopique du substrat et est également généralement égal au rapport entre les constantes de vitesse de chacun des isotopes au cours de la réaction (Hayes 2002) :

$$\alpha_{\text{P/S}} = \frac{R_{\text{Pi}}}{R_{\text{S}}} = \frac{{}^{15}\text{k}_{\text{P/S}}}{{}^{14}\text{k}_{\text{P/S}}}$$

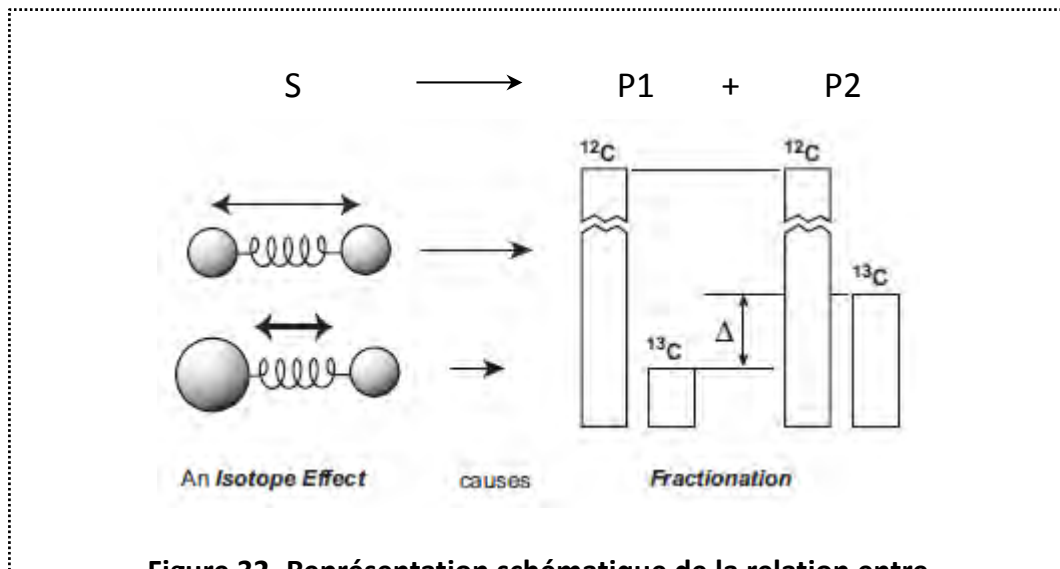


Figure 32. Représentation schématique de la relation entre l'existence d'un effet isotopique et l'observation d'un fractionnement isotopique.

L'effet isotopique associé à la réaction de transformation du substrat S en produits P1 et P2 entraîne un fractionnement isotopique entre P1 et P2, c.-à-d. une teneur relative différente en isotope lourd (ici le ^{13}C) dans P1 et P2.

D'après Hayes et al. (2002)

Cependant, pour des raisons de praticité, le facteur de fractionnement associé à une voie métabolique est plus couramment représenté par la notation ϵ , définie à partir des enrichissements isotopiques du substrat et du produit instantané, exprimés en δ ($\delta^{15}\text{N}_S$ et $\delta^{15}\text{N}_{Pi}$, respectivement), selon la relation

$$\epsilon_{P/S} = \delta^{15}\text{N}_{Pi} - \delta^{15}\text{N}_S.$$

Un facteur de fractionnement ϵ négatif, équivalant à un α inférieur à 1, indique une utilisation préférentielle ou une réaction plus rapide des molécules contenant l'isotope léger par rapport à celles contenant l'isotope lourd au cours de la transformation, ce qui conduit à un appauvrissement du produit par rapport au substrat. À l'inverse, un facteur de fractionnement ϵ positif (ou α supérieur à 1) indique que la transformation des molécules contenant l'isotope lourd est favorisée, ce qui conduit à un enrichissement relatif du produit par rapport au substrat. Le détail des relations entre les notations α et ϵ est présenté dans l'Annexe 8.

1.2.ii. Effets isotopiques associés aux réactions chimiques impliquées dans le métabolisme azoté

Plusieurs réactions biochimiques du métabolisme azoté sont potentiellement discriminantes vis à vis des isotopes stables de l'azote (Tableau 12). C'est le cas notamment de la plupart des réactions enzymatiques impliquant la fonction amine, car les enzymes ont généralement une affinité plus forte pour les groupements amines contenant l'isotope léger et favorisent leur transfert. Plus précisément, des effets isotopiques ont été mis en évidence, *in vitro*, lors des réactions de transamination, telles que le transfert d'un groupement amine du glutamate à l'oxaloacétate pour former de l'aspartate et de l' α -cétoglutarate (Macko *et al.* 1986), et lors des réactions de d'amidation ou de désamidation, telles que celles impliquées dans la synthèse et la dégradation de glutamine à partir du glutamate (Handley & Raven 1992). Des effets isotopiques ont également été rapportés pour certaines réactions enzymatiques participant au cycle de l'urée, telles que la formation d'ornithine et d'urée à partir de l'arginine catalysée par l'arginase, et pour l'hydrolyse de l'urée, catalysée par l'uréase (Werner & Schmidt 2002). Il est ainsi généralement admis que de nombreuses réactions participant au métabolisme des AA et de l'urée, et plus particulièrement aux transferts du groupement amine entre ces composés, sont sensibles aux différents isotopes de l'azote et que le fractionnement associé à ces réactions contribue vraisemblablement aux différences d'enrichissement isotopique observées entre les différents AA et les produits de dégradation du métabolisme azoté, c.-à-d. l'ammoniaque et l'urée. Les effets isotopiques lors de ces réactions de transferts de groupements amines favorisant l'utilisation et le départ préférentiels de ^{14}N depuis les pools précurseurs, les fractions rémanentes de précurseurs non transformés pourraient ainsi s'enrichir en ^{15}N . Par exemple, le glutamate endogène, qui est un précurseur important des transaminations et désaminations, est enrichi par rapport aux autres AA ainsi qu'au glutamate alimentaire (Hare *et al.* 1991; Macko *et al.* 1986; Gannes *et al.* 1998).

En revanche, les données disponibles sont trop parcellaires et contradictoires pour pouvoir conclure en l'existence d'un effet isotopique associé aux réactions impliquées dans la synthèse (SP) et la dégradation (DP) protéiques. Concernant l'effet isotopique associé à la SP, des études ont montré que l'étape d'élongation peptidique, catalysée par la peptidyl transférase, au niveau ribosomial, privilégierait

Tableau 12. Effets isotopiques mesurés dans la littérature et associés à différentes réactions impliquées dans le métabolisme de l'azote

Réaction	Effecteur	α^1	ϵ^2	Organisme source	Méthode d'étude	Référence
Transaminations						
glutamate + oxaloacetate → α -cétooglutarate + aspartate	Oxaloacetate glutamate aminotransferase	0,9918	-8,2	Porc	<i>In vitro</i>	Macko <i>et al.</i> , 1986*
α -cétooglutarate + aspartate → glutamate + oxaloacetate	Oxaloacetate glutamate aminotransferase	0,9983	-1,7	Porc	<i>In vitro</i>	Macko <i>et al.</i> , 1986*
Réactions d'amination / désamination						
NH ₄ ⁺ + 2-oxoglutarate → glutamate	Glutamate déshydrogénase	0,9823 à 0,9903	-17,7 à -9,7	Bœuf (foie)	<i>In vitro</i> (selon pH)	Weiss <i>et al.</i> , 1988**
NH ₄ ⁺ + pyruvate → alanine	Alanine déshydrogénase	0,9878 à 1,0126	-12,2 à 12,6	Bacillus subtilis	<i>In vitro</i> (selon pH)	Weiss <i>et al.</i> , 1988**
glutamate + NH ₄ ⁺ → glutamine	Glutamine synthetase	0,9838	-16,2	Spinacera oleracea†	<i>In vivo</i>	Yoneyama <i>et al.</i> , 1993*
glutamate + NH ₄ ⁺ → glutamine	Glutamine synthetase	0,9877 à 0,9921	-12,3 à -7,9	E. Coli	<i>In vitro</i>	Handley <i>et al.</i> , 2002
Réactions impliquées dans la production d'urée						
Arginosuccinate → arginine + fumarate	Arginosuccinate lyase	1,0036	3,6	Bœuf (foie)	<i>In vitro</i>	Kim <i>et al.</i> , 1986*
Arginine+H ₂ O → ornithine + urea	Arginase	0,9901	-9,9	Veau (foie)	<i>In vitro</i>	Medina <i>et al.</i> , 1982*
Hydrolyse de l'urée						
Urea + H ₂ O → 2NH ₃ + CO ₂	Urease	0,9921	-7,9	Canavalia ensiformis†	<i>In vivo</i>	Medina <i>et al.</i> , 1982*
Synthèse protéique						
Liaison peptidique	Peptidyle transférase	0,9862	-13,8	Synthèse chimique	<i>In vitro</i>	Hillier <i>et al.</i> , 2011
Liaison peptidique	Peptidyle transférase	1,0215	21,5	Synthèse chimique	<i>In vitro</i>	Wallin <i>et al.</i> , 2009
Liaison peptidique	Peptidyle transférase	0,9911	-8,9	E. Coli	<i>In vitro</i>	Seila <i>et al.</i> , 2005
Hydrolyse de liaisons peptidiques						
Dipeptide glycyglycine → 2 glycine	Température (100°C)	0,9960	-4,0	Synthèse chimique	<i>In vitro</i>	Silfer <i>et al.</i> , 1992
Hydrolyse du collagène	Température (50°C) et pH basique	0,9901	-9,8	Bœuf (collagène)	<i>In vitro</i>	Bada <i>et al.</i> , 1989
Utilisation de l'N endogène par la bactérie pour leur propre métabolisme						
NH ₄ → composés bactériens	Bactéries coliques	0,9903	-9,7	Vache (rumen)	<i>In vitro</i>	Wattiaux <i>et al.</i> , 1995

¹ α est calculé comme le rapport entre les constantes de réaction de l'isotope lourd et de l'isotope léger : $k^{15}\text{N}/k^{14}\text{N}$;

² $\epsilon = (\alpha - 1) \cdot 1000$. †espèces végétales ; *cités dans Werner *et al.*, 2002 ; **cités dans Handley *et al.*, 1992.

le ^{15}N (Wallin & Aqvist), ce qui pourrait conduire à un enrichissement en ^{15}N des P formées. D'autres études ont néanmoins montré l'inverse, à savoir une utilisation préférentielle du ^{14}N lors de la formation des liaisons peptidiques au niveau ribosomial (Hiller *et al.* 2011; Seila *et al.* 2005). En ce qui concerne la DP, des études ont mis en évidence un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N lors de l'hydrolyse de liaisons peptidiques, ce qui pourrait conduire à un enrichissement en ^{15}N des P restantes non hydrolysées, mais ceci n'a été étudié que dans certains cas particuliers comme l'hydrolyse de dipeptides par des dipeptidases (Silfer *et al.* 1992) ou l'hydrolyse du collagène (Bada *et al.* 1989) et dans des conditions non physiologiques de température ou de pH.

Par ailleurs, une utilisation préférentielle du ^{14}N a été montrée *in vitro* lors de l'assimilation par les bactéries coliques d'N endogène sous la forme d'ammoniaque mais pas sous la forme d'AA, pour leur propre métabolisme (Wattiaux & Reed 1995).

Il faut cependant noter que la plupart de ces effets isotopiques ont été mesurés *in vitro* et sur des réactions isolées. Or, *in vivo*, plusieurs réactions enzymatiques sont susceptibles de se réaliser séquentiellement ou en parallèle, modifiant les quantités de substrats en cours de réaction et les activités enzymatiques (Werner & Schmidt 2002). Par conséquent, les valeurs rapportées *in vitro* ne peuvent pas être appliquées directement pour l'étude du fractionnement isotopique *in vivo*. Elles démontrent néanmoins le pouvoir discriminant des réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme des AA et de l'urée et les conséquences potentielles en termes de variabilité des abondances isotopiques entre composés azotés.

1.2.iii. Effets isotopiques au sein d'un "réseau" complexe de réactions métaboliques : impact sur les enrichissements isotopiques des différents intermédiaires métaboliques

L'effet isotopique associé à une réaction chimique ou enzymatique particulière peut être facilement isolé et quantifié *in vitro*. Dans un système biologique, en revanche, une voie métabolique est constituée d'un grand nombre de réactions chimiques et enzymatiques se produisant simultanément ou successivement mais souvent étroitement intriquées et indissociables, et l'on ne dispose généralement pas de données suffisamment nombreuses et précises sur les compositions isotopiques des différents intermédiaires chimiques pour permettre d'identifier un fractionnement isotopique à l'échelle d'une réaction. La représentation du fractionnement isotopique sur une voie métabolique est donc simplifiée en agrégeant l'ensemble des effets isotopiques associés aux réactions chimiques ou enzymatiques successives ayant lieu sur cette voie et en considérant un effet isotopique global caractérisé par le fractionnement isotopique observé entre le précurseur et le/les produits de cette voie métabolique. Plus précisément, pour une voie métabolique transformant un précurseur A en un produit B, le fractionnement isotopique associé est quantifié par $\epsilon_{B-A} = \delta_{B-A} - \delta_A$, où δ_A et δ_{B-A} sont les enrichissements isotopiques respectifs du pool précurseur A et de l'azote transféré du compartiment A vers le compartiment B (produit instantané de la voie métabolique).

Le travail de Hayes (Hayes 2001), sur une séquence théorique de réactions, permet de mieux comprendre les relations entre les abondances isotopiques de différents substrats et produits au sein

d'un réseau de réactions, en fonction de la configuration des échanges (Figure 33). Ainsi, il montre que pour des réactions qui se produisent en chaîne (transferts entre les composés métaboliques A, B et C sur la figure 33), les enrichissements isotopiques du précurseur, du produit et des intermédiaires ne diffèrent que s'il existe un effet isotopique sur une ou plusieurs des voies de transfert impliquées. Par contre, à l'état stationnaire élémentaire et isotopique, ces enrichissements isotopiques sont indépendants des vitesses de transfert. A l'inverse, au niveau d'un embranchement métabolique, c'est-à-dire avec la présence de deux voies concurrentes aboutissant à la formation de deux produits différents à partir d'un même substrat (formation de D et E à partir de C dans la figure 33), la composition isotopique dans le pool substrat dépend à la fois des effets isotopiques associés à chacune des deux voies concurrentes et de la distribution relative du flux de transfert du substrat dans chacune de ces voies. Ainsi, selon les notations de Hayes, si l'on note p la proportion relative du substrat C transférée vers D, alors à l'état stationnaire, l'enrichissement isotopique de C dépend de p et des fractionnements isotopiques ϵ_3 et ϵ_4 associés aux réactions produisant respectivement D et E selon la relation suivante : $\delta_C - \delta_2 = p \cdot \epsilon_3 + (1-p) \cdot \epsilon_4$. Le composé C peut donc être enrichi ou appauvri par rapport à son précurseur B ($\delta_B = \delta_2 - \epsilon_2$) et l'amplitude du fractionnement observé entre B et C dépend de p et des effets isotopiques sur les deux voies d'utilisation de C (Figure 34). L'existence d'embranchements dans des réseaux métaboliques conduit à l'observation d'un fractionnement isotopique, à la condition que les deux branches concurrentes soient actives et que les effets isotopiques associés à chaque branche soient différents (Sick *et al.* 1997). Une autre étude similaire portant sur le fractionnement isotopique au cours de la voie de biosynthèse des acides gras chez *E. coli* aboutit aux mêmes conclusions générales (Monson & Hayes 1980).

Ces conclusions théoriques mettent en évidence un point essentiel concernant les relations entre les abondances isotopiques et le métabolisme azoté : l'enrichissement isotopique d'un pool précurseur à partir duquel sont formés plusieurs produits dépend de l'importance relative des flux de transfert vers chacun des produits et des effets isotopiques associés. Ceci montre que, d'une part, les enrichissements isotopiques observés dans différents pools azotés sont capables de traduire l'importance relative des différentes voies métaboliques qui leur sont associées et que, d'autre part, des modulations de la distribution des flux azotés sont susceptibles de modifier les enrichissements isotopiques.

II. Facteurs de variabilité intra et inter-individuelle des abondances isotopiques naturelles et capacité de ces abondances à constituer des signatures de l'impact métabolique de conditions nutritionnelles et physio-pathologiques particulières

Les conclusions de la partie précédente suggèrent que l'existence de phénomènes de fractionnement isotopique à l'échelle moléculaire est théoriquement susceptible d'induire des différences d'abondances isotopiques naturelles entre des composés azotés issus de voies métaboliques différentes. En pratique, il a en effet été observé des variations des abondances isotopiques naturelles de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) entre un individu et son régime alimentaire, entre les tissus d'un même individu et

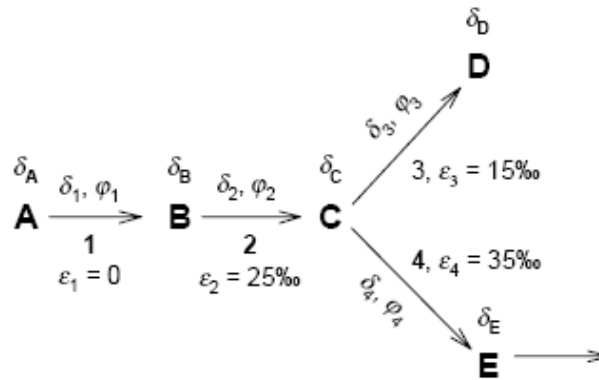


Figure 33. Fractionnement isotopique dans un réseau métabolique théorique.

Les compartiments métaboliques sont désignés par des lettres (A à E) et les réactions (ou composés transitant entre les compartiments) par des chiffres (1 à 4). δ_x indique l'enrichissement isotopique (‰) dans le compartiment x, et δ_i , φ_i et ϵ_i indiquent respectivement l'enrichissement isotopique (‰), le flux de transfert (moles/temps) et le facteur de fractionnement isotopique associés à la réaction i.

D'après Hayes et al. (2001).

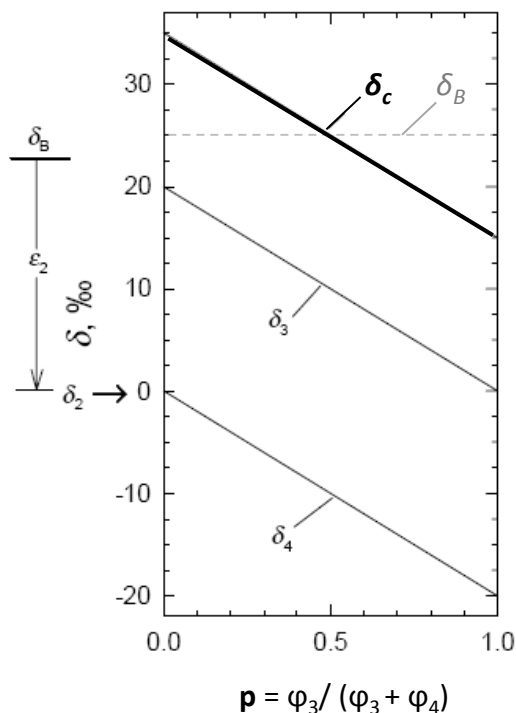


Figure 34. Compositions isotopiques du précurseur et de ses flux d'utilisation au niveau d'un embranchement métabolique.

Les notations correspondent aux notations définies dans la figure C2 : le composé C produit par la réaction 2 peut être transformé en 2 produits selon les voies 3 et 4-, avec φ_3 et φ_4 représentant les flux de transfert sur les voies 3 et 4 respectivement. Les valeurs des enrichissements sont calculés pour $\delta_2 = 0\text{‰}$, $\epsilon_3 = +15$ et $\epsilon_4 = +35$. L'enrichissement isotopique du précurseur C (δ_C) dépend de l'importance relative de ses flux d'utilisation φ_3 et φ_4 ($p = \varphi_3 / (\varphi_3 + \varphi_4)$). Les pentes d'évolution des δ sont négatives dans ce cas car p correspond à la proportion du flux le plus appauvri ($\epsilon_3 < \epsilon_4$) ; ces pentes seraient positives si la voie 3 fractionnait davantage que la voie 4 ($\epsilon_3 > \epsilon_4$), c.-à-d. si p correspondait à la proportion du flux le plus enrichi.

D'après Hayes et al. (2001).

entre différents individus. Dans cette partie, nous montrerons quels sont les facteurs responsables de la forte variabilité des $\delta^{15}\text{N}$ et quelles sont les relations entre ces variations et les modulations du métabolisme azoté.

II.1. Existence d'une discrimination isotopique entre tissus et régime ($\Delta^{15}\text{N}$) en lien avec le catabolisme protéique

II.1.i. Existence d'une discrimination positive entre les tissus et le régime alimentaire

Grâce aux nombreuses données accumulées chez l'animal en écologie, il est désormais parfaitement connu que les $\delta^{15}\text{N}$ des tissus sont supérieurs à celui du régime alimentaire (Vanderklift & Ponsard 2003; Post 2002). Cet enrichissement systématique d'un organisme par rapport à son régime est couramment appelé discrimination isotopique, noté $\Delta^{15}\text{N}$, et défini par :

$$\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{individu ou tissu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{régime}}$$

Plusieurs études anciennes ont montré que cette discrimination était relativement constante entre les individus et les espèces et était en moyenne de 3-4‰ (DeNiro & Epstein 1981; Minagawa & Wada 1984), et une méta-analyse récente la réévalue autour de 3‰ chez les différentes espèces de mammifères (Caut *et al.* 2009) (Figure 35).

II.1.ii. Utilisation de la constance de la discrimination isotopique pour caractériser le régime alimentaire

L'observation d'un enrichissement systématique et relativement constant des individus par rapport à leur régime alimentaire a amené à faire l'hypothèse que les $\delta^{15}\text{N}$ des individus et de leurs tissus étaient principalement déterminés par le $\delta^{15}\text{N}$ du régime et variaient de manière prédictible en fonction de celui-ci. Cette hypothèse a été largement mise à profit en écologie et paléontologie dans deux types d'applications principales : la reconstitution des relations trophiques dans un écosystème et l'étude des régimes alimentaires de populations et espèces actuelles ou disparues. La constance de la discrimination isotopique a conduit à la théorie selon laquelle les $\delta^{15}\text{N}$ des individus augmentent le long de la chaîne trophique, avec, entre chaque niveau trophique, un écart identique et égal au facteur $\Delta^{15}\text{N}$. Par conséquent, le facteur $\Delta^{15}\text{N}$ est souvent également qualifié de saut trophique. La constance de ce saut trophique a été mise à profit par les écologistes pour identifier des relations proies-prédateurs et reconstituer des réseaux trophiques en comparant les $\delta^{15}\text{N}$ entre plusieurs individus au sein d'un écosystème. Un modèle simple a notamment été développé par Post (Post 2002) pour estimer la position trophique d'un individu à partir de mesures d'abondances isotopiques naturelles. La dépendance des $\delta^{15}\text{N}$ des individus vis-à-vis de leur régime a aussi été largement utilisée par les écologues pour reconstituer des régimes alimentaires et mettre en évidence des différences de comportement alimentaire au sein d'une population ou identifier des périodes de changement de régime alimentaire par exemple pendant les migrations (Fleming *et al.* 1993). En effet, les aliments ou régimes alimentaires présentent des abondances isotopiques différentes selon leur nature, les produits animaux étant par exemple plus riches en ^{15}N que les produits végétaux, en raison du saut trophique, et les végétaux de type C4 (telles que le maïs ou l'herbe) étant plus riches en ^{13}C que les végétaux de type C3 (tels que les arbres). Ainsi, les mesures des enrichissements isotopiques dans une population de

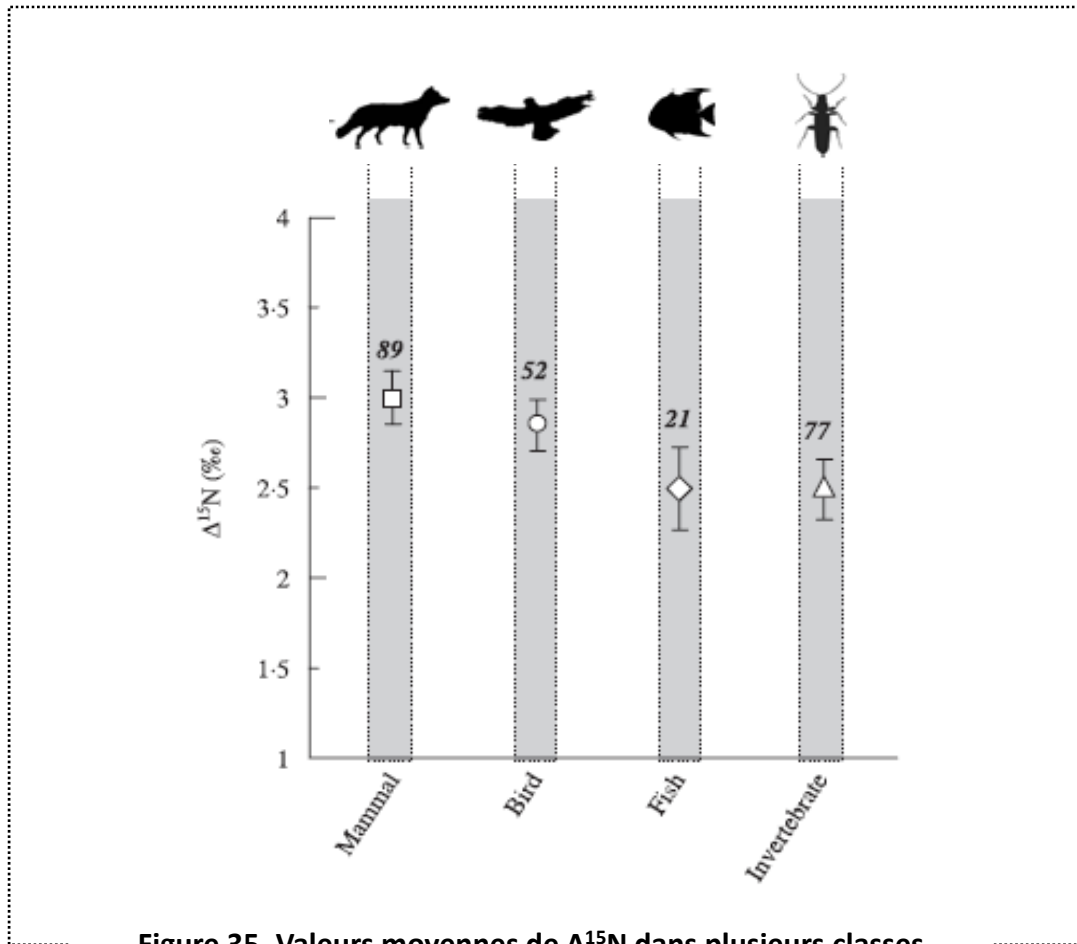


Figure 35. Valeurs moyennes de $\Delta^{15}\text{N}$ dans plusieurs classes taxonomiques.

Le $\Delta^{15}\text{N}$ représente l'enrichissement en ^{15}N des organismes par rapport à leur régime alimentaire. Les valeurs rapportées sont des valeurs moyennes sur différents tissus. Les nombres à l'intérieur des barres indiquent le nombre d'individus.

D'après Caut et al. (2009).

mammifères d'Afrique ont permis de distinguer d'une part les animaux herbivores (ayant des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ plus faibles) des animaux carnivores, et d'autre part les animaux de type « brouteur » se nourrissant majoritairement d'herbe de pâture (ayant des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ inférieures) des animaux se nourrissant de végétaux présents sur les sols des forêts ((Gannes *et al.* 1998), figure 36). L'observation d'une augmentation des enrichissements $\delta^{13}\text{C}$ mesurés sur des vestiges archéologiques humains en Amérique du Nord a permis de mettre en évidence et dater la transition vers un régime à base de maïs chez les Amérindiens (Gannes *et al.* 1998).

Malgré l'utilisation extensive en écologie des mesures de $\delta^{15}\text{N}$ pour la reconstitution de régimes ou comportements alimentaires, peu d'applications semblables ont été développées en nutrition humaine. Quelques études de l'équipe de Petzke *et al.* ont mis en évidence chez l'homme que les $\delta^{15}\text{N}$ des cheveux étaient positivement corrélés à la proportion de P animales vs végétales dans le régime (Petzke *et al.* 2005b), ce qui permet de distinguer les personnes ayant un régime omnivore, qui présentent les $\delta^{15}\text{N}$ les plus élevés, des personnes ayant un régime ovo-lacto-végétarien ou végétalien (Figure 37). Ces observations sont liées au fait que les P animales sont globalement plus riches en ^{15}N que les P végétales. Par ailleurs, il a également été montré chez l'homme que les $\delta^{15}\text{N}$ mesurés dans les cellules sanguines étaient fortement et positivement corrélés avec les concentrations en acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) dans les cellules sanguines, ces concentrations étant des marqueurs validés de la consommation alimentaire de poisson ((O'Brien *et al.* 2009), Figure 38). Ces études montrent que les mesures d'enrichissement isotopique sont susceptibles de constituer des biomarqueurs de l'apport alimentaire en P animales, et plus particulièrement en P de poisson, et pourraient être utilisées pour valider ou compléter des méthodes d'évaluation des consommations alimentaires dans des études cliniques (O'Brien *et al.* 2009; Petzke *et al.* 2005a).

II.1.iii. Interprétation de la discrimination isotopique en lien avec le métabolisme azoté

L'hypothèse couramment émise pour expliquer l'enrichissement systématique en ^{15}N des tissus des individus par rapport à leur régime est celle de l'existence d'un effet isotopique associé à la voie d'élimination de l'azote, principalement urinaire. Cet effet isotopique induirait une excrétion préférentielle d'azote léger dans les urines et par conséquent une accumulation d'azote lourd dans les tissus (Steele & Daniel 1978; Martinez del Rio & Wolf 2005; Martinez del Rio *et al.* 2009). Chez les mammifères, le fractionnement isotopique pourrait avoir lieu au cours des réactions de transaminations, impliquées dans les échanges et transferts d'AA depuis les organes périphériques vers le foie, ou lors des réactions de désamination et de synthèse de l'urée (Schoeller 1999), puisque des effets isotopiques ont été mis en évidence *in vitro* pour chacune de ces réactions enzymatiques (Werner & Schmidt 2002). L'utilisation préférentielle des AA contenant l'isotope léger de l'azote dans ces voies cataboliques conduirait à la production et à l'excrétion d'urée appauvrie en ^{15}N et par conséquent à l'utilisation des AA enrichis en ^{15}N pour les SP tissulaires. Ainsi, l'enrichissement relatif des tissus corporels serait dû à une utilisation différentielle du ^{15}N dans les voies anaboliques et cataboliques du métabolisme azoté. Cette utilisation différentielle est liée à l'organisation structurelle du métabolisme azoté, c'est-à-dire au

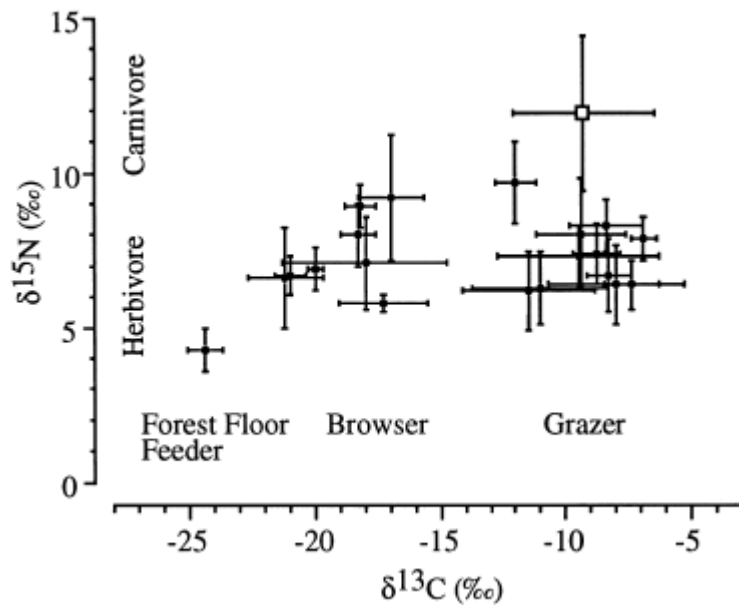


Figure 36. Valeurs moyennes de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ observées dans le collagène des os chez des mammifères d'Afrique de l'Est.

Les mammifères se nourrissant de végétaux présents sur le sol des forêts ("forest floor feeder") et les individus de type "brouetteurs" se nourrissant davantage de feuilles ("browser") ou de plantes fourragères de type C4 ("grazer") se distinguent par leurs valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ (axe horizontal) et les individus carnivores et herbivores se distinguent par leurs valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (axe vertical).

Le carré vide correspond à la moyenne de 10 espèces de carnivores, les ronds pleins représentent les valeurs moyennes de différentes espèces herbivores.

D'après Gannes et al. (1998).

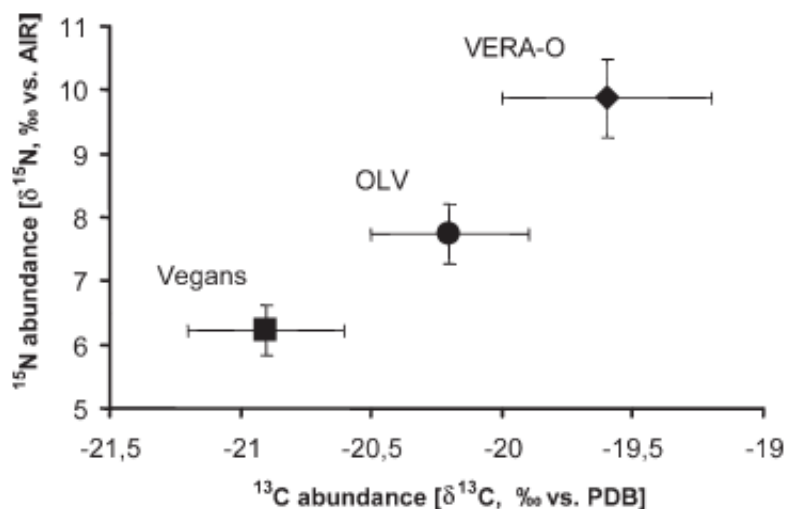


Figure 37. Relations entre le régime alimentaire et les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des cheveux chez l'homme.

VERA-O, individus omnivores (n=99); OLV, individus Ovo-Lacto-Végétarien (n=15); Vegans, individus végétaliens (n=6).

D'après Petzke et al. (2005b).

fait que ses voies anaboliques et cataboliques sont en compétition à partir du même précurseur (c.-à-d. les AA) et que l'azote est majoritairement éliminé à travers une voie métabolique spécifique, qui est celle de la production d'urée. On peut noter à l'inverse que pour le carbone, les enrichissements isotopiques des individus ($\delta^{13}\text{C}$) sont généralement identiques à celui de leur ressource alimentaire. Cette discrimination isotopique nulle pour le carbone ($\Delta^{13}\text{C}$), contrairement à l'azote, pourrait être liée à l'absence de voie spécifique d'élimination du carbone par le métabolisme.

Cette hypothèse d'une excrétion préférentielle de ^{14}N par l'organisme n'a cependant jamais été clairement démontrée. Elle se fonde sur l'observation, dans plusieurs études, d'enrichissements isotopiques plus faibles dans les urines que dans les tissus. La grande majorité des données obtenues chez différentes espèces de mammifères montrent ainsi un appauvrissement en ^{15}N des urines par rapport au régime, avec cependant des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ urinaires très différentes selon les études, de 0 à -5‰ environ (Tableau 13). Cet appauvrissement relatif est généralement interprété par l'existence d'un fractionnement isotopique associé aux réactions de désamination et de synthèse de l'urée (Sutoh *et al.* 1987). A l'inverse, les $\delta^{15}\text{N}$ mesurés dans les fèces sont généralement supérieurs à celui du régime avec une discrimination allant de 0 à 3,5‰ selon les études (Tableau 13), bien qu'une étude chez l'homme rapporte une discrimination isotopique négative dans les fèces pour des régimes à base de poisson (Kuhnle *et al.* 2012). L'enrichissement en ^{15}N des excréta fécaux par rapport au régime serait dû au fait qu'ils sont majoritairement constitués de composés azotés d'origines endogène (mucines, P issues de la desquamation des muqueuses intestinale et colique) ou bactérienne, qui sont eux-mêmes enrichis en ^{15}N par rapport au régime (Sponheimer *et al.* 2003; Sutoh *et al.* 1993; Cheng *et al.* 2011). Par conséquent, bien que les urines soient appauvries en ^{15}N par rapport au régime et constituent la majorité des pertes azotées, le $\delta^{15}\text{N}$ global des excréta, qui peut être estimé en faisant la moyenne pondérée des $\delta^{15}\text{N}$ de l'urine et des fèces, n'est pas systématiquement différent de celui du régime, du fait de l'enrichissement en ^{15}N des fèces. Si cette observation remet en question l'hypothèse d'une excrétion globale préférentielle de ^{14}N pour expliquer l'accumulation de ^{15}N dans les tissus de l'organisme, elle est néanmoins tout à fait cohérente avec le principe de conservation de la masse à l'état stationnaire, selon lequel le fait que les $\delta^{15}\text{N}$ dans les tissus soient constants, nécessite que les enrichissements isotopiques de l'azote ingéré et de l'azote excrété se compensent et soient égaux (Sponheimer *et al.* 2003). Une piste d'explication à la variabilité des $\Delta^{15}\text{N}$ urinaires observés selon les études serait ainsi la variabilité de leurs conditions de croissance et d'anabolisme, qui entraîneraient transitoirement un déséquilibre isotopique entre apports et pertes azotées.

En conclusion, s'il est communément admis, que les individus sont globalement plus riches en ^{15}N que leur régime alimentaire ($\Delta^{15}\text{N} > 0$), les phénomènes chimiques et métaboliques responsables de cette discrimination isotopique positive et de l'accumulation de ^{15}N dans les tissus ne sont pas clairement identifiés. Cette discrimination isotopique semble néanmoins traduire une distinction isotopique entre les composés azotés retenus dans l'organisme et utilisés pour l'anabolisme et ceux catabolisés et éliminés. Par ailleurs, l'hypothèse de la constance de cette discrimination est remise en question par un corpus de données chez l'animal qui montre une forte variabilité inter- et intra-individuelle des $\Delta^{15}\text{N}$,

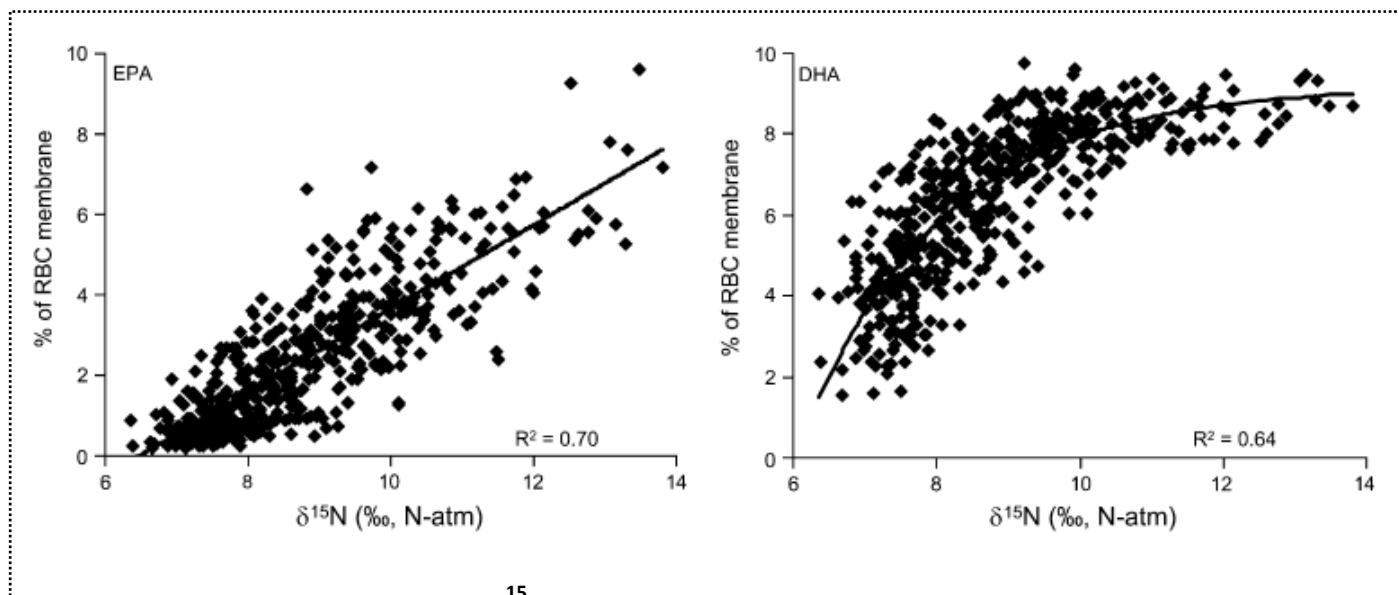


Figure 38. Relation entre les $\delta^{15}\text{N}$ et les concentrations en acides eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA) dans les cellules sanguines (RBC).

D'après O'Brien et al. (2009).

Tableau 13. Comparaison des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ des excréta de plusieurs espèces de mammifères rapportées dans la littérature

Espèce	$\Delta^{15}\text{N}$			n	Références
	urine	fèces	excréta totaux*		
Rongeur	[-2,9 ; -0,9]	[1,4 ; 2,3]		42	Sick <i>et al.</i> , 1997; Hwang <i>et al.</i> , 2007
Porc	-2,6	1,2		3	Sutoh <i>et al.</i> , 1987
Bovin	[-5,3 ; -1,3]	[-0,1 ; 2,5]	[-2,9; 0,1]	51	Cheng <i>et al.</i> , 2011; Sutoh <i>et al.</i> , 1987; Steele <i>et al.</i> , 1978; Knobbe <i>et al.</i> , 2006
Ovin	[-0,2 ; -0,1]	[2,8 ; 3,1]	0,8	8	Sutoh <i>et al.</i> , 1987; Sutoh <i>et al.</i> , 1993
Cheval	[-2 ; -0,1]	[2,6 ; 3,3]	[0,5 ; 0,7]	?	Sponheimer <i>et al.</i> , 2003
Lama	[-2,1 ; -0,3]	3	[0,2 ; 0,4]	8	Sponheimer <i>et al.</i> , 2003
Renne	[-0,74 ; 0,76]	3,66		3	Barboza <i>et al.</i> , 2006
Primate	[-3,9 ; -3,5]			28	Deschner <i>et al.</i> , 2012
Homme	[-1,7 ; -0,3]	[-0,5 ; 1,2]	[-1,6 ; 0,2]	56	Kuhnle <i>et al.</i> , 2012

*les $\Delta^{15}\text{N}$ des excréta totaux ont été calculés comme la moyenne pondérée des $\Delta^{15}\text{N}$ de l'urine et des fèces à partir lorsque les données de répartition des pertes azotées urinaires vs fécales étaient rapportées dans les études. n, nombres d'individus.

indépendamment du $\delta^{15}\text{N}$ du régime. Cette variabilité du $\Delta^{15}\text{N}$ ne semble pas aléatoire mais au contraire dépendre de manière prédictible de facteurs particuliers tels que le type de tissu, la qualité du régime alimentaire, la quantité d'azote ingérée, ou encore de situations physio-pathologiques particulières (Vanderklift & Ponsard 2003; Martinez del Rio *et al.* 2009). Dans les deux parties suivantes, nous considérerons donc principalement les $\Delta^{15}\text{N}$ des individus ou tissus (et non plus les $\delta^{15}\text{N}$, qui, comme nous l'avons montré dans cette partie, dépendent en premier lieu du $\delta^{15}\text{N}$ du régime) et présenterons les facteurs identifiés comme responsables de la variabilité de la discrimination isotopique et les pistes d'explications proposées en relation avec des caractéristiques spécifiques ou des modulations du métabolisme azoté.

II.2. Existence d'une variabilité intra-individuelle, inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ en lien avec la compartimentation et la variabilité régionale du métabolisme azoté

Plusieurs méta-analyses de mesures de $\Delta^{15}\text{N}$ réalisées sur différentes espèces animales ont mis en évidence des différences de $\Delta^{15}\text{N}$ entre les tissus (Figures 39-a&b), avec par exemple un enrichissement plus élevé dans le cerveau et plus faible dans le rein chez le mammifère (Vanderklift & Ponsard 2003; Caut *et al.* 2009). Cependant, étant données les possibles différences du métabolisme tissulaire entre les espèces et les conditions nutritionnelles variables ou mal caractérisées des animaux étudiés, ces comparaisons globales ne permettent pas d'estimer précisément la variabilité inter-tissus des enrichissements isotopiques.

Quelques études ont mesuré simultanément les $\Delta^{15}\text{N}$ dans plusieurs tissus, et leurs données mettent en évidence des différences inter-tissulaires qui semblent similaires chez plusieurs espèces (Tableau 14). Ainsi, il a été observé que le foie était généralement plus riche en ^{15}N que le muscle chez le rat (Caut *et al.* 2008; DeNiro & Epstein 1981; Gaebler *et al.* 1966), chez la souris (Arneson & MacAvoy 2005; Yoneyama *et al.* 1983)), et de façon plus générale chez les mammifères (Sutoh *et al.* 1987; Miller *et al.* 2008; Lee *et al.* 2012; Hobson *et al.* 1996) et chez les oiseaux (Hobson & Clark 1992; Podlesak & McWilliams 2006; Ogden *et al.* 2004; Kempster *et al.* 2007). Néanmoins, une étude rapporte une valeur de $\Delta^{15}\text{N}$ supérieure dans le muscle par rapport au foie chez le renard (Roth & Hobson 2000) et une autre étude ne met pas en évidence de différence significative entre ces deux tissus chez des poissons (truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, et daurade royale, *Sparus aurata*; (Beltran *et al.* 2009)). Il semble également ressortir de ces études que, chez les mammifères, le plasma est plus enrichi en ^{15}N que les autres tissus (Yoneyama *et al.* 1983; Kurle 2009; Roth & Hobson 2000; Lee *et al.* 2012) et que le cerveau et le cœur ont également tendance à avoir des $\Delta^{15}\text{N}$ élevés (Sutoh *et al.* 1987; Yoneyama *et al.* 1983; Lee *et al.* 2012; DeNiro & Epstein 1981; Hobson *et al.* 1996; Arneson & MacAvoy 2005) (Figure 39b). Globalement, chez le rat, les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires rapportées s'échelonnent de -1,5 à 4,6‰ (Caut *et al.* 2008) ou de 1,6 à 3,9‰ (Yoneyama *et al.* 1983).

Les différences de $\Delta^{15}\text{N}$ entre tissus pourraient être liées à des différences d'activité métabolique. En effet, au niveau tissulaire, les AA issus de la dégradation des P peuvent être désaminés et éliminés ou bien être réutilisés pour les SP, directement ou après avoir subi des processus de transaminations, ces

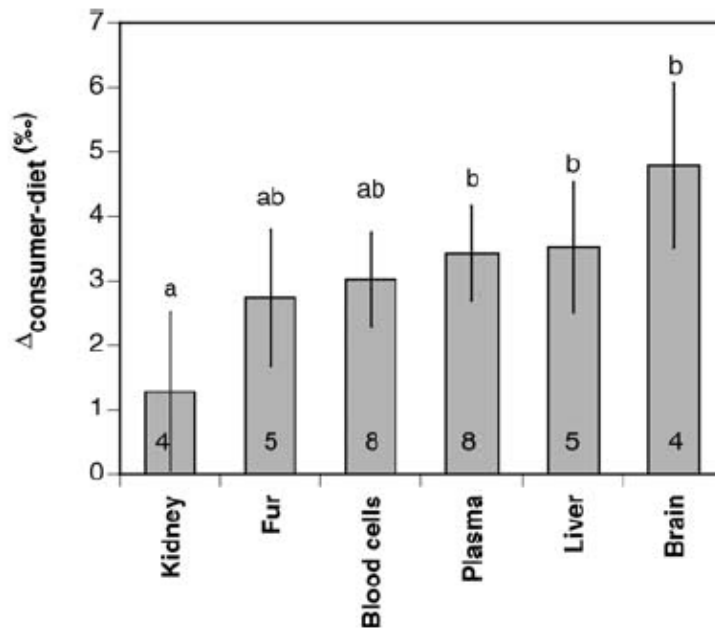


Figure 39-a. Comparaison des valeurs moyennes de $\Delta^{15}\text{N}$ entre plusieurs tissus et organes.

Les valeurs rapportées sont issues de données obtenues pour les reins, poils, cellules sanguines, plasma, foie et cerveau chez différentes espèces de mammifères (valeurs moyennes \pm intervalle de confiance à 95%). Les groupes ayant la même lettre ne sont pas significativement différents. Les nombres à l'intérieur des barres indiquent le nombre d'individus.

D'après Vanderklift et al. (2003).

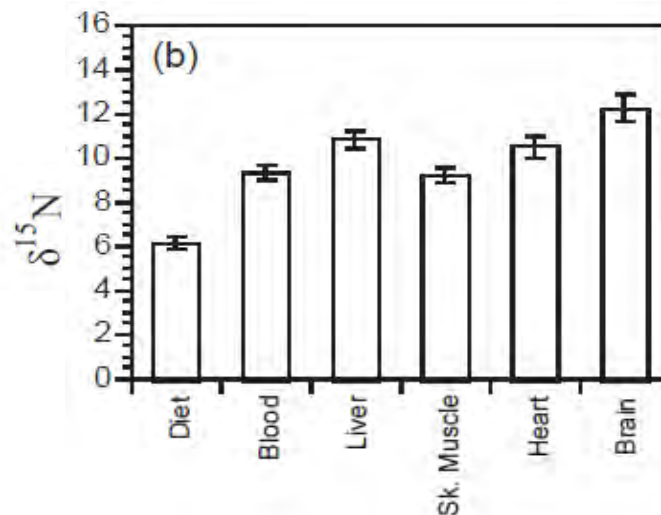


Figure 39-b. Comparaison des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ entre plusieurs tissus chez la souris.

Les $\delta^{15}\text{N}$ ont été mesurés dans le régime alimentaire, le sang et les tissus (foie, muscles squelettiques, cœur et cerveau) chez des souris adaptées pendant près de quatre mois à un régime à base de caséine.

D'après Arneson et al. (2005).

réactions de transfert d'azote et d'interconversions entre AA (désaminations ou transaminations) induisant un fractionnement isotopique. Une forte activité métabolique tissulaire, par exemple des remaniements importants des AA utilisés pour les SP à travers des processus plus nombreux de transaminations ou désaminations, favoriserait l'accumulation de ^{15}N dans le tissu, en raison de l'augmentation du nombre de processus métaboliques induisant un fractionnement isotopique (Arneson & MacAvoy 2005). Ainsi, Yoneyama explique l'accumulation supérieure de ^{15}N dans le foie, le cœur et le cerveau par rapport au muscle ou aux cellules sanguines, par leur activité métabolique plus intense qui implique une réutilisation importante d'AA non-essentiels (Yoneyama *et al.* 1983). A l'inverse, on peut supposer que l'utilisation plus directe des AA alimentaires pour la SP dans un tissu conduirait à une faible discrimination isotopique entre le régime et ce tissu. De plus, la concurrence entre les voies anaboliques et cataboliques constitue un embranchement métabolique au niveau tissulaire, avec un effet isotopique important associé à la voie catabolique du fait des processus fractionnants de transamination et désamination. Les différences de $\Delta^{15}\text{N}$ entre tissus traduiraient donc des différences d'orientation relative des AA alimentaires vers les voies cataboliques ou anaboliques selon les tissus et l'importance relative des processus cataboliques (transaminations, désaminations), par rapport aux processus anaboliques (Sick *et al.* 1997). La discrimination isotopique serait faible pour un tissu dans lequel l'oxydation des AA est faible par rapport à leur utilisation pour les SP, comme par exemple dans les cellules sanguines. La forte discrimination isotopique rapportée pour le foie proviendrait de l'utilisation relativement importante des AA pour la synthèse d'urée.

Une autre explication proposée pour expliquer la variabilité inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ est celle d'une répartition différentielle dans les tissus des composés alimentaires ayant des teneurs en ^{15}N différentes (Gannes *et al.* 1998; Martinez del Rio *et al.* 2009). Cette explication est pertinente dans le cas du carbone, puisque le carbone tissulaire peut provenir de différents macronutriments alimentaires (protéines, lipides ou glucides) susceptibles de présenter des abondances isotopiques différentes. Ainsi, le $\delta^{13}\text{C}$ d'un tissu reflète l'enrichissement isotopique du ou des macronutriments préférentiellement utilisés pour sa constitution et, par conséquent, des différences d'utilisation relative des macronutriments selon les tissus peuvent conduire à des différences de compositions isotopiques entre les tissus. Par exemple, dans l'os, le $\delta^{13}\text{C}$ du collagène, qui est majoritairement synthétisé à partir des AA alimentaires, reflète le $\delta^{13}\text{C}$ des P alimentaires, alors que le $\delta^{13}\text{C}$ de l'apatite, qui est synthétisée à partir du bicarbonate circulant, représente davantage de $\delta^{13}\text{C}$ des glucides et lipides alimentaires catabolisés (Gannes *et al.* 1997). En revanche, cette explication est moins pertinente dans le cas de l'azote, où les P alimentaires constituent la source quasi exclusive d'azote exogène. Il n'est cependant pas exclu que, comme les différents AA ont des $\delta^{15}\text{N}$ variés (Gaebler *et al.* 1966), des différences quantitatives et qualitatives de captation des AA alimentaires par les différents tissus puissent participer aux différences de $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires.

Enfin, les différents AA ayant des $\delta^{15}\text{N}$ distincts, la variabilité inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ pourrait également être expliquée par des différences de composition en AA des tissus, le $\delta^{15}\text{N}$ global d'un tissu reflétant la contribution relative de chaque AA. Il a en effet été mis en évidence des différences de $\Delta^{15}\text{N}$

Tableau 14. Comparaison des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées dans différents tissus chez des mammifères non ruminants rapportées dans la littérature

espèce	$\Delta^{15}\text{N}$									Source protéique	Age	n	durée régime	source
	Cœur	Cerveau	Plasma	Foie	IG	Rein	Muscle	RBC	Poils					
rats			3,6	3,1		2,5	2,3	2,0	2,4	Gluten de blé	≈ 10 mois	6	276 j	Kurle CM., 2009
rats			3,3	2,8		2,6	2,4	2,8	3,0	Poisson	≈ 1 an	4	258 j	Kurle CM., 2009
rats	2,7	3	3,7	2,9		0,8		1,2		<i>non précisé</i>	8 sem.	1	?	Yoneyama <i>et al.</i> , 1983
rats	3,9	3,3	3,2	3,2		1,5		2,0		<i>non précisé</i>	5 sem.	1	?	Yoneyama <i>et al.</i> , 1983
rats	5,1	5,3	4,9	4,2		2,6	3,1	2,9		<i>non précisé</i>	15 sem.	1	?	Yoneyama <i>et al.</i> , 1983
rats			3,7		1,4					Caséine	≈300g	3	15 j	Sick <i>et al.</i> , 1997
rats			4,5		2,2					Soja	≈300g	3	15 j	Sick <i>et al.</i> , 1997
rats			3,3		1,7					Lactosérum	≈300g	3	15 j	Sick <i>et al.</i> , 1997
rats			4,7		2,1					Gluten de blé	≈300g	3	15 j	Sick <i>et al.</i> , 1997
rats				1,1			1,4		-1,5	Poisson & Maïs	6-14 sem.	6	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats				2,3			1,7		-0,9	Caséine & Maïs	6-14 sem.	6	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats				4,6			4,6		4,1	Alfalfa & Maïs	6-14 sem.	6	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats				2,0			1,1		-1,0	Poisson, Caséine & Maïs	6-14 sem.	4	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats				2,6			1,5		-1,0	Poisson, Alfalfa & Maïs	6-14 sem.	4	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats				4,3			4,0		2,1	Caséine, Alfalfa & Maïs	6-14 sem.	4	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats				2,5			1,9		-0,3	Poisson, Caséine & P. végétales	6-14 sem.	4	56 j	Caut <i>et al.</i> , 2008
rats							2,9		3,2	P végétales	13-24 sem.	4	91 à 171 j	Ambrose <i>et al.</i> , 2000
rats							2,1		3,5	Caséine	13-24 sem.	2	91 à 171 j	Ambrose <i>et al.</i> , 2000
rats				3,3			2,0			Caséine	6 sem.	2	14 j	Gaebler <i>et al.</i> , 1966
rats				3,8			3,4			Soja	6 sem.	2	14 j	Gaebler <i>et al.</i> , 1966
souris				4,7			2,7			Caséine	13 sem.	3	112 j	MacAvoy <i>et al.</i> , 2005,
souris				4,7			3,1			Caséine	> 7 mois	20	117 à 172 j	Arneson <i>et al.</i> , 2005
souris				3,8			2,0			Poisson	> 7 mois	17	117 à 172 j	Arneson <i>et al.</i> , 2005
souris	5,83			4,2		2,11	2,9		3,1	<i>non précisé</i>			?	DeNiro <i>et al.</i> , 1981
souris	3,84			2,6		0,89			1,5	<i>non précisé</i>			?	DeNiro <i>et al.</i> , 1981
souris	5,74			4,7		0,85			3,2	<i>non précisé</i>			?	DeNiro <i>et al.</i> , 1981
souris				3,5			2,8		3,3	<i>non précisé</i>	≈ 8 sem.	3	30 j	Miller <i>et al.</i> , 2011
renard			4,2	3,3			3,6	2,6	3,4	<i>non précisé</i>	8 mois	10	210 j	Roth <i>et al.</i> , 2000
renard				3,3			3,3		3,2	<i>non précisé</i>	1-6 ans	10	210 j	Roth <i>et al.</i> , 2000
écureuil	4,2		4,5	4,9	2,9		3,0	2,1		<i>non précisé</i>	adulte	5	4 mois	Lee <i>et al.</i> , 2012
phoque	3,1			3,1			2,7	2,4	3,0	Poisson	adulte	1-14	2 ans	Hobson <i>et al.</i> , 1996

j., jours ; Sem., semaine.

entre les AA individuels contenus dans les P hépatiques et musculaires chez le rat (Gaebler *et al.* 1966), et dans les P du plasma et des cheveux chez l'homme (Petzke & Lemke 2009). Les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ rapportées pour les AA individuels varient globalement de -5 à +15‰, la proline et la glutamine étant généralement les plus enrichies en ^{15}N par rapport au régime tandis que la thréonine est toujours appauvrie. Cependant, bien que les compositions en AA des P diffèrent, le fait que les tissus animaux soient composés d'un grand nombre de P différentes atténue probablement les différences de composition en AA entre les tissus (Schoeller 1999). De plus, le $\Delta^{15}\text{N}$ d'un AA particulier varie également selon les tissus (Figures 40 & 41) : par exemple, chez le rat, l'arginine a un enrichissement plus élevé dans les P hépatiques que dans les P musculaires (5,2‰ vs. 1,1‰) (Gaebler *et al.* 1966). L'arginine étant désaminée dans le foie pour former l'urée, ce dernier résultat est en accord avec le fait qu'une augmentation des processus cataboliques tissulaires est responsable d'une augmentation de la discrimination isotopique des AA. Plus généralement, l'observation de différences inter-tissulaires du $\Delta^{15}\text{N}$ d'un même AA suggère que l'ampleur des processus métaboliques et des effets isotopiques affectant un AA particulier diffère selon les tissus, et que les mécanismes responsables de la variabilité inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ globaux et des $\Delta^{15}\text{N}$ des AA individuels sont vraisemblablement similaires. La composition spécifique en AA des tissus ne suffirait donc pas à expliquer les différences de $\Delta^{15}\text{N}$ entre tissus, et la première hypothèse, selon laquelle la variabilité inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ globaux est liée à des variations tissulaires du métabolisme des AA, avec une utilisation plus ou moins importante des AA dans les voies du catabolisme et des transferts d'azote entre AA plus ou moins nombreux selon les AA et les tissus, semble donc la plus vraisemblable.

En conclusion, les différences d'enrichissement isotopique entre les tissus d'un même individu témoignent de variations régionales du métabolisme azoté, l'orientation relative différente des AA vers les voies anaboliques (synthèses protéiques) ou cataboliques (transamination, désamination, production d'urée) selon les tissus induisant une accumulation plus ou moins importante de ^{15}N .

II.3. Existence d'une variabilité inter-individuelle des $\Delta^{15}\text{N}$ selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques, en lien avec des modulations des flux azotés

En plus des variations intra-individuelles de $\Delta^{15}\text{N}$, un nombre croissant de données montre que les $\Delta^{15}\text{N}$ corporels ou tissulaires varient selon les individus en fonction de leurs conditions nutritionnelles, physiologiques et pathologiques propres. Plusieurs méta-analyses ont ainsi permis de montrer que des facteurs tels que la qualité et la nature du régime alimentaire, la quantité d'azote ingérée, le statut nutritionnel ou l'âge, pouvaient expliquer les variations inter-individuelles des $\Delta^{15}\text{N}$ (Vanderklift & Ponsard 2003; Vander Zanden & Rasmussen 2001; Caut *et al.* 2009; Robbins *et al.* 2005). Cependant, en raison du faible nombre d'études réalisées chez les mammifères en conditions contrôlées et sur des groupes d'individus homogènes, l'importance et le rôle précis de chacun de ces facteurs de variation sont encore mal définis et les mécanismes impliqués souvent non identifiés. Dans cette partie, nous étudierons plus précisément les variations de $\Delta^{15}\text{N}$ entre individus en fonction de trois facteurs qui apparaissent comme principaux et dont on sait par ailleurs qu'ils induisent des modulations du

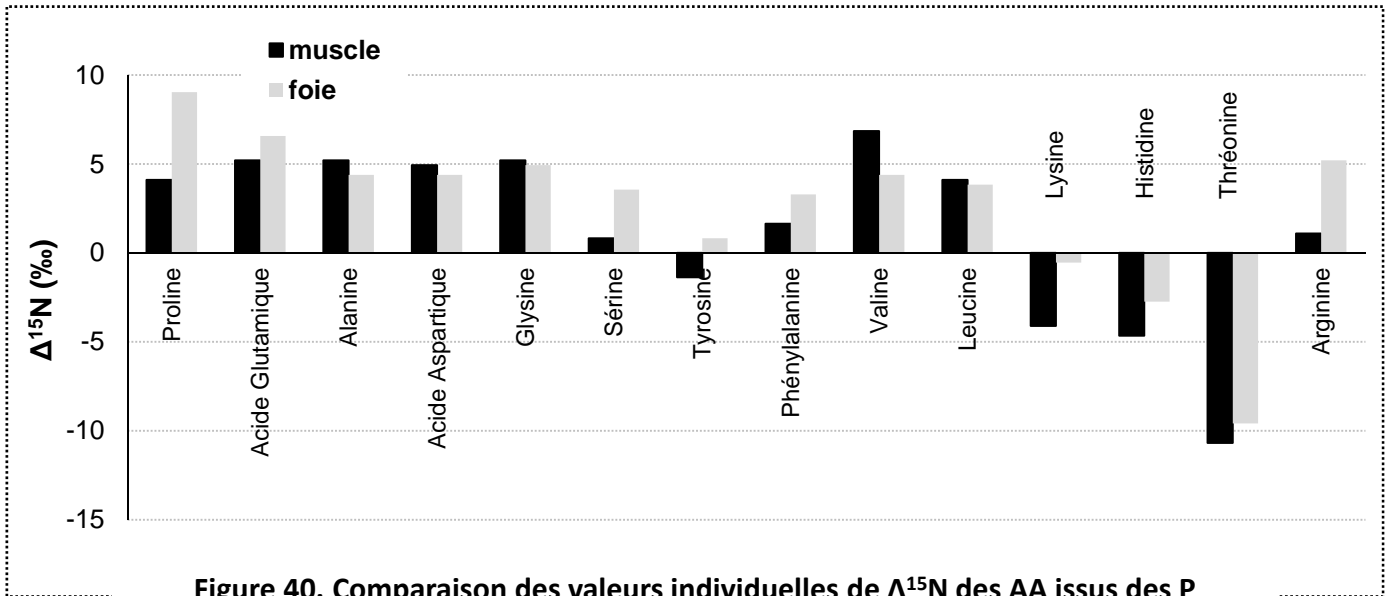


Figure 40. Comparaison des valeurs individuelles de $\Delta^{15}\text{N}$ des AA issus des P musculaires et hépatiques chez le Rat.

→ Les $\Delta^{15}\text{N}$ des AA individuels varient (i) entre AA au sein d'une protéine tissulaire, et (ii) pour un même AA entre protéines tissulaires

D'après les données de Gaebler et al. (1966).

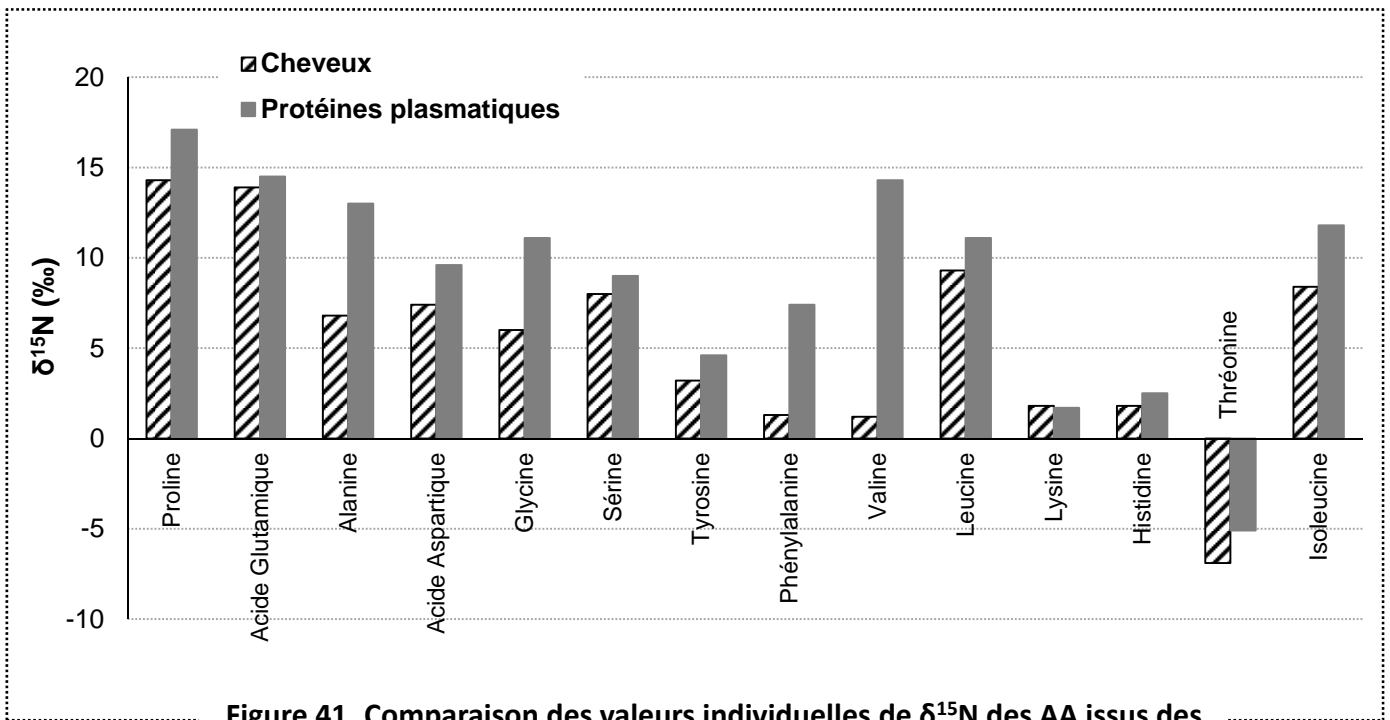


Figure 41. Comparaison des valeurs individuelles de $\delta^{15}\text{N}$ des AA issus des cheveux et des protéines plasmatiques chez l'Homme.

D'après les données de Petzke et al. (2009).

métabolisme azoté : la qualité et la nature de l'apport protéique, le niveau d'apport protéique, et certaines conditions physiopathologiques particulières.

II.3.i. Variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction de la qualité de la source protéique alimentaire

La qualité d'une P alimentaire est définie comme sa capacité à satisfaire les besoins métaboliques en N et AA d'un individu. Elle peut être évaluée par différents indices, tels que le PD-CAAS (un score chimique qui consiste à comparer la teneur en AA individuels de la P alimentaire à celle d'une P de référence censée couvrir les besoins chez l'homme, corrigé par la digestibilité de la P alimentaire), ou la valeur biologique (indice qui mesure plus précisément *in vivo* l'efficacité avec laquelle la P est effectivement assimilée dans l'organisme (Tome 2012; Millward *et al.* 2008). De manière générale, les P animales sont considérées être de meilleure qualité que les P végétales, et parmi les P animales, on considère que la qualité des P de lait (P totales, caséine ou P du lactosérum) est supérieure à celle des P de poisson, elle-même supérieure à celle des P de viande (Tableau 8). Cependant, les valeurs estimées de qualité protéique varient de manière importante selon les espèces.

Une méta-analyse de données obtenues chez 21 espèces différentes de mammifères et d'oiseaux consommant des sources protéiques variées (lait, poisson, autres P animales, céréales et fruits) a montré que le $\Delta^{15}\text{N}$ dans le sang était d'autant plus faible que la valeur biologique des P alimentaires ingérées était élevée ((Robbins *et al.* 2005), Figure 42). Cependant, dans cette étude, d'autres facteurs importants de variations, tels que la quantité de P consommées, la variation de masse corporelle induite par les régimes, ou l'âge, n'étaient pas contrôlés. Quelques études en laboratoire ont également mis en évidence des différences de $\Delta^{15}\text{N}$ entre des individus nourris avec des P de natures différentes, en comparant principalement des P d'origine animale et végétale (Tableau 15). Une discrimination isotopique plus élevée a été observée dans le muscle et le foie (Gaebler *et al.* 1966) ou dans le plasma (Sick *et al.* 1997) chez des rats consommant un régime à base P de soja par rapport à des rats consommant un régime à base de caséine. De même, des études comparant la consommation de P de céréales à celle de P de poisson ont mis en évidence des enrichissements supérieurs en ^{15}N chez les individus ingérant des P de céréales par rapport à ceux ingérant des P de poissons, dans le plasma chez des rats (Robbins *et al.* 2009) ou dans le foie et le muscle chez des rats (Caut *et al.* 2008) ou des corneilles (Hobson & Clark 1992), bien que les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées ne soient pas nécessairement corrélées avec le rapport des quantités de carbone et d'azote dans les régimes (C/N), qui est pourtant considéré comme un indice de la qualité du régime en écologie (Caut *et al.* 2008). Par ailleurs, chez le criquet, la consommation d'un régime à base de maïs, qui est considéré être de faible qualité nutritionnelle, induit des $\Delta^{15}\text{N}$ global et musculaire plus élevés par rapport à la consommation d'un régime à base de blé qui permet un apport protéique adéquat (Webb *et al.* 1998). A l'inverse, la discrimination isotopique mesurée dans le muscle et le foie chez deux espèces de poisson ne semble pas corrélée à la quantité relative de P de poisson par rapport aux P de céréales dans le régime (Beltran *et al.* 2009). Cependant, il faut noter que dans la plupart de ces études, d'une part la quantité d'azote ingérée est rarement similaire entre les régimes testés, et d'autre part la consommation de P considérées de

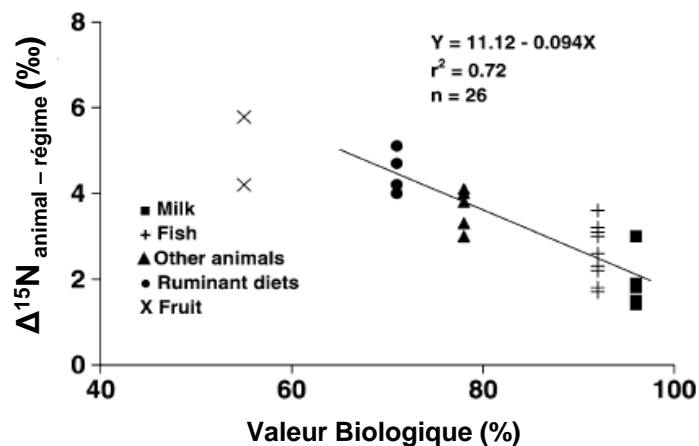


Figure 42. Relation entre les $\Delta^{15}\text{N}$ dans le sang et la qualité des protéines alimentaires chez des mammifères et oiseaux

Dans cette méta-analyse de données de $\Delta^{15}\text{N}$ dans le sang chez différentes espèces de mammifères et oiseaux, la qualité protéique est estimée par la valeur biologique (c.-à-d. la proportion relative de protéines absorbées qui sont effectivement assimilées). Les valeurs biologiques utilisées sont les suivantes : 92% pour les protéines de lait (■), 78% pour les protéines de poisson (+), 78% pour les protéines animales diverses (▲), 71% pour les protéines de régimes type « ruminant » (●) et 55% pour les protéines de fruit (x). Les valeurs des régimes à base de fruits n'ont pas été pris en compte dans la régression.

→ Les $\Delta^{15}\text{N}$ diminuent lorsque la qualité des protéines alimentaires augmente.

D'après Robbins et al. (2005).

moins bonne qualité est souvent associée à une diminution du taux de croissance ou à une perte de masse corporelle, si bien que les variations de $\Delta^{15}\text{N}$ observées pourraient davantage résulter d'une altération de la composition corporelle en réponse à l'inadéquation des P ingérées et leur incapacité à satisfaire les besoins de croissance ou de maintien de la masse protéique (Beltran *et al.* 2009; Hobson & Clark 1992). Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus par Miron *et al.* chez la chauve-souris, qui montrent des différences de $\Delta^{15}\text{N}$ dans le sang chez des animaux consommant des régimes à base de P de même valeur biologique (amarante vs. soja) mais induisant des taux de croissance différents : la consommation du régime à base d'amarante est associée à une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ et à une perte de poids, contrairement au régime à base de soja qui n'altère pas la croissance et est associé à des $\Delta^{15}\text{N}$ plus faibles (Miron M *et al.* 2006).

L'augmentation du $\Delta^{15}\text{N}$ généralement observée dans les tissus d'individus consommant des P de qualité inférieure serait due à une moins bonne adéquation entre les AA apportés par la P alimentaire et les besoins en AA des individus. En effet, dans le cas de l'ingestion d'une P de bonne qualité, c'est-à-dire ayant un profil en AA adéquat par rapport aux besoins en AA des tissus animaux, la majorité des AA alimentaires pourrait être directement utilisée pour les SP et par conséquent la composition isotopique des tissus serait proche de celle du régime. A l'inverse, lors de l'ingestion d'une P de mauvaise qualité, dont la composition ne permet pas de satisfaire directement les besoins en AA des tissus, les désaminations seraient activées et une plus grande proportion des AA utilisés pour les SP serait probablement synthétisée par transamination, ce qui contribuerait à l'augmentation de la discrimination isotopique entre les tissus et le régime (Roth & Hobson 2000). Cette théorie expliquerait pourquoi la discrimination isotopique est plus élevée chez des animaux herbivores que chez des animaux carnivores (Roth & Hobson 2000), la composition en AA des P animales étant évidemment plus proche de celle nécessaire pour la croissance ou le maintien des tissus animaux que celle des P végétales. De plus, il a été montré que la consommation de P ayant des profils en AA complémentaires (P de poisson et de céréales) induisait une discrimination isotopique plus faible que celle prédite par la moyenne pondérée des $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées lors de l'ingestion séparée de ces P, alors que la consommation de P ayant des profils en AA non complémentaires n'induisait pas cette différence de discrimination isotopique (Robbins *et al.* 2009). Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la discrimination isotopique observée entre les tissus et le régime dépend de la capacité des P alimentaires à satisfaire les besoins azotés des tissus animaux, quantitativement mais surtout qualitativement (c.-à-d. par leur profil en AA). Enfin, la mise en évidence chez le poisson d'une corrélation négative entre les $\Delta^{15}\text{N}$ corporels globaux et l'efficacité de rétention protéique (estimée par le rapport entre le gain de masse protéique et l'apport protéique) est également en accord avec l'hypothèse selon laquelle la diminution de la discrimination isotopique est liée à une utilisation relative plus importante des AA alimentaires pour les SP (Gaye-Siessegger *et al.* 2004a).

Cependant, le niveau d'apport protéique n'étant pas toujours contrôlé dans ces études et variant en fonction des régimes, il est difficile d'établir une relation directe entre la valeur biologique des P ingérées et le $\Delta^{15}\text{N}$ des tissus d'un individu, et de séparer l'effet de l'aspect qualitatif de celui de l'aspect quantitatif de l'apport protéique sur la discrimination isotopique.

Tableau 15. Analyse des données de la littérature concernant les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction de la qualité des protéines alimentaires

Espèce	P consommées ¹	Effet global ²	$\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires			Conditions d'apport et de croissance	Références
			Muscle	Foie	Plasma		
Insecte (Sauterelle)	Blé	↗	3,1				Webb <i>et al.</i> , 1998
	Maïs		7,8				
Mammifère (Rat)	Poisson	↗			3,3		Robbins <i>et al.</i> , 2009
	Soja				5,7		
	Blé				5,1		
	Maïs				4,4		
Mammifère (Rat)	Lactosérum	↗			1,9	Apport adéquat	Sick <i>et al.</i> , 1997
	Caséine				3,6		
	Soja				4,5		
	Blé				4,35		
Mammifère (Rat)	Caséine	↗	2,39	3,29			Gaebler <i>et al.</i> , 1966
	Soja		3,62	3,84			
Mammifère (Rat)	Poisson	↗	1,4	1,1			Caut <i>et al.</i> , 2008
	Maïs		1,7	2,3			
	Alfalfa		4,6	4,6			
Oiseau (Corbeau)	Poisson	↗	1,7	3		Taux de croissance diminué avec P végétales	Hobson <i>et al.</i> , 1992
	Blé & Soja		3	3,7			
Poisson (Truite)	Poisson	?	1,7	1,1		Différentes quantités d'N ingéré et différents taux de croissance	Beltran <i>et al.</i> , 2009
	Céréales		3,6	3			
Poisson (Daurade)	Poisson	?	9,1	5,5			
	Céréales		3,1	2,2			

¹protéines présentées par ordre décroissant de qualité pour chaque étude et chaque espèce. ²les effets indiqués correspondent à l'effet induit par la diminution de la qualité protéique sur les $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires : '↗' indique une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ avec une diminution de la qualité protéique, '?' indique que la qualité protéique n'a pas d'effet particulier sur les $\Delta^{15}\text{N}$.

II.3.ii. Variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction du niveau d'apport protéique et du bilan azoté

Bien que plusieurs méta-analyses regroupant des données de $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées chez différentes espèces de poissons et mammifères n'aient pas mis en évidence de corrélation entre la discrimination isotopique des individus et la quantité d'azote dans le régime alimentaire, il est couramment fait l'hypothèse que le niveau d'apport P affecte les valeurs des $\Delta^{15}\text{N}$. Sur la base d'un petit nombre de données, il est généralement admis qu'à la fois la restriction protéique sévère (par ex. le jeûne) et l'augmentation de l'apport protéique sont associées à des $\Delta^{15}\text{N}$ plus élevées dans les tissus animaux.

Augmentation de la discrimination isotopique lors d'un stress nutritionnel, en lien avec un bilan azoté négatif (Tableau 16)

L'hypothèse d'une augmentation de la discrimination isotopique lors du jeûne est basée principalement sur les résultats d'une étude chez l'oiseau (Hobson *et al.* 1993), qui montrent une augmentation significative des $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie (+2‰ environ) et le muscle (+1‰ environ) chez des oies (Oie de Ross, *Chen rossii*) pendant leur période d'incubation (qui correspond à une période de jeûne de 4 semaines environ) concomitamment avec une perte de masse corporelle totale et de masses musculaire et hépatique d'environ 50% ((Hobson *et al.* 1993), figure 43). Des résultats similaires ont été obtenus dans cette même étude chez des cailles (Caille du Japon, *Coturnix japonica*), non plus en situation de jeûne mais de restriction protéique pendant 3 semaines : les animaux restreints, qui maintiennent leur masse protéique mais dont la croissance est stoppée, présentent des $\Delta^{15}\text{N}$ supérieurs dans le foie, le muscle et le sang par rapport à des animaux nourris *ad libitum* dont la croissance est normale. De même, une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans le plasma (+0,7 ‰) et les RBC (+0,2 ‰) a été mise en évidence chez des manchots (Manchot Royal, *Aptenodytes patagonicus*) après 25 jours de jeûne et perdant 28% de leur masse corporelle (Cherel *et al.* 2005). Des résultats contrastés ont été obtenus chez l'écureuil (Spermophile arctique, *Urocitellus parryii*) en phase d'hibernation, avec une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie, l'intestin, le cœur et le tissu adipeux mais une absence de variation des $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle et les cellules sanguines (Lee *et al.* 2012). Aucune variation des $\delta^{15}\text{N}$ n'a également été observée dans la queue de lézards (lézard à flanc maculé, *Uta stansburiana*) après 14 jours de jeûne, bien que les $\delta^{15}\text{N}$ des excréta augmentent significativement pendant cette période (Castillo & Hatch 2007).

Il est usuellement supposé que le mécanisme responsable de l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ lors du jeûne est le même que celui conduisant au saut trophique, puisque les animaux, en l'absence d'apport azoté exogène, utilisent leurs propres tissus comme source d'azote ou plus schématiquement se nourrissent de leurs propres tissus. En conditions normales, le pool d'AA libres utilisés pour les SP est alimenté par les AA alimentaires, par la dégradation des P endogènes et par le métabolisme des AA endogènes (transferts d'AA entre tissus). En condition de jeûne ou de stress nutritionnel, une plus grande proportion des AA incorporés dans les P serait issue du catabolisme des P endogènes et, celles-ci étant enrichies en ^{15}N , leur plus forte mobilisation induirait une augmentation de l'enrichissement du pool d'AA et par conséquent une augmentation de l'enrichissement des P corporelles (Gannes *et al.* 1998). De plus, les AA endogènes pourraient être davantage recyclés par un nombre plus élevé de

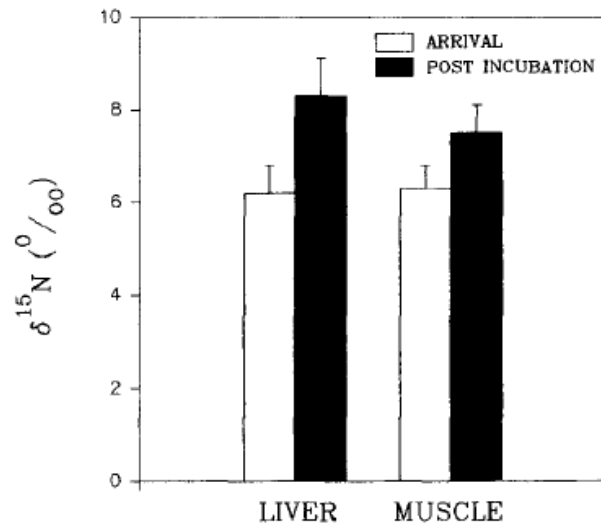


Figure 43. Effet d'une période de jeûne sur les $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie et le muscle chez l'oiseau.

Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ont été mesurées chez des oies de Ross (*Chen rossii*) au début ("arrival") et à la fin ("Post-incubation") de la période d'incubation, qui correspond à une période de jeûne de 4 semaines.

→ Les $\Delta^{15}\text{N}$ augmentent lors d'une période de jeûne.

D'après Hobson et al. (1993).

transaminations, ce qui contribuerait également à l'augmentation de l'enrichissement du pool d'AA précurseurs des SP, le ^{14}N étant toujours préférentiellement excrété lors de ces processus de transferts de groupes amines. Ainsi, lors d'une restriction protéique sévère s'accompagnant d'une perte de masse corporelle, c.-à-d. pour un bilan azoté négatif, les $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires seraient augmentés en raison de l'augmentation du catabolisme protéique et du recyclage des AA endogènes.

Outre les $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires, les $\delta^{15}\text{N}$ des excréta, et plus particulièrement de l'urine, seraient particulièrement sensibles à des variations du bilan d'N. Une augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ des excréta a été rapportée chez deux espèces de lézards après 14 jours de jeûne (Castillo & Hatch 2007) et chez plusieurs espèces de reptiles après un jeûne prolongé de 170 jours (McCue & Pollock 2008), bien qu'aucune variation significative des $\delta^{15}\text{N}$ n'ait été observée dans les tissus de ces animaux. De même, des valeurs plus élevées de $\Delta^{15}\text{N}$ ont été observées dans l'urée urinaire chez des caribous (*Rangifer tarandus*) pour des apports azotés plus faibles (Parker *et al.* 2005) et dans les urines chez des bonobos (*Pan paniscus*) lors d'une restriction énergétique (Deschner *et al.* 2012). Plus particulièrement, les urines s'enrichiraient en ^{15}N dans des situations caractérisées par un bilan azoté négatif et/ou une perte de masse corporelle, comme le montrent les corrélations négatives mises en évidence entre les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées dans l'urée urinaire et le bilan azoté d'une part (Barboza & Parker 2006) (Figure 44), et entre les $\Delta^{15}\text{N}$ des urines totales ou de l'acide urique et les variations de masse corporelle d'autre part (Castillo & Hatch 2007; Deschner *et al.* 2012; Lee *et al.* 2012) (Figures 45 et 46). L'augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ des urines pourrait provenir directement de l'augmentation de la proportion d'urée synthétisée à partir des AA enrichis issus du catabolisme des P endogènes (Deschner *et al.* 2012; McCue & Pollock 2008) et/ou, plus indirectement, de l'augmentation du recyclage de l'urée, qui entraînerait une augmentation des processus de transamination et désamination et favoriserait l'épargne des AA endogènes alors davantage utilisés pour les SP (Barboza & Parker 2006; Parker *et al.* 2005). Ces observations et interprétations suggèrent que les $\Delta^{15}\text{N}$ des urines seraient des bons marqueurs du statut protéique d'un individu et plus particulièrement du degré de catabolisme protéique. Des modèles mixtes ont ainsi été récemment proposés pour estimer les contributions respectives des pools d'N endogène (P corporelles) et d'N alimentaire (ou pool d'azote labile) à l'excrétion azotée, une augmentation de la proportion d'azote excrété issu du pool endogène traduisant une augmentation du catabolisme protéique (Gustine *et al.* 2011; McCue & Pollock 2008). La thèse d'une corrélation négative entre le $\Delta^{15}\text{N}$ urinaire et le bilan azoté ou les variations de masse corporelle est renforcée par l'observation de $\Delta^{15}\text{N}$ plus faibles chez des animaux en croissance par rapport à des animaux adultes (Sears *et al.* 2009) et la mise en évidence d'une diminution des $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires en relation avec une augmentation du taux de croissance des individus (Trueman *et al.* 2005; Fantle *et al.* 1999).

Ainsi, la mise en place de mécanismes d'épargne azotée lors du jeûne, tels que le recyclage des AA endogènes et/ou de l'urée, serait responsable de l'augmentation de l'enrichissement en ^{15}N du pool d'AA libres et par conséquent de l'accumulation supplémentaire de ^{15}N dans les tissus corporels mais également de l'augmentation de l'enrichissement dans les excréta.

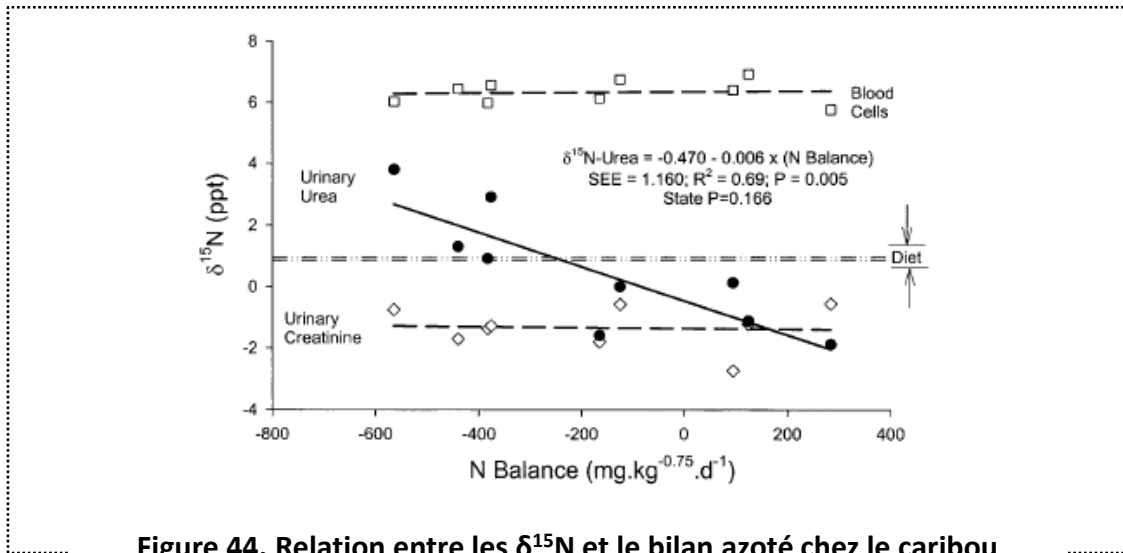


Figure 44. Relation entre les $\delta^{15}\text{N}$ et le bilan azoté chez le caribou (*Rangifer tarandus*).

→ Le $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urée urinaire augmente lorsque que le bilan azoté devient plus négatif, alors que les $\delta^{15}\text{N}$ des cellules sanguines et de la créatinine urinaire ne sont pas affectés par le bilan azoté.

D'après Barboza et al. (2006).

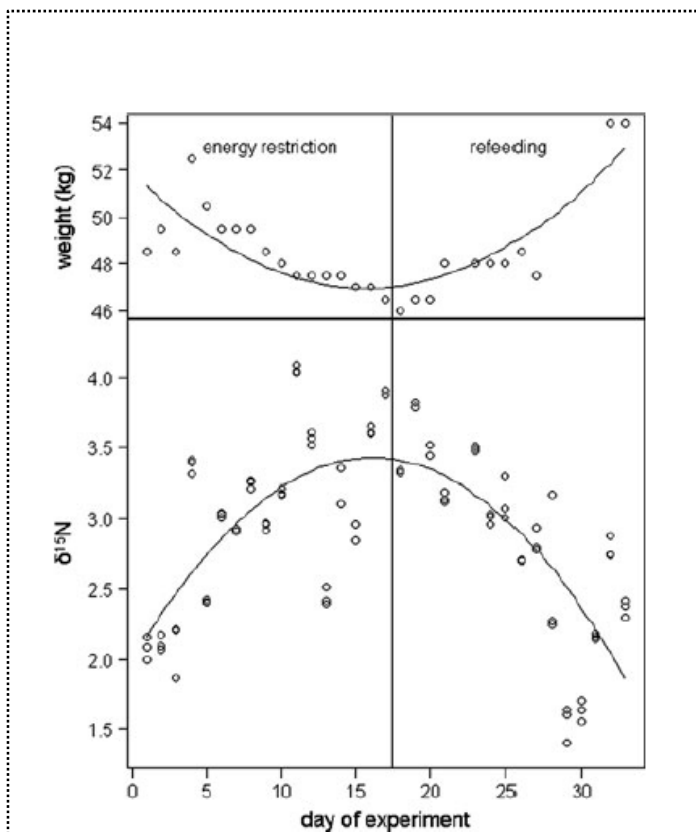


Figure 45. Variations de la masse corporelle et du $\delta^{15}\text{N}$ dans les urines au cours de périodes de restriction énergétique et de réalimentation chez un bonobo (*Pan paniscus*).

→ La restriction énergétique, accompagnée d'une perte de masse corporelle, entraîne une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ dans les urines.

D'après Deschner et al. (2011).

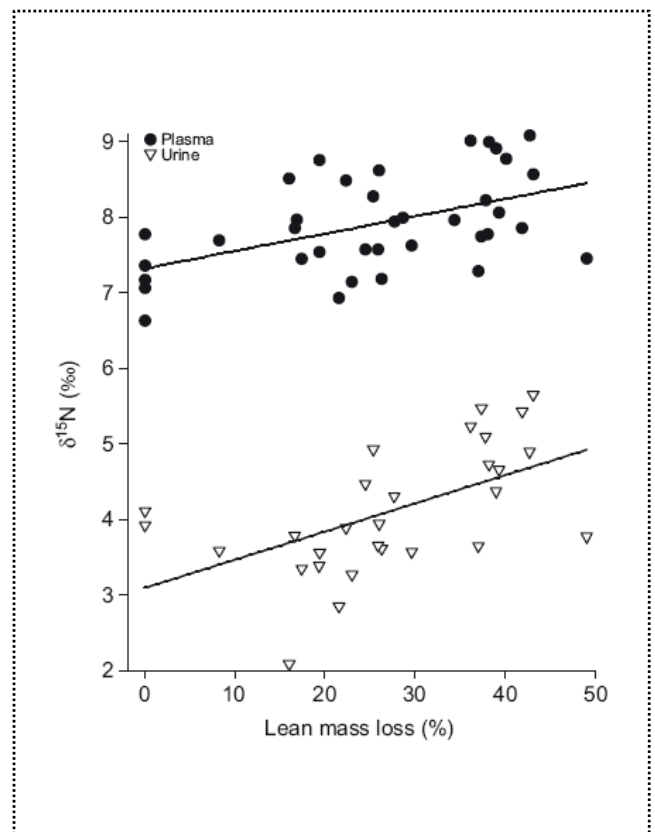


Figure 46. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans le plasma et les urines en relation avec la masse corporelle pendant la période d'hibernation chez l'écureuil arctique (*Urocitellus parryii*).

→ Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ dans le plasma et les urines sont positivement corrélées à la perte de masse corporelle.

D'après Lee et al. (2012).

Augmentation de la discrimination isotopique pour des niveaux d'apport en P élevés, en lien avec une augmentation de l'excrétion azotée (Tableau 17)

Il est intéressant de noter que l'augmentation du niveau d'apport protéique semble avoir le même effet sur les valeurs de discrimination isotopique qu'une restriction protéique, c'est-à-dire une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$. En effet, chez l'oiseau (Paruline à croupion jaune, *Dendroica coronata*), une corrélation positive entre les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ plasmatiques et la proportion d'azote dans le régime a été observée (Pearson *et al.* 2003), avec des variations maximales des $\Delta^{15}\text{N}$ de 0,5‰ pour des teneurs en azote multipliées par 3 (Figure 47). Des valeurs significativement supérieures de $\Delta^{15}\text{N}$ corporels ont été mises en évidence pour des niveaux d'apports protéiques plus élevés chez des poissons (Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*) nourris avec des régimes contenant des quantités variables de P mais satisfaisant les besoins azotés dans tous les cas (Focken 2001). De même, chez le phoque (*Phoca vitulina*), l'alternance de régimes pauvres et riches en P est accompagnée d'une variation des $\delta^{15}\text{N}$ plasmatiques, les valeurs les plus élevées de discrimination isotopique étant observées lors de la consommation des régimes plus riches en P, mais l'amplitude des variations étant inférieure à 0,6‰ (Zhao *et al.* 2006). Dans ces études, l'augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ des tissus est interprétée par une augmentation de la quantité d'azote excrétée appauvrie en ^{15}N . Puisque l'augmentation de l'apport azoté n'induit pas d'augmentation de la masse protéique, les AA alimentaires apportés en excès sont vraisemblablement oxydés et éliminés, et l'augmentation des processus de désamination, liés au catabolisme des AA, engendre une augmentation du fractionnement isotopique avec l'élimination préférentielle du ^{14}N dans les urines et l'accumulation du ^{15}N dans les tissus (Zhao *et al.* 2006; Pearson *et al.* 2003).

Finalement, l'augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ observée en réponse à des modifications du niveau d'apport azoté pourrait s'expliquer par l'inadéquation entre la quantité d'apports et les besoins en N et AA. En effet, les tissus sont susceptibles de s'enrichir en ^{15}N via deux processus : l'augmentation des désaminations et transaminations dans les pools d'AA intra-tissulaires et l'utilisation relativement plus importante pour les SP d'AA enrichis en ^{15}N issus de la dégradation des P endogènes. Des apports azotés insuffisants et inférieurs aux besoins, c'est-à-dire s'accompagnant d'une annulation de la croissance chez des animaux jeunes ou d'une perte de masse corporelle chez des animaux adultes, induisent une augmentation de la discrimination isotopique par l'intermédiaire d'une augmentation des transaminations et de l'utilisation pour les SP des AA issus des P endogènes. Dans le cas d'apports azotés supérieurs aux besoins et n'induisant pas de gain de masse supplémentaire, l'azote ingéré en excès est excrété, entraînant une augmentation des réactions associées au catabolisme des AA (désamination et synthèse d'urée). L'hypothèse de l'augmentation de la discrimination isotopique dans des situations d'apport azoté non optimal est appuyée par les résultats obtenus par Sick *et al.* chez des rats soumis à des niveaux d'apports protéiques variables de 0 à 30g/kg/j (l'apport optimal estimé étant d'environ 10g/kg/j selon les types de P) qui rapportent une valeur minimale de $\Delta^{15}\text{N}$ dans les P plasmatiques pour un apport proche de l'apport optimal et une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ pour des apports inférieurs ou supérieurs à cet apport optimal (Sick *et al.* 1997).

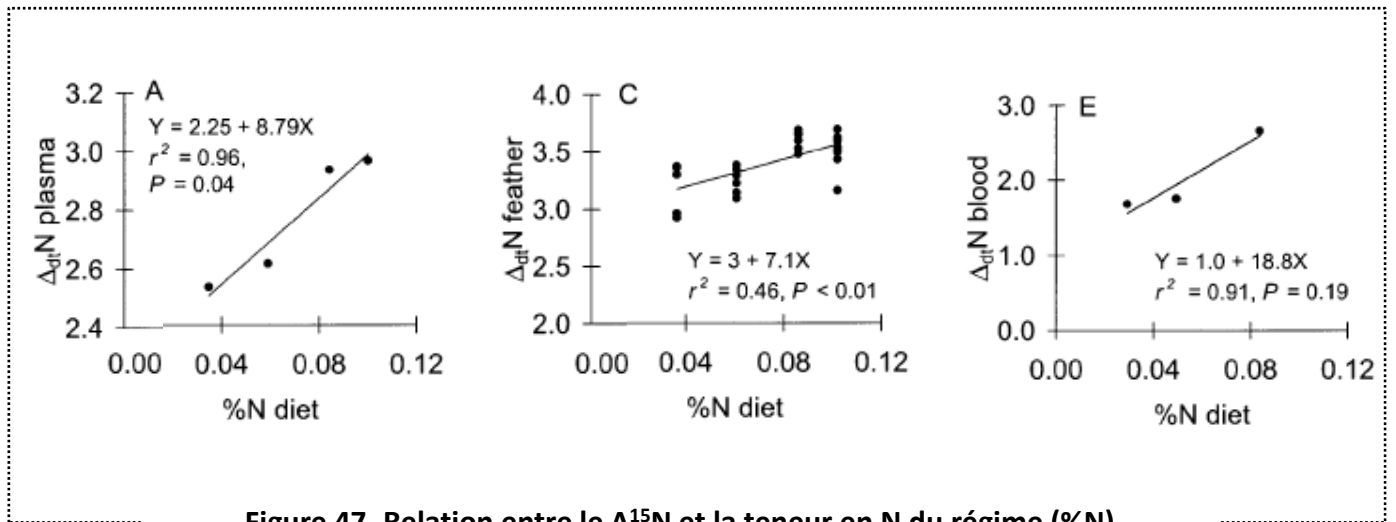


Figure 47. Relation entre le $\Delta^{15}\text{N}$ et la teneur en N du régime (%N) chez l'oiseau (Paruline à croupion jaune, *Dendroica coronata*).

→ Pour le plasma et les plumes, la discrimination isotopique augmente linéairement avec la quantité d'azote dans le régime.

D'après Pearson et al. (2003).

Les variations des valeurs de discrimination isotopique traduisent la capacité d'adaptation du métabolisme azoté à des variations de l'apport protéique

Les théories communément admises d'une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ à la fois dans des situations de stress nutritionnel et de niveau d'apport protéique élevé sont remises en question par l'obtention de résultats contradictoires. Une diminution du $\Delta^{15}\text{N}$ corporel lors d'une augmentation du niveau d'apport protéique a été rapportée chez le poisson (Gaye-Siessegger *et al.* 2007; Gaye-Siessegger *et al.* 2004b) et des études réalisées chez le rongeur (Campagnol à dos roux, *Clethrionomys gapperi*, (Sare *et al.* 2005)) et l'oiseau (Bulbul d'Arabie, *Pycnonotus xanthopygos*, (Tsahar *et al.* 2008)) ont constaté des valeurs plus faibles de $\Delta^{15}\text{N}$ chez des individus nourris avec des régimes contenant des teneurs plus élevées en P (Figure 48). De même, les résultats d'études menées chez des macareux en croissance montrent qu'une restriction protéique de l'ordre de 45% n'induit pas une augmentation mais au contraire une diminution de la discrimination isotopique mesurée dans les cellules sanguines (Sears *et al.* 2009; Williams *et al.* 2007) (Figure 49). Chez une espèce de passereau en croissance (Bruant chanteur, *Melospiza melodia*), les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ mesurées dans le sang, le foie et le muscle ne sont pas affectées par une restriction protéique de 35% (Kempster *et al.* 2007). Dans ces trois études, les animaux soumis à une restriction protéique présentent un taux de croissance inférieur à celui des animaux nourris *ad libitum*, mais néanmoins positif. Par conséquent, les résultats apparemment contradictoires concernant les effets d'une restriction protéique sur les $\Delta^{15}\text{N}$ sont vraisemblablement liés au degré de la restriction protéique et à la capacité de l'organisme à maintenir ou non sa croissance dans ces conditions (Tableau 17). Ainsi, contrairement à une restriction protéique sévère accompagnée d'une perte de masse corporelle, une restriction protéique modérée permettant le maintien d'une croissance même ralentie, induirait une diminution des $\Delta^{15}\text{N}$ via une augmentation de l'efficacité de l'utilisation anabolique de l'N alimentaire et de la rétention protéique. En effet, le maintien de la croissance dans des conditions de diminution de l'apport protéique traduit une augmentation de l'utilisation relative des AA alimentaires pour les SP et une diminution de leur oxydation, la diminution du rapport entre les quantités d'N alimentaire excrété et retenu dans les tissus induisant une diminution des $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires (Williams *et al.* 2007; Sears *et al.* 2009). La diminution de la discrimination isotopique avec l'augmentation de l'efficacité de rétention protéique permet également d'expliquer les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ plus faibles observées dans certains cas pour des apports protéiques plus élevés. En effet, lorsque l'augmentation de l'apport protéique est associée à une augmentation de la croissance, comme c'est le cas dans les études de Gaye-Siessegger *et al.* (Gaye-Siessegger *et al.* 2007; Gaye-Siessegger *et al.* 2004b), l'anabolisme protéique est relativement augmenté par rapport au catabolisme et l'augmentation de la rétention protéique se traduit par une diminution des $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires. A l'inverse, lorsque l'augmentation de l'apport protéique n'induit pas d'augmentation de la croissance mais une augmentation de l'excrétion azotée, celle-ci se traduit par une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ en raison de l'augmentation des processus cataboliques qui engendrent un fractionnement isotopique. Ainsi, de manière générale, une diminution des $\Delta^{15}\text{N}$ traduirait une augmentation de l'utilisation relative des AA dans les voies anaboliques par rapport aux voies

Tableau 16. Analyse des données de la littérature concernant les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en réponse à des restrictions modérées ou sévères de l'apport protéique et en relation avec les variations de la masse corporelle.

Organisme	Conditions Nutritionnelles ¹	Statut corporel ¹	Tissu	Variation $\Delta^{15}\text{N}$ (sens et amplitude) ¹	référence
Reptile (Lézard)	Jeune (14 jours)	↘ masse corporelle totale	Acide urique queue	↗ de 2,2 à 2,5‰ par rapport valeurs initiales Pas de variation par rapport valeurs initiales	Castillo <i>et al.</i> , 2007
Oiseau (Manchot)	Jeune (25j)	↘ masse corporelle	Plasma RBC	↗ +0,7‰ par rapport valeurs initiales ↗ +0,2‰ par rapport valeurs initiales	Cherel <i>et al.</i> , 2005
Oiseau (Oie de Ross)	Jeune (période d'incubation)	↘ masse corporelle totale	Muscle Foie	↗ +1,2‰ par rapport valeurs initiales ↗ +2,0‰ par rapport valeurs initiales	Hobson <i>et al.</i> , 1993
Oiseau (Caille)	Restriction P	Maintien de la masse corporelle mais annulation de la croissance	Muscle Foie Os Sang	↗ +0,5‰ par rapport aux témoins ↗ +1,4‰ par rapport aux témoins ↗ +1,2‰ par rapport aux témoins ↗ +0,7‰ par rapport aux témoins	Hobson <i>et al.</i> , 1993
Mammifère (Écureuil)	↘ disponibilité des ressources	↘ masse corporelle	RBC	Pas de variations en fonction de la masse corporelle	BenDavid <i>et al.</i> , 1999
Oiseau (Macareux rhinocéros)	Restriction P (-40%)	Croissance diminuée (mais non nulle)	RBC	↘ -0,4 à 0,55‰ par rapport aux témoins	Sears <i>et al.</i> , 2009
Oiseau (Macareux huppé)	Restriction P (-50%)	Croissance diminuée (mais non nulle)	RBC	↘ -0,4 par rapport aux témoins	Williams <i>et al.</i> , 2007
Oiseau (Bruant chanteur)	Restriction P (-65%)	Croissance diminuée (mais non nulle)	Sang Foie Muscle	Pas de différences par rapport aux témoins Pas de différences par rapport aux témoins Pas de différences par rapport aux témoins	Kempster <i>et al.</i> , 2007
Mammifère (Caribou)	Restriction P (-78%)	Pas de différence de masse corporelle	Urée Urine	Tendance ↗ pour apport N plus faible Pas de variations en fonction de l'apport N	Parker <i>et al.</i> , 2005
Reptile (Serpent)	Jeune (168 jours)	?	Excrétas carcasse	↗ 1 à 3‰ par rapport valeurs initiales Pas de variation par rapport valeurs initiales	McCue <i>et al.</i> , 2008

¹ "↗" indique une augmentation du paramètre, "↘" indique une diminution du paramètre.

Tableau 17. Variations des valeurs de discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$) pour des apports azotés élevés

Organisme	Conditions nutritionnelles	Variations du statut corporel	Tissu	Amplitude de variation des $\Delta^{15}\text{N}$	référence
<i>Augmentation des apports P → Augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$</i>					
Poisson (Tilapia)	Variation du niveau d'apport protéique (tous les niveaux d'apports couvrent les besoins)	?	Carcasse		Focken <i>et al.</i> , 2001
Mammifère (Phoque)	Alternance de régimes HP et LP	?	Plasma et RBC	≈ +0,6‰ pour régime HP	Zhao <i>et al.</i> , 2006
Oiseau (Fauvette)	Variation de la teneur en N du régime de 2,9% à 8,4%	masse corporelle identique pour tous les individus quel que soit le régime	Plasma	+0,5‰	Pearson <i>et al.</i> , 2003
<i>Augmentation des apports P → Diminution des $\Delta^{15}\text{N}$</i>					
Poisson (Carpe)	Variation du niveau d'apport de 3,2 à 22,4 g.kg ^{-0,8} .j ⁻¹ (tous les niveaux d'apports couvrent les besoins)	↗ gain de masse et taux de croissance avec ↗ niveau apport P	Corps entier	-0,6‰ pour apports x7	Gayes-Siesseger <i>et al.</i> , 2004
Poisson (Tilapia)	Variation du niveau d'apport de 0 à 4,8 g.kg ^{-0,8} .j ⁻¹ (le niveau d'apport minimal pour couvrir les besoins est de 2,4 g.kg ^{-0,8} .j ⁻¹)	↗ gain de masse et taux de croissance avec ↗ niveau apport P	Corps entier	-0,3‰ pour des apports x4	Gayes-Siesseger <i>et al.</i> , 2007
Mammifère (Campagnol)	Variation de la teneur en P du régime : 14%, 17% et 26%.		Estomac, poils, collagène, fèces	-0,5 à -3,1‰ selon les tissus	Sare <i>et al.</i> , 2005
Oiseau (Bulbul d'Arabie)	Variation de la teneur en P du régime : 1,1%, 1,5% et 2,6%. (tous les niveaux d'apports couvrent les besoins)		Plasma et RBC	≈ -0,8‰ pour l'apport P le plus élevé	Tsahar <i>et al.</i> , 1998

HP, riche en protéines; LP, pauvre en protéines ; ↗, augmentation.

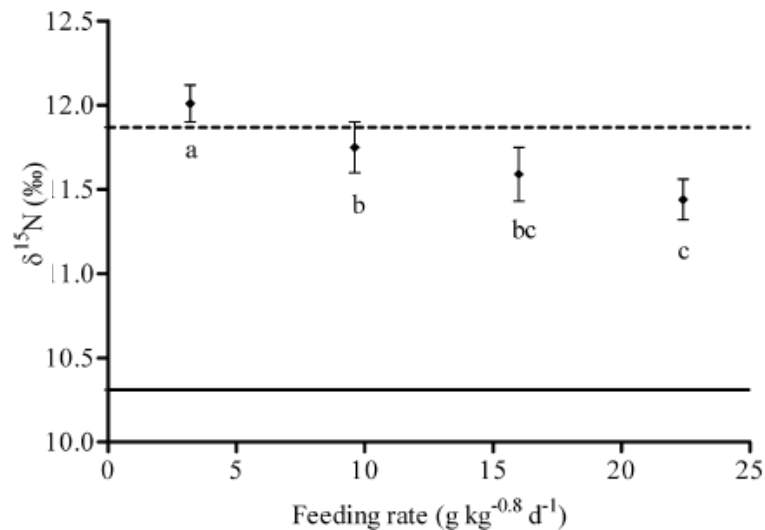


Figure 48. Relation entre les $\delta^{15}\text{N}$ et la quantité de régime consommée chez le poisson (Carpe, *Cyprinus carpio* L.).

Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont des valeurs globales mesurées au niveau corps entier. Le régime contient environ 70% de protéines.

→ Les $\delta^{15}\text{N}$ diminuent lorsque la quantité de protéines ingérées augmente.

D'après Gaye-Siesseger et al. (2004).

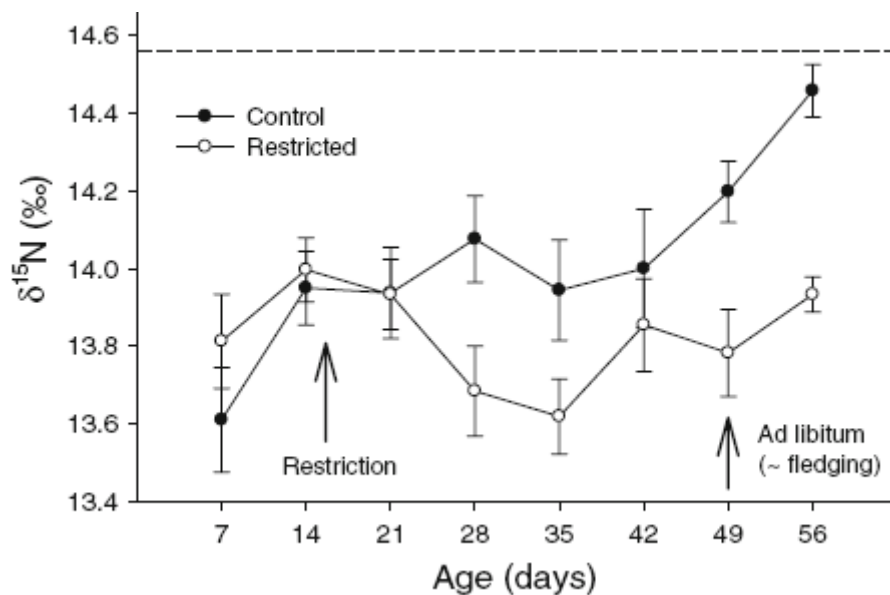


Figure 49. Comparaison des $\delta^{15}\text{N}$ des cellules sanguines chez des oiseaux (macareux rhinoceros, *Cerorhinca monocerata*) nourris *ad libitum* ("Control") ou restreints ("Restricted").

Le régime est identique pour les deux groupes, mais l'apport alimentaire est diminué d'environ 45% dans le groupe d'animaux sous restriction alimentaire. Le taux de croissance d'animaux restreints est plus faible que celui des animaux nourris *ad libitum*.

→ La restriction protéique modérée induit une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cellules sanguines.

D'après Sears et al. (2009).

cataboliques : cette théorie est appuyée par la mise en évidence d'une corrélation négative entre la discrimination isotopique et l'efficacité de la rétention protéique chez le poisson, pour différents niveaux d'apports P, avec le $\Delta^{15}\text{N}$ corporel de chaque poisson qui dépend davantage de son efficacité de rétention protéique que de son niveau d'apport protéique (Gaye-Siessegger *et al.* 2004a) (Figure 50).

En conclusion, les variations observées des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ ne traduisent pas directement des variations quantitatives de l'apport azoté mais reflètent les mécanismes d'adaptation mis en place par le métabolisme azoté en réponse à une variation de l'apport. Globalement, les $\Delta^{15}\text{N}$ sont notamment affectés par des modulations de la stimulation relative des voies anaboliques et cataboliques. Une augmentation de l'utilisation des AA dans les voies anaboliques (augmentation de l'efficacité de rétention protéique) par rapport aux voies cataboliques lors d'une augmentation de l'apport azoté chez des animaux en croissance ou lors de l'adaptation à une restriction protéique modérée induit une diminution de la discrimination isotopique. À l'inverse, une augmentation des processus cataboliques lors de restrictions protéiques sévères (augmentation du catabolisme des P et recyclage des AA endogènes) ou lors d'une augmentation des apports azotés au-delà des besoins sans stimulation supplémentaire de la croissance (augmentation de l'oxydation des AA) entraîne une augmentation de la discrimination isotopique.

Par ailleurs, les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en réponse à des modifications de l'apport azoté sont susceptibles de différer selon les tissus. Par exemple, il est logique de penser que l'enrichissement en ^{15}N d'un tissu particulier lors du jeûne dépend de son activité métabolique, les tissus ayant une activité métabolique plus importante étant plus rapidement affectés par un stress nutritionnel (Hobson *et al.* 1993) (Cherel *et al.* 2005), de la vitesse avec laquelle ses P sont mobilisées et du devenir des AA issus du catabolisme des P endogènes (c.-à-d. s'ils sont désaminés ou réutilisés *in situ* ou au contraire transférés vers d'autres tissus). Selon ce principe, les tissus qui, lors d'un jeûne, maintiennent une masse protéique relativement stable grâce à une forte réutilisation des AA issus de la mobilisation des P endogènes sont supposés s'enrichir davantage en ^{15}N que les tissus dont la masse protéique est simplement diminuée par une réduction du taux de SP (Gannes *et al.* 1998; Lee *et al.* 2012). Cette hypothèse est appuyée par les résultats de Lee qui montrent une augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie mais pas dans le muscle chez des écureuils pendant leur phase d'hibernation (Lee *et al.* 2012), mais n'est pas été vérifiée par les résultats d'Hobson qui rapportent une augmentation plus importante des $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie que dans muscle malgré une perte de masse hépatique également plus importante (Hobson *et al.* 1993).

II.3.iii. Variations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans des situations physiopathologiques particulières chez l'homme

Si de nombreuses études ont été réalisées chez l'animal pour explorer les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction des conditions nutritionnelles, peu de données similaires ont été rapportées chez l'homme. Néanmoins quelques études ont permis de mettre en évidence des variations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans des conditions physiologiques ou pathologiques particulières. Dans presque toutes ces études, les mesures de $\delta^{15}\text{N}$ ont été réalisées sur le cheveu en raison de sa facilité d'échantillonnage (Petzke *et al.* 2010). Bien que le $\delta^{15}\text{N}$ du régime ne soit généralement pas estimé dans ces études qui ne sont pas réalisées dans

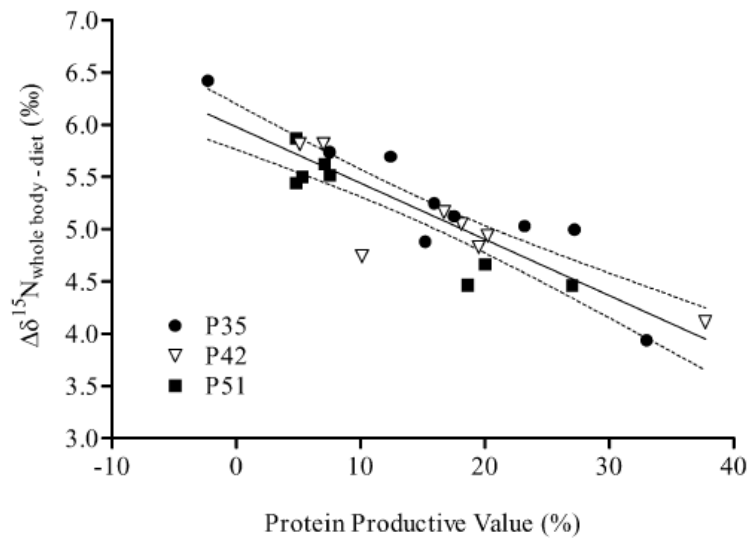


Figure 50. Relation entre les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ corps-entier et l'efficacité de la rétention protéique chez le poisson (Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*).

Les animaux ont été nourris avec des régimes ayant des teneurs en protéines variables (35%, 42% et 51%). L'efficacité de la rétention protéique ("Protein Productive Value") est calculée comme le rapport entre le gain de masse et la quantité de protéines consommées.

→ Les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ sont inversement corrélées à l'efficacité de la rétention protéique mais ne varient pas en fonction du niveau d'apport protéique.

D'après Gaye-Siessegger et al. (2004).

des conditions nutritionnelles contrôlées, on peut néanmoins considérer que les variations rapportées des $\delta^{15}\text{N}$ correspondent à des variations similaires de $\Delta^{15}\text{N}$ étant donné que les individus ne modifient généralement pas leur régime habituel pendant la durée des études.

La plupart des variations des $\delta^{15}\text{N}$ observées chez l'homme sont associées à des variations du poids corporel et sont par conséquent liées à des modulations du métabolisme azoté dans des situations anaboliques ou cataboliques. L'observation, dans les cheveux de femmes au cours de la grossesse, d'une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ corrélée à la prise de poids (Fuller *et al.* 2004) constitue un exemple intéressant de variation dans une situation physiologique anabolique particulière. En effet, la grossesse constitue un état anabolique caractérisé par la synthèse de P fœtales et il a été montré par ailleurs que l'augmentation de la rétention azotée pendant cette période était liée à une diminution de la production et de l'excrétion d'urée (Kalhan 2000) et potentiellement à une augmentation du recyclage de l'urée (McClelland *et al.* 2007). La diminution des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux avec l'augmentation de la prise de poids lors de la grossesse (Figures 51-a&b) traduit bien les modulations des flux azotés induites par cette situation anabolique, avec, d'une part, une augmentation de la proportion d'azote alimentaire utilisée directement pour les SP, qui conduit à une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ des tissus par des mécanismes similaires à ceux précédemment discutés dans le cas d'animaux en croissance, et, d'autre part, une augmentation du recyclage de l'urée corporelle, qui contribue également à la diminution des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires en réincorporant dans le pool d'AA précurseurs des SP de l'N issu de l'hydrolyse de l'urée et appauvri en ^{15}N . De la même manière, chez des personnes anorexiques en phase de reprise de poids, il a aussi été mis en évidence une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ liée à l'augmentation de l'IMC (Mekota *et al.* 2006) (Figure 52). L'augmentation de la masse corporelle chez ces personnes traduit le passage d'une situation catabolique à une situation anabolique, et la diminution des $\delta^{15}\text{N}$ dans ces conditions reflète une diminution progressive de l'utilisation des AA issus du catabolisme des P endogènes au profit d'une utilisation relative plus importante des AA alimentaires. A l'inverse, une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux a été observée chez la femme enceinte lors d'une perte de poids liée aux nausées matinales en début de grossesse (Fuller *et al.* 2005). Cette situation catabolique peut être comparée à une situation de stress nutritionnel, puisque l'apport azoté est limité, et par conséquent l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ s'explique par les mêmes mécanismes que ceux responsables de l'augmentation de la discrimination isotopique chez les animaux pendant les périodes de jeûne, c'est-à-dire une augmentation de l'utilisation des AA issus du catabolisme protéique pour les SP. Ainsi, les variations des abondances isotopiques mesurées dans le cheveu chez l'homme sont capables de traduire des modulations du métabolisme azoté dans des situations anaboliques ou cataboliques caractérisées par des variations de masse corporelle.

Très peu d'études ont, à notre connaissance, examiné les effets de conditions pathologiques sur les abondances isotopiques tissulaires chez l'homme. Une étude a mis en évidence des $\delta^{15}\text{N}$ plus faibles dans les cheveux de personnes atteintes de cirrhose du foie par rapport à des personnes en bonne santé et ayant un régime alimentaire similaire (Petzke *et al.* 2006) (Figure 53). Les $\delta^{15}\text{N}$ de la plupart des AA individuels diffèrent également entre ces deux groupes, la phénylalanine étant par exemple plus enrichie en ^{15}N et l'alanine, le glutamate et la tyrosine plus appauvris en ^{15}N chez les personnes cirrhotiques. Ces

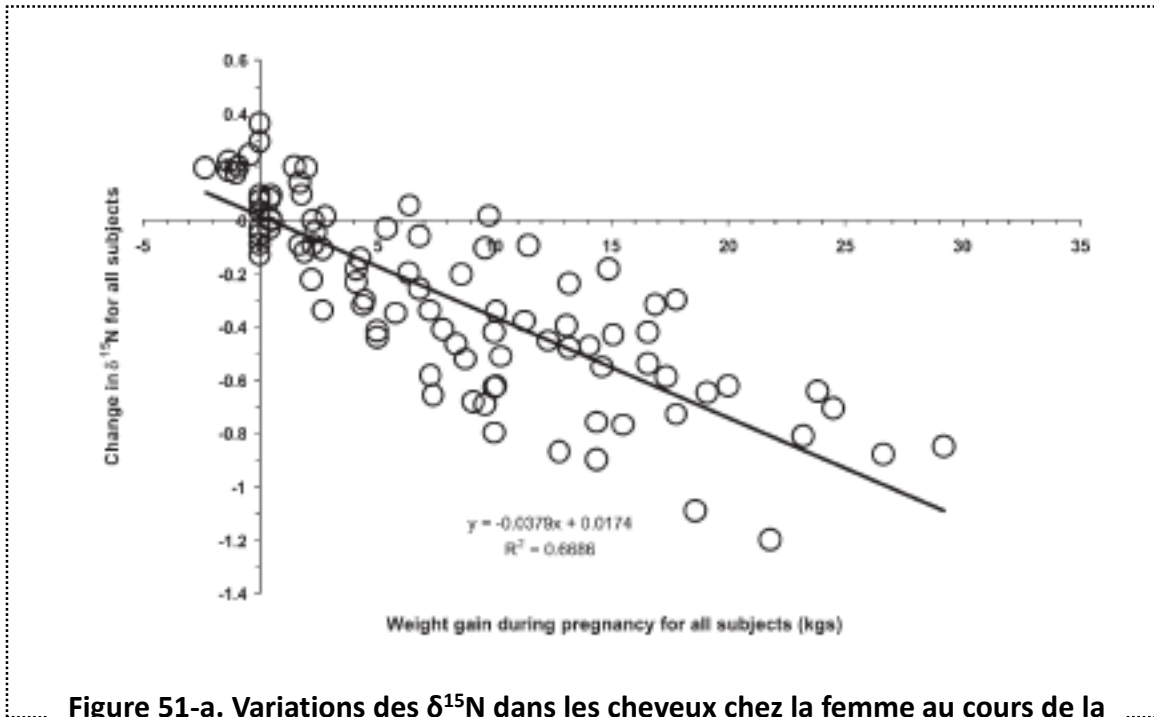


Figure 51-a. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux chez la femme au cours de la grossesse en fonction du gain de poids.

→ Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ diminuent au cours de la grossesse avec l'augmentation de la prise de poids.

D'après Fuller et al. (2004).

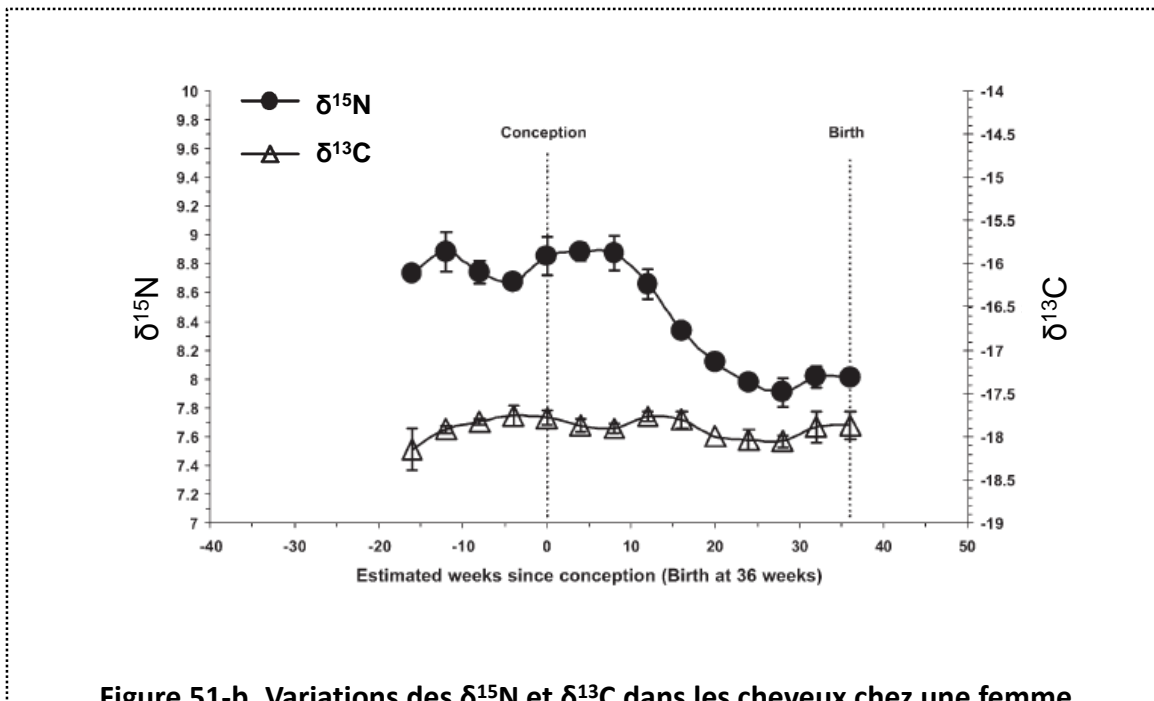


Figure 51-b. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ dans les cheveux chez une femme au cours de la grossesse.

→ Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (mais pas de $\delta^{13}\text{C}$) diminuent au cours de la grossesse avec l'augmentation de la prise de poids.

D'après Fuller et al. (2004).

différences de $\delta^{15}\text{N}$ concernant à la fois le pool protéique global et des AA particuliers reflètent vraisemblablement des altérations du métabolisme des AA hépatiques, et plus particulièrement des modulations de la production d'urée. Par ailleurs, une étude réalisée sur des ossements humains issus de populations de la Nubie soudanaise antique datant de -550 à -350 av JC a montré que les $\delta^{15}\text{N}$ pouvaient constituer des marqueurs de l'ostéopénie (White & Armelagos 1997). Des valeurs plus élevées de $\delta^{15}\text{N}$ ont en effet été mesurées dans le collagène des fémurs d'individus identifiés comme ostéopéniques par rapport à des individus présentant une région corticale non altérée. L'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ reflèterait des variations de l'excrétion d'urée et des altérations de la production rénale de calcitriol dont il a été montré par ailleurs que des taux faibles étaient associés à une augmentation des concentrations d'urée corporelle. Par ailleurs, des modifications des enrichissements isotopiques en ^{18}O et ^2H ont été observées dans l'eau corporelle chez des individus diabétiques (O'Grady *et al.* 2010) ou présentant une dysfonction rénale (Kuo *et al.*).

Ainsi, les quelques données obtenues chez l'homme montrant des modulations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans des conditions de variations de masse corporelle ou de pathologies particulières suggèrent que les abondances isotopiques naturelles pourraient constituer des signatures de modulations du métabolisme azoté dans diverses situations physiopathologiques.

En conclusion, un large corpus de données obtenues chez diverses espèces animales indique que les $\Delta^{15}\text{N}$ varient selon les tissus et les individus et sont susceptibles de refléter des modulations du métabolisme azoté causées par diverses situations nutritionnelles (comme la qualité et la quantité de l'apport protéique) et physiopathologiques. La diversité des sens et amplitudes de variations des $\Delta^{15}\text{N}$ observées dans ces situations traduit la complexité des processus métaboliques adaptatifs mis en jeu, avec potentiellement des processus différents et/ou compensés entre les tissus. Les variations de $\Delta^{15}\text{N}$ qui présentent un intérêt indéniable comme marqueurs potentiels des modulations du métabolisme azoté, sont néanmoins difficiles à interpréter telles quelles en raison de l'intrication des phénomènes métaboliques dont elles résultent. Les hypothèses avancées pour expliquer ces variations de $\Delta^{15}\text{N}$, qui ne sont que suggérées de manière disparate dans les études et que nous avons essayées de synthétiser et de reformuler ici afin de dégager une compréhension intégrée de l'ensemble des résultats de la littérature, sont assez difficiles à vérifier expérimentalement. Dans cette optique, le recours à une approche mécanistique et le développement de modèles mathématiques pour formaliser et tester les théories suggérées est nécessaire afin de mieux comprendre les processus contribuant au fractionnement isotopique et aux variations de l'amplitude de la discrimination isotopique.

III. Interprétation et exploitation des abondances isotopiques par modélisation : relations avec le métabolisme protéique et les flux azotés

Les résultats des études rapportés dans la partie précédente montrent indirectement que les $\delta^{15}\text{N}$ corporels, en tant que paramètres intrinsèques des différents composés azotés corporels, sont des marqueurs privilégiés et intégrés du métabolisme azoté et signent la résultante de différents processus

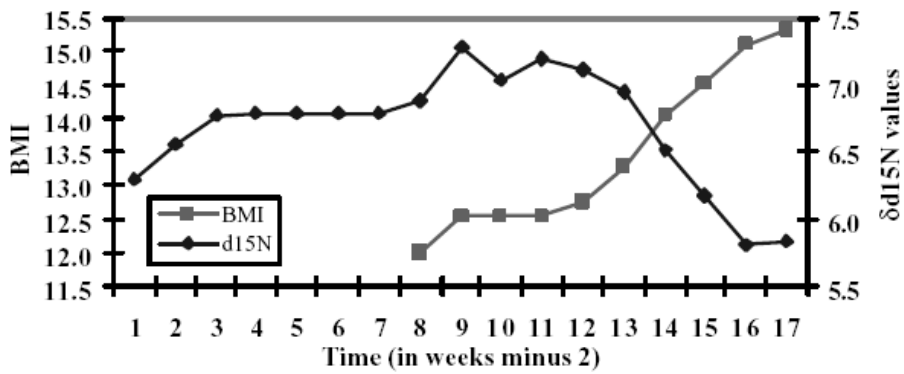


Figure 52. Evolution des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux chez une personne anorexique en phase de reprise de poids.

→ Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ diminuent lors de la reprise de poids et de l'augmentation de l'indice de masse corporelle (BMI).

D'après Mekota et al. (2006).

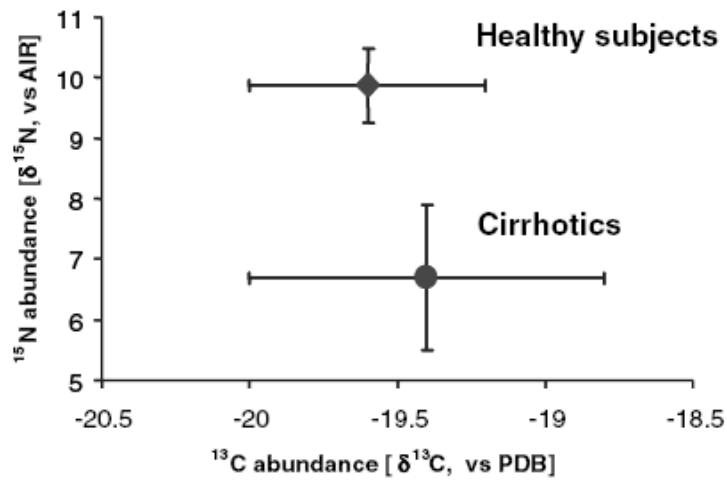


Figure 53. Comparaison des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ mesurés dans les cheveux chez des personnes cirrhotiques par rapport à des personnes en bonne santé.

D'après Petzke et al. (2006).

métaboliques. Quelques modèles ont été proposés pour (i) expliquer la variabilité tissulaire et individuelle des $\delta^{15}\text{N}$ et interpréter cette variabilité en termes de modulations du métabolisme azoté entre tissus ou entre individus dans un état stationnaire donné, et (ii) exploiter les variations temporelles des $\delta^{15}\text{N}$ lors de changement de régimes en termes de cinétiques des flux protéiques (vitesses de renouvellement et d'accrétion protéiques).

III.1. Intérêt de la modélisation pour interpréter et expliquer la variabilité tissulaire ou individuelle des $\delta^{15}\text{N}$ à l'état stationnaire en relation avec les flux azotés

Les mécanismes responsables de l'enrichissement relatif en ^{15}N des individus par rapport à leur régime et des variations de l'amplitude de cet enrichissement sont encore mal identifiés et caractérisés, la plupart des théories émises restant des hypothèses non vérifiées. Les données expérimentales disponibles sont généralement obtenues dans des situations particulières et non contrôlées d'apport azoté et de statut physiologique, et il est par conséquent difficile, à partir de ces données diverses et disparates, d'avoir une image claire et synthétique des différents processus affectant les $\delta^{15}\text{N}$ et de la façon dont ils interagissent (Ponsard & Averbuch 1999). Quelques modèles mathématiques simples ont été développés dans le but de formaliser les connaissances et/ou hypothèses concernant les mécanismes impliqués dans le fractionnement isotopique et d'identifier des règles générales sur le comportement global des enrichissements isotopiques (Schoeller 1999; Ponsard & Averbuch 1999; Balter *et al.* 2006; Martinez del Rio & Wolf 2005). Ces modèles sont des modèles corps-entier, dans lesquels l'ensemble des P corporelles, voire l'ensemble de l'azote corporel, est représenté par un unique compartiment, qui échange avec l'extérieur via une voie d'entrée de l'azote (correspondant à l'apport alimentaire) et une ou deux voies d'élimination de l'azote (correspondant à l'excrétion urinaire et le cas échéant l'excrétion fécale).

III.1.i. Interprétation du saut trophique : lien avec les flux d'excrétion

Un des objectifs des modèles développés est de comprendre pourquoi l'organisme est globalement enrichi en ^{15}N par rapport à son régime d'un facteur d'environ 3-4‰, c'est-à-dire identifier les effets isotopiques (leur localisation, leur sens et leur amplitude) permettant de rendre compte de ce saut trophique (Schoeller 1999; Ponsard & Averbuch 1999; Balter *et al.* 2006). Dans cette optique, Ponsard *et al.* proposent une représentation simplifiée de l'organisme par deux compartiments, correspondant au tractus gastro-intestinal et aux tissus corporels, ces derniers étant alimentés par un flux d'assimilation (c.-à-d. la fraction de l'azoté ingéré qui est absorbé au niveau intestinal) et vidés par un flux de sortie (c.-à-d. l'excrétion de l'azote sous forme urinaire), en considérant l'existence potentielle d'effets isotopiques sur les voies d'assimilation (αI) et/ou d'élimination (αE) de l'azote (Ponsard & Averbuch 1999) (Figure 54). La résolution, à l'état stationnaire, des équations de conservation de la masse, définissant l'évolution des compositions isotopiques du compartiment corporel et des flux entrant et sortant, montre que le compartiment corporel est enrichi en ^{15}N par rapport à l'azoté ingéré si $\alpha\text{E} < \alpha\text{I}$, et que par conséquent, l'existence d'une élimination préférentielle de ^{14}N (c.-à-d. $\alpha\text{E} < 1$) n'est ni une condition nécessaire ni une condition suffisante pour rendre compte du saut trophique. En effet, des

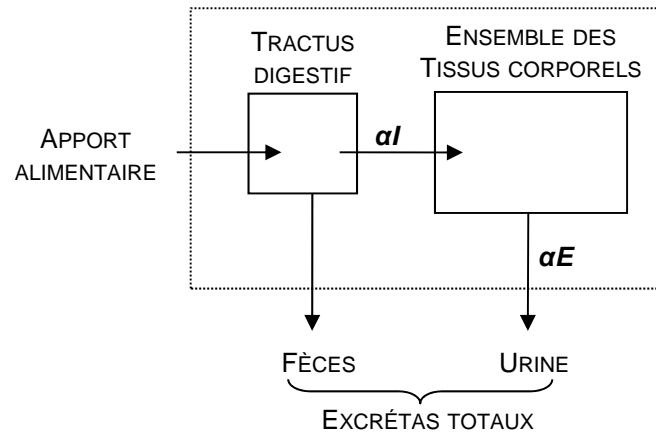


Figure 54. Modèle proposé par Ponsard & Averbuch pour expliquer le saut trophique au niveau corps entier.

L'organisme est représenté par 2 compartiments : le tractus gastro-intestinal et les tissus. Le modèle considère que l'apport alimentaire est soit excrété par voie fécale, soit assimilé avec un fractionnement isotopique défini par le facteur αI . L'azote assimilé non retenu dans l'organisme est excrété par voie urinaire avec un fractionnement isotopique défini par le facteur αE

→ La condition nécessaire et suffisante pour permettre le saut trophique est $\alpha E < \alpha I$.

Adapté d'après Ponsard & Averbuch (1999).

fractionnements isotopiques favorisant le ^{15}N sur les voies d'entrée et de sortie, avec un effet plus important sur la voie d'entrée ($1 < \alpha < \alpha_l$), permettraient également de rendre compte de l'enrichissement relatif en ^{15}N du pool corporel. Cependant, cette configuration peut être écartée sur la base des données expérimentales, puisqu'elle prédit un $\delta^{15}\text{N}$ de l'azote excrété sous forme urinaire supérieur à celui de l'azote ingéré, ce qui est contraire aux valeurs négatives de $\Delta^{15}\text{N}$ généralement rapportées pour les urines. À l'inverse, l'existence d'un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N sur la voie d'élimination, accompagné d'un effet isotopique également en faveur du ^{14}N mais plus important sur la voie d'assimilation ($\alpha_l < \alpha < 1$), conduirait à un appauvrissement en ^{15}N du pool corporel par rapport à l'azote ingéré malgré une élimination préférentielle du ^{14}N . Par conséquent, cette formalisation mathématique permet de conclure que l'observation d'une discrimination isotopique positive entre un individu et son régime est due à l'existence d'un effet isotopique en faveur du ^{14}N plus important sur la voie d'élimination de l'azote que sur la voie d'assimilation (c.-à-d. $\alpha < \alpha_l \leq 1$). De plus, la conservation de la masse impose qu'à l'état stationnaire, les compositions isotopiques des flux entrant et sortant soient identiques. L'étude théorique de Schoeller (Schoeller 1999) aboutit à une conclusion similaire puisqu'il montre, en représentant l'organisme par un unique compartiment avec une voie d'entrée et une voie de sortie, que la seule prise en compte d'un effet isotopique favorisant le ^{14}N sur la voie de sortie permet de rendre compte d'un enrichissement du pool corporel par rapport à l'apport azoté, la composition isotopique de l'azote excrété étant identique à celle de l'azote ingéré dans cette configuration (Schoeller 1999). Dans cette étude, la comparaison de différentes localisations du fractionnement isotopique (c.-à-d. sur les voies d'entrée, de sortie, ou d'échange entre les compartiments) dans des modèles à différents niveaux de compartimentation (c.-à-d. représentant un organisme global avec 1 à 3 compartiments) à l'état stationnaire, permet par ailleurs d'identifier d'autres configurations capables d'expliquer le saut trophique. Ainsi, lorsque l'organisme est représenté par deux compartiments, l'un correspondant à un pool métabolique actif et l'autre à un pool de réserves (Figure 55-a), deux phénomènes distincts sont susceptibles d'induire un enrichissement en ^{15}N du pool de réserves corporelles : un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N lors des processus d'élimination de l'N, tel que supposé dans la configuration la plus simple, et un fractionnement isotopique en faveur du ^{15}N au cours des SP. Le modèle proposé par Balter (Figure 56-a) diffère des modèles précédents par le fait qu'il inclut plusieurs compartiments corporels correspondant à différentes formes azotées : les P corporelles, les AA et la glutamine plasmatiques, et l'urée corporelle (Balter *et al.* 2006). Les résultats de simulations, obtenus à partir de différentes configurations de répartition et d'amplitude des effets isotopiques, montrent qu'il est possible de reproduire un $\Delta^{15}\text{N}$ du pool de P corporelles de 3 à 5‰ par une combinaison de fractionnements isotopiques sur les voies de synthèse de la glutamine, de SP et de synthèse et d'hydrolyse de l'urée. Ce modèle ainsi paramétré prédit que la glutamine plasmatique est appauvrie en ^{15}N par rapport au régime tandis que les autres AA plasmatiques sont enrichies en ^{15}N par rapport au régime et aux P corporelles (Figure 56-b). Le saut trophique est dans ce cas en partie expliqué par l'excrétion urinaire d'ammoniaque fortement appauvri en ^{15}N par rapport au régime, l'urée excrétée étant à l'inverse légèrement enrichie en ^{15}N . Dans ce modèle, le recyclage entéro-hépatique de l'urée

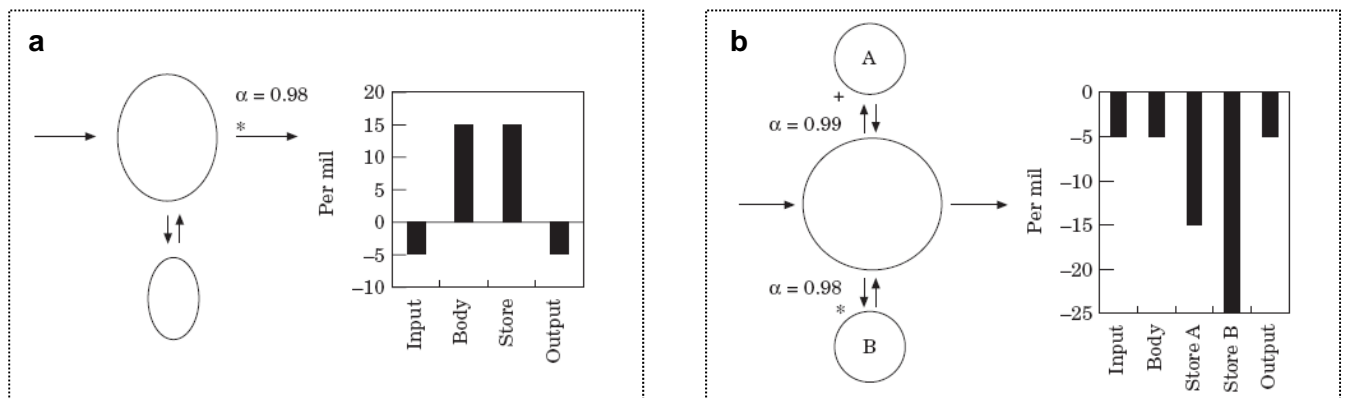


Figure 55. Modèles proposés par Schoeller *et al.* pour expliquer le saut trophique et les variations tissulaires de $\delta^{15}\text{N}$.

Ce modèle décrit les effets d'un fractionnement isotopique sur les $\delta^{15}\text{N}$ des compartiments d'un système ouvert représentant l'organisme.

A. L'organisme est représenté par 2 compartiments : un pool métabolique et un pool de réserve. L'existence d'un effet isotopique (*) sur la voie d'élimination induit une discrimination isotopique positive dans les pools corporels.

B. L'organisme est représenté par 3 compartiments : un pool métabolique central et deux pools de réserve. L'existence d'effets isotopiques (*) et (+) d'ampleur différente sur les réactions d'équilibre entre pool métabolique et chaque pool de réserve engendre des différences de composition isotopique entre les deux pools de réserves.

D'après Schoeller et al. (1999).

contribue également à l'enrichissement relatif en ^{15}N du pool protéique corporel, en favorisant l'épargne et la réincorporation d'N enrichi en ^{15}N , l'urée ayant un $\delta^{15}\text{N}$ positif. A l'inverse, selon le modèle de Schoeller, l'urée étant appauvrie en ^{15}N , ce processus ne pourrait conduire à l'augmentation de l'enrichissement du pool corporel que si les composés azotés appauvris en ^{15}N produits par les bactéries à partir de l'urée étaient excrétés dans les fèces, ce qui n'est pas cohérent avec les données expérimentales rapportant des pertes fécales plus riches en ^{15}N que le régime.

Par ailleurs, plusieurs phénomènes pourraient expliquer la discrimination isotopique positive observée dans les fèces. Sur la base d'un modèle incluant un compartiment supplémentaire représentant le tractus gastro-intestinal, Schoeller suggère l'existence d'un flux de retour d'N endogène depuis le compartiment corporel vers le tractus gastro-intestinal, le mélange de cet azote endogène enrichi en ^{15}N avec l'azote alimentaire conduirait à l'excrétion par voie fécale d'N enrichi en ^{15}N par rapport au régime mais appauvri par rapport au pool corporel. Le modèle de Ponsard, quant à lui, rend compte d'une discrimination positive dans les fèces par l'existence d'un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N lors de l'assimilation.

Globalement, tous les modèles développés, reposant sur une représentation simple et à l'échelle corps-entier du fractionnement isotopique, expliquent l'existence systématique d'un saut trophique par l'excrétion préférentielle de ^{14}N par voie urinaire. Des mécanismes plus précis ou alternatifs, tels que l'excrétion d'ammoniaque très appauvri en ^{15}N , le recyclage de l'urée ou l'existence d'un fractionnement isotopique sur les voies d'assimilation, sont proposés par certains modèles, mais ces hypothèses, qui n'ont pas été vérifiées expérimentalement en raison d'un manque de données, notamment concernant les enrichissements des différentes formes azotées excrétées dans les urines (NH_4 vs. urée), ne peuvent donc pas être départagées.

Si les modèles cités ci-dessus permettent d'expliquer l'enrichissement relatif global des individus par rapport à leur régime, leur mode de représentation très simplifié de l'organisme n'est pas capable de rendre compte des différences d'enrichissement isotopique observées entre les tissus. Le travail théorique de Schoeller suggère néanmoins quelques pistes d'explications. D'une part, la représentation de l'organisme par un modèle constitué de 3 pools, dont un pool métabolique et 2 pools de réserves, qui échangent avec le pool métabolique selon des réactions d'équilibre, montre que des enrichissements isotopiques distincts peuvent être observés dans les 2 pools de réserves s'il existe des fractionnements isotopiques d'amplitude différente sur chacune des réactions d'équilibre (Figure 55-b). Cette configuration pourrait représenter deux tissus périphériques alimentés par le pool d'AA libres circulant et expliquer l'enrichissement différentiel en ^{15}N de ces deux tissus. D'autre part, dans un modèle constitué de deux compartiments avec une voie de sortie d'azote depuis chaque compartiment et un fractionnement isotopique sur la voie d'échange, les enrichissements isotopiques dans les deux compartiments sont différents et varient en fonction de la répartition de l'azote dans chacune des voies d'élimination (Schoeller 1999).

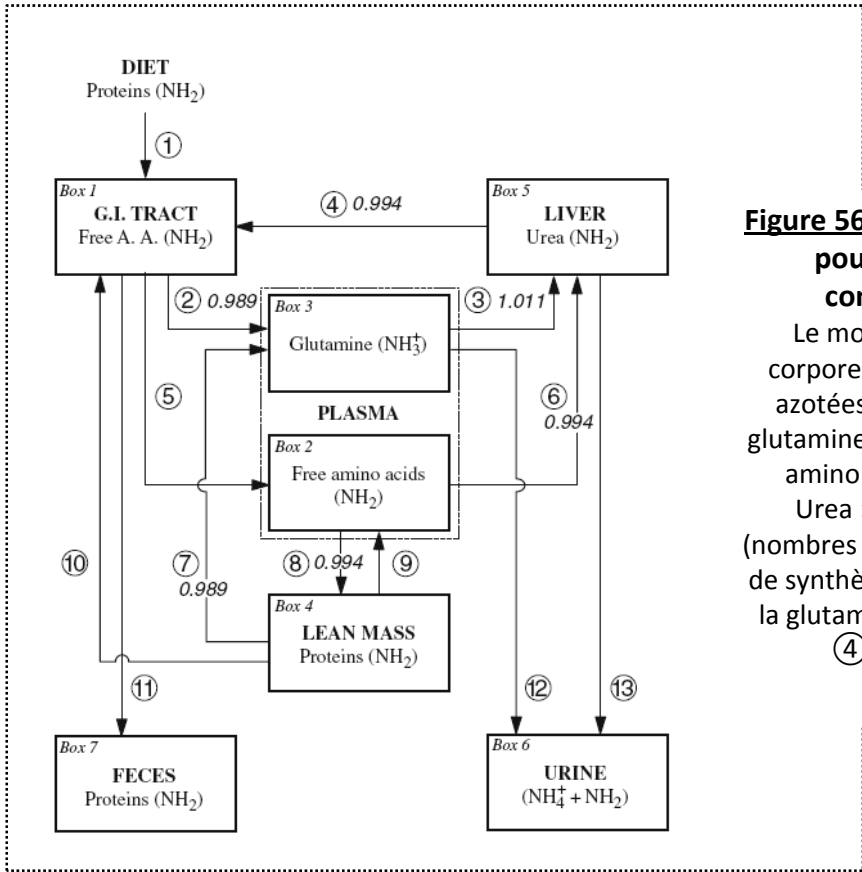


Figure 56-a. Modèle proposé par Balter *et al.* pour prédire les $\Delta^{15}\text{N}$ de différents compartiments azotés corporels.

Le modèle inclut plusieurs compartiments corporels correspondant à différentes formes azotées : les P corporelles (« lean mass »), la glutamine et aux autres AA plasmatiques (« Free amino acids ») et l'urée corporelle (« Liver Urea »). Des fractionnements isotopiques (nombres en italique) sont considérés sur les voies de synthèse de l'urée (③ et ⑥), de synthèse de la glutamine (② et ⑦), d'hydrolyse de l'urée (④) et de synthèse protéique (⑧).

D'après Balter et al. (2006).

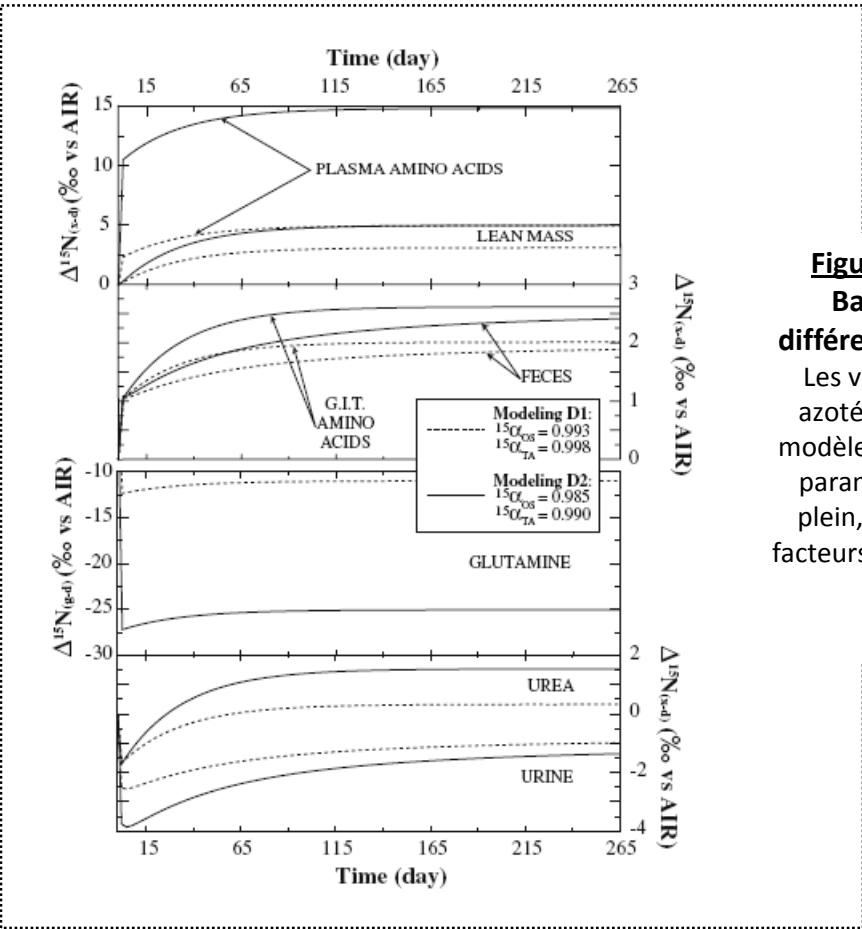


Figure 56-b. Prédications du modèle de Balter *et al.* concernant les $\Delta^{15}\text{N}$ de différents compartiments azotés corporels.

Les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ dans les compartiments azotés corporels ont été simulées à partir du modèle présenté dans la figure C24a selon deux paramétrages, D1 en pointillés et D2 en trait plein, différant par les valeurs attribuées aux facteurs de fractionnement sur les voies ②, ③, ④, ⑥, ⑦ et ⑧.

D'après Balter et al. (2006).

III.1.ii. Interprétation des modulations des $\Delta^{15}\text{N}$ selon les conditions : lien avec des modulations de l'utilisation relative des AA dans les voies anaboliques et cataboliques

Un 2^{ème} objectif des modèles simples développés à l'échelle corps-entier est d'expliquer par quels mécanismes la discrimination isotopique entre un individu et son régime varie dans des états particuliers tels que la croissance ou le jeûne. Les résultats théoriques de modélisation de Martinez del Rio & Wolf permettent d'identifier plusieurs situations conduisant à des variations de $\Delta^{15}\text{N}$ et prédisent une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ lors d'une diminution de la qualité protéique, lors d'une augmentation du niveau d'apport protéique et au cours du jeûne (Martinez del Rio & Wolf 2005). Ces prédictions sont obtenues à partir d'un modèle corps-entier similaire aux modèles décrits précédemment, avec un seul compartiment azoté corporel, un flux d'apport azoté et deux voies d'élimination, et en faisant l'hypothèse qu'un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N est associé à l'une de ces deux voies d'élimination, qui correspondrait à l'excrétion urinaire de l'azote (Figure 57). L'équation décrivant l'évolution de l'enrichissement isotopique dans le compartiment corporel est définie à partir d'équations de conservation de la masse et indique qu'une diminution du rapport entre les quantités totales d'azote ingérées et excrétées ou une augmentation de la quantité relative d'azote excrétée par la voie induisant un fractionnement isotopique (c.-à-d. par la voie urinaire) induisent une augmentation de l'enrichissement isotopique dans le pool corporel. Le fait que l'amplitude de la discrimination isotopique soit dépendante de la quantité d'azote excrétée par voie urinaire permet d'expliquer son accroissement lorsque la quantité d'apport P augmente et lorsque la qualité de l'apport P diminue, qui sont deux situations conduisant à une augmentation du catabolisme des AA et de l'élimination de l'azote par voie urinaire. Par ailleurs, les variations de l'enrichissement isotopique en fonction de la quantité relative d'azote excrété par rapport à l'azote ingéré rendent compte de la variation de la discrimination isotopique en fonction du bilan azoté, avec notamment une diminution lors de la croissance et une augmentation lors du jeûne. Il faut noter que ces variations sont cependant également dépendantes de l'existence d'un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N sur la voie d'élimination de l'azote. Les prédictions du modèle de Ponsard, qui suppose également un effet isotopique sur la voie d'élimination, permettent d'aboutir aux mêmes conclusions concernant l'augmentation de la discrimination isotopique lors du jeûne mais concluent à une absence de variation du $\Delta^{15}\text{N}$ chez les individus en croissance, à condition que la quantité d'azote ingéré pendant la période de croissance soit largement supérieure au poids corporel de l'individu (Ponsard & Averbuch 1999), ce qui est probablement vrai en fin de croissance, mais pas nécessairement chez les individus plus jeunes. Le modèle développé par Balter prédit quant à lui que les $\Delta^{15}\text{N}$ atteints à l'équilibre isotopique ne dépendent pas du poids, mais qu'il y a une augmentation de la discrimination isotopique dans des situations impliquant une augmentation du recyclage de l'urée (Balter *et al.* 2006).

Les prédictions de ces modèles suggèrent donc que les $\Delta^{15}\text{N}$ varient principalement en réponse à des modulations relatives de l'excrétion urinaire. Cependant, malgré leur intérêt pour identifier les modulations du métabolisme azoté qui sont capables d'induire des variations de la discrimination isotopique et pour tester la plausibilité de diverses hypothèses, ces prédictions présentent deux

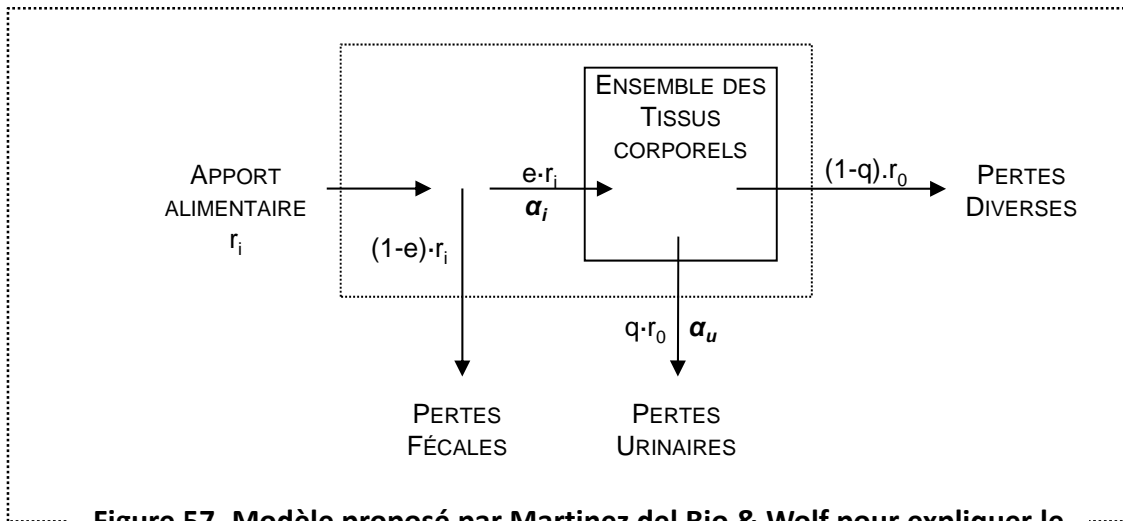


Figure 57. Modèle proposé par Martinez del Rio & Wolf pour expliquer le saut trophique au niveau corps-entier et ses modulations.

L'organisme est représenté par un unique compartiment. Le modèle considère qu'une fraction "e" de l'apport alimentaire " r_i " est assimilée (avec un fractionnement isotopique α_i). Le flux " r_0 " correspond à l'azote assimilé non retenu dans l'organisme et qui est éliminé. Une fraction "q" de ce flux est éliminée par la voie urinaire à laquelle est associée un fractionnement isotopique α_u .

Adapté d'après Martinez del Rio & Wolf (2005).

principales limites. La première est liée à leur caractère hypothèse-dépendant, ces prédictions dépendant fortement de la supposition de l'existence d'un fractionnement isotopique en faveur du ^{14}N lors de l'élimination de l'azote, puisque c'est ce fractionnement qui explique la dépendance des variations de $\Delta^{15}\text{N}$ vis-à-vis de la quantité d'azote excrété. La deuxième limite, qui est d'ailleurs évoquée par Martinez del Rio & Wolf (Martinez del Rio & Wolf 2005), est liée au fait que ces modèles considèrent l'organisme à l'échelle corps-entier et ne prennent pas en compte les modulations du métabolisme azoté au niveau tissulaire. Or la considération des phénomènes de fractionnement isotopique au niveau tissulaire est d'une part indispensable pour expliquer les différences d'enrichissements isotopiques observées entre les tissus et d'autre part probablement nécessaire pour expliquer les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ observées dans des situations telles que le jeûne dont il a été montré qu'elles affectaient de manière inégale les différents tissus.

L'étude récente de Lee (Lee *et al.* 2012) constitue une première approche dans la prise en compte des processus métaboliques à l'échelle tissulaire pour expliquer les variations des enrichissements isotopiques lors d'un jeûne. Cette étude propose deux modèles distincts capables d'expliquer une augmentation de la discrimination isotopique lors du jeûne, modèles qui diffèrent par les processus tissulaires responsables de cette augmentation. Le premier modèle, nommé modèle catabolique, suppose que cette augmentation de l'enrichissement isotopique serait due à une perte préférentielle de ^{14}N lors de la DP (c.-à-d. l'existence d'un effet isotopique en faveur du ^{14}N associé à l'hydrolyse des P). Selon ce modèle, une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ serait observée lors du jeûne dans les tissus dont le taux de DP est augmenté, comme le foie et le muscle. Le modèle concurrent, nommé modèle anabolique, suppose au contraire que l'augmentation de l'enrichissement isotopique est due à la synthèse de P à partir d'AA enrichis en ^{15}N , en raison de l'excrétion préférentielle de ^{14}N et de l'absence d'apport d'AA moins enrichis par l'alimentation. Selon ce modèle, lors du jeûne, les $\Delta^{15}\text{N}$ augmenteraient dans les tissus maintenant un taux de SP important, comme le foie, mais ne seraient pas modifiés dans les tissus ayant un taux de protéosynthèse diminué, comme le muscle. Les données expérimentales rapportées dans cette étude mettent en évidence une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie mais une absence de variation des $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle, chez des écureuils, pendant leur phase d'hibernation et appuient donc la théorie du modèle anabolique. Ce modèle pourrait également expliquer l'absence de variation des enrichissements isotopiques lors du jeûne rapportée dans plusieurs études (Castillo & Hatch 2007; McCue & Pollock 2008). A l'inverse, les résultats d'Hobson, qui montrent une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans le foie et le muscle chez des oies à jeun, avec une perte de masse dans ces deux tissus, sont davantage en faveur du modèle catabolique (Hobson *et al.* 1993). Si les données expérimentales ne permettent pas de conclure nettement en faveur de l'un des deux modèles, les deux processus pouvant d'ailleurs se produire de façon concomitante, cette étude souligne l'importance de considérer les variations de $\delta^{15}\text{N}$ à un niveau tissulaire et montre qu'il n'est pas possible de tirer des conclusions générales quant au statut nutritionnel ou au bilan azoté global d'un individu sur la base de la mesure des variations de $\delta^{15}\text{N}$ dans un seul tissu.

Malgré le lien évident entre les variations de l'amplitude des $\Delta^{15}\text{N}$ et les modulations du métabolisme azoté, les mesures de ces variations de $\Delta^{15}\text{N}$ ne sont pas ou très peu utilisées pour quantifier des modulations de flux azotés, la plupart des modèles développés fournissant uniquement des informations qualitatives, en raison vraisemblablement d'un manque de données expérimentales en conditions contrôlées. Une seule étude a proposé une interprétation quantitative des différences d'enrichissement isotopique mesurées entre les P plasmatiques et l'urée excrétée en termes d'importance relative des voies anabolique et catabolique au niveau hépatique (Sick *et al.* 1997). Cette interprétation repose sur un modèle simple du métabolisme hépatique, constitué d'un embranchement métabolique avec un pool d'AA précurseurs utilisés soit pour la SP soit pour la production d'urée, avec un effet isotopique plus important sur la voie de production d'urée. Selon cette représentation, et sous d'importantes hypothèses simplificatrices, à l'équilibre isotopique, la différence de $\delta^{15}\text{N}$ mesurée entre les P plasmatiques (enrichies en ^{15}N) et l'urée (appauvrie en ^{15}N) dépend du rapport entre les quantités d'AA précurseurs utilisés pour la SP et pour la production d'urée. Ainsi, plus la proportion d'utilisation anabolique augmente (c.-à-d. plus la synthèse de P est importante par rapport à celle d'urée), moins les P sont enrichies en ^{15}N et plus l'urée est appauvrie. Le taux relatif de SP est estimé par le rapport $(\delta^{15}\text{N}_{\text{IG}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{urée}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{PPI}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{urée}})$, avec $\delta^{15}\text{N}_{\text{IG}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{PPI}}$ et $\delta^{15}\text{N}_{\text{urée}}$ correspondant aux $\delta^{15}\text{N}$ mesurés respectivement dans les P intestinales, les P plasmatiques et l'urée (Figure 58). Ces estimations, calculées à partir de données obtenues chez des rats soumis à des régimes contenant des P de nature différente (lactosérum, caséine, soja et blé) et en quantités variables, montrent que la synthèse relative d'urée augmente avec le niveau d'apport protéique et que, dans le cas des P de lactosérum et de caséine, l'utilisation des AA pour les SP est maximale pour un apport azoté optimal par rapport aux besoins. Si les hypothèses simplificatrices posées dans ce modèle sont discutables, ce travail présente l'intérêt de montrer une utilisation possible des mesures d'abondances isotopiques naturelles pour quantifier certains flux azotés.

En conclusion, les modèles développés fournissent essentiellement des informations qualitatives permettant d'expliquer la discrimination isotopique et les variations de son amplitude en fonction de l'excrétion azotée. Cependant, le manque de données expérimentales obtenues en conditions contrôlées limite la vérification des prédictions de ces modèles et leur utilisation pour la quantification des flux azotés et de leurs modulations.

III.2. Analyse des variations temporelles des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires en termes de vitesses de renouvellement et de croissance tissulaires

III.2.i. Variabilité inter-tissulaire des dynamiques d'incorporation isotopique après un changement de régime

La comparaison des $\Delta^{15}\text{N}$ entre tissus ou l'interprétation des $\Delta^{15}\text{N}$ dans une situation donnée en termes de flux azotés nécessite que les tissus soient à l'équilibre isotopique, c'est-à-dire que leur composition isotopique soit stable. Ceci est en fait rarement le cas en conditions naturelles, les enrichissements isotopiques variant dans le temps en fonction des changements de régimes des individus. En effet, étant donné que la composition isotopique des tissus reflète la composition

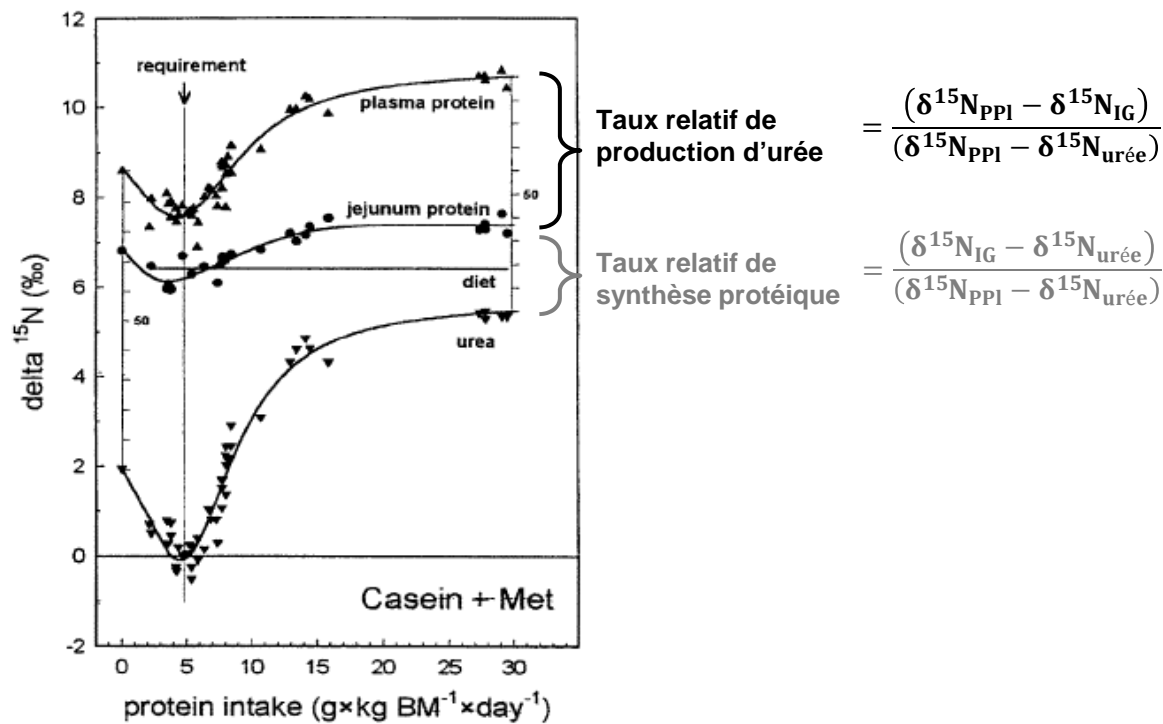


Figure 58. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ des P plasmatiques, des P intestinales et de l'urée en fonction du niveau d'apport protéique chez des rats nourris à un régime à base de caséine complétement en méthionine.

Les taux relatifs de synthèse protéique et de production d'urée au niveau hépatique peuvent être estimés selon les équations indiqués sur la figure (avec $\delta^{15}\text{N}_{\text{IG}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{PPI}}$ et $\delta^{15}\text{N}_{\text{urée}}$ correspondant respectivement aux $\delta^{15}\text{N}$ des P intestinales, P plasmatiques et urée), sous l'hypothèse que la différence de $\delta^{15}\text{N}$ mesurée entre les protéines plasmatiques et l'urée dépend des quantités relatives de protéines et d'urée produites.

D'après Sick et al. (1997).

isotopique du régime, au facteur de discrimination isotopique près, tout changement de régime (avec modification de sa composition isotopique) entraîne un changement de la composition isotopique des tissus. Ce changement n'est pas instantané et la composition isotopique des tissus évolue progressivement, au fur et à mesure que les composés alimentaires sont utilisés pour la synthèse des tissus, vers un nouvel état d'équilibre isotopique, et cette évolution isotopique s'effectue selon une trajectoire et à une vitesse différentes entre tissus. La vitesse à laquelle un tissu incorpore la nouvelle composition isotopique du régime dépend principalement de deux facteurs : le renouvellement tissulaire et la croissance du tissu. Les vitesses d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$ corporels varient donc selon les tissus, en conséquence des différences des taux de renouvellement tissulaires (Figure 59). Ainsi, les tissus splanchniques tels que le foie et l'intestin incorporent la signature isotopique du régime plus rapidement que des tissus périphériques tels que le muscle ou le collagène (Wolf *et al.* 2009; Kurlle 2009; Arneson *et al.* 2006; MacNeil *et al.* 2006).

La connaissance de la vitesse à laquelle un tissu incorpore la signature isotopique et par conséquent du temps nécessaire à différents tissus pour qu'ils atteignent un nouvel équilibre isotopique après un changement de régime, est déterminante pour l'interprétation et les comparaisons inter-tissulaires des mesures d'abondances isotopiques naturelles (MacAvoy *et al.* 2005; del Rio & Carleton). Par ailleurs, la connaissance de l'amplitude des différences de vitesse d'incorporation isotopique entre les tissus est également utile en écologie pour dater des changements de régime, étudier la variabilité temporelle de l'utilisation des ressources alimentaires (Martinez del Rio *et al.* 2009; Phillips & Eldridge 2006), ou estimer des temps de résidence dans un milieu donné (Hobson 1999; Oppel & Powell 2010), puisque les tissus qui ont une vitesse élevée d'incorporation isotopique reflètent le $\delta^{15}\text{N}$ des ressources alimentaires consommées récemment, alors que les tissus qui ont des vitesses d'incorporation isotopique plus lentes reflètent le $\delta^{15}\text{N}$ des ressources alimentaires consommées sur une période de temps plus longue (Figure 60). Afin de quantifier ces vitesses d'incorporation isotopique dans des conditions contrôlées et d'identifier précisément les facteurs déterminant ces vitesses, de nombreuses expériences dites de changement de régime («diet-shift») ont été réalisées en laboratoire sur des espèces très variées. Dans ces expériences, des animaux, ayant été nourris pendant un temps suffisamment long avec un premier régime, tel que leurs tissus sont supposés avoir atteint l'équilibre isotopique, sont soumis à un nouveau régime ayant une composition isotopique distincte du premier. Les enrichissements isotopiques tissulaires sont alors mesurés à différents temps après le changement de régime et les cinétiques d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$ (trajectoires isotopiques) ainsi déterminées sont analysées par des modèles mathématiques (Figure 59).

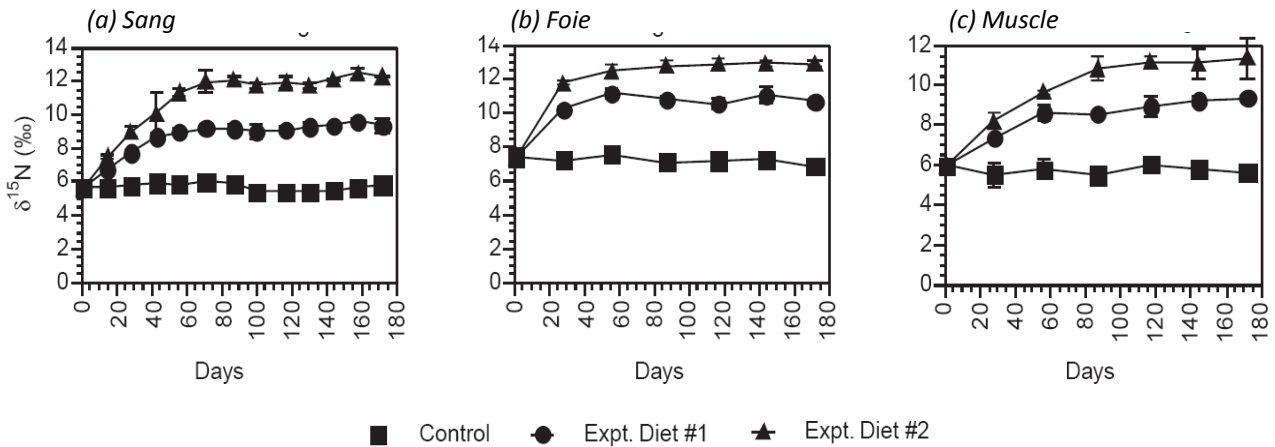


Figure 59. Evolutions des $\delta^{15}\text{N}$ dans le sang (a), le foie (b) et le muscle (c) après une modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime chez la souris.

Les valeurs rapportées sont issues d'une expérimentation de type « diet-shift » dans laquelle les souris, initialement nourries avec un régime contrôle pendant 3 mois, sont soit maintenues sous ce régime initial (groupe « control »), soit soumise à un nouveau régime (« Expt. Diet #1 » ou « Expt. Diet #2 ») dont le $\delta^{15}\text{N}$ est supérieur à celui du régime initial.

→ Les $\delta^{15}\text{N}$ évoluent plus rapidement dans le foie que dans le muscle après le changement de régime.

D'après Arneson et al. (2006).

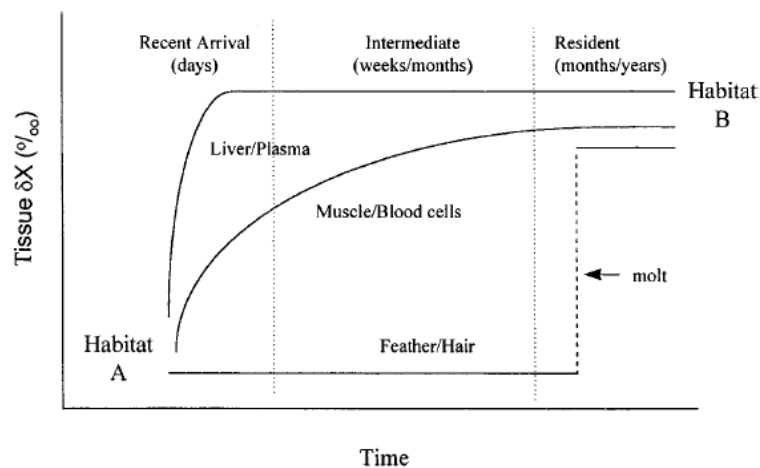


Figure 60. Evolutions théoriques des teneurs isotopiques d'un élément X (δX) dans différents tissus chez un individu migrant d'un milieu A à un milieu B dont les ressources présentent des compositions isotopiques distinctes.

La comparaison des enrichissements isotopiques entre les tissus, dont les vitesses d'évolution diffèrent, renseignent sur la durée de résidence d'un individu dans le milieu B, si les taux de renouvellement isotopique de ces tissus sont connus.

D'après Hobson (1999).

III.2.ii. Analyse des dynamiques tissulaires d'incorporation isotopique en termes de taux de croissance et/ou d'activité métabolique.

Dans la majorité des études de «diet-shift», l'évolution de la composition isotopique d'un tissu ($\delta^{15}\text{N}_T$) au cours du temps est décrite par une fonction exponentielle de la forme :

$$\delta^{15}\text{N}_T(t) = a + b \cdot \exp^{-\lambda \cdot t} \quad (\text{Eq.1})$$

Cette équation décrit le comportement général d'un modèle à un compartiment avec des cinétiques de premier ordre, et son utilisation équivaut donc à représenter un tissu par un unique compartiment azoté homogène (Martinez del Rio & Wolf 2005). Les paramètres a , b et λ de cette équation sont déterminés par ajustement aux données expérimentales selon des méthodes de régression non-linéaire et représentent respectivement : la valeur de l'enrichissement isotopique du tissu au nouvel état d'équilibre ($\delta^{15}\text{N}_f$), la variation du $\delta^{15}\text{N}$ entre l'état initial et l'équilibre isotopique ($\delta^{15}\text{N}_f - \delta^{15}\text{N}_0$) et le taux de renouvellement du ^{15}N dans le tissu (Tieszen *et al.* 1983; Miller *et al.* 2008). L'équation 1 peut donc être réécrite sous la forme :

$$\delta^{15}\text{N}_T(t) = \delta^{15}\text{N}_f + (\delta^{15}\text{N}_f - \delta^{15}\text{N}_0) \cdot \exp^{-\lambda \cdot t}$$

Pour tenir compte du fait que la vitesse d'incorporation isotopique dépend à la fois de la croissance et du renouvellement métabolique, le paramètre λ peut être divisé en deux composantes, k et m , telles que :

$$\lambda = m + k \quad \text{avec } k = \frac{1}{M} \cdot \frac{dM}{dt}$$

où m représente le taux de renouvellement métabolique du tissu considéré, k le taux de croissance de ce tissu, M sa masse ou la masse corporelle totale de l'individu (Hesslein *et al.* 1993). Les trajectoires isotopiques sont donc couramment modélisées par l'équation suivante :

$$\delta^{15}\text{N}_T(t) = \delta^{15}\text{N}_f + (\delta^{15}\text{N}_f - \delta^{15}\text{N}_0) \cdot \exp^{-(k+m) \cdot t} \quad (\text{Eq.2})$$

Si l'individu présente une croissance exponentielle (c.-à-d. k est constant), le paramètre k peut être calculé à partir des mesures expérimentales d'évolution de la masse du tissu (M) au cours du temps selon la relation : $k = \frac{\ln(M(t)/M_0)}{t}$, où M_0 est la masse initiale du tissu. Le paramètre m est alors la seule inconnue de l'équation et est déterminé par l'ajustement des valeurs prédites par le modèle aux mesures expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$. Dans le cas d'une croissance non exponentielle, l'estimation des contributions relatives de la croissance et du renouvellement métabolique est plus difficile, si bien que l'hypothèse d'une croissance exponentielle est couramment faite sans être nécessairement vérifiée. Carleton & Martinez del Rio (Carleton & Martinez del Rio 2005) proposent une formulation différente de λ , en supposant que la vitesse d'incorporation isotopique est proportionnelle à la masse corporelle selon la relation allométrique : $\lambda = a \cdot M^{-b}$, avec b estimé par régression non linéaire à environ -0,25. Cette formulation n'a cependant, à notre connaissance, pas été réutilisée dans d'autres études.

L'utilisation du modèle défini par l'équation 2 permet de distinguer la contribution relative de la croissance et du renouvellement métabolique à l'incorporation isotopique dans les tissus. Les résultats obtenus chez différentes espèces indiquent que cette contribution relative varie principalement selon le stade de développement des individus : une contribution majoritaire, voire totale, de la croissance à l'incorporation isotopique a été rapportée chez des animaux, principalement des ectothermes (poissons,

reptiles), très jeunes ou à croissance rapide (McIntyre & Flecker 2006; Reich *et al.* 2008; MacNeil *et al.* 2006; Tarboush *et al.* 2006; Hesslein *et al.* 1993), alors que chez des rongeurs adultes ayant presque atteint leur taille maximale, la croissance n'expliquerait que 10% de l'incorporation isotopique (MacAvoy *et al.* 2005). La contribution significative du renouvellement métabolique à l'incorporation isotopique est soulignée par l'inadéquation observée entre les cinétiques de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées expérimentalement et celles prédites par un modèle ne prenant en compte que la croissance (MacAvoy *et al.* 2005; Reich *et al.* 2008) (Figure 61). Les valeurs de taux de renouvellement isotopiques estimées par ces modèles mettent également en évidence des différences inter-tissulaires de renouvellement isotopique. Cependant, cette variabilité inter-tissulaire est beaucoup plus faible dans les études montrant un effet prédominant du taux de croissance sur la vitesse d'incorporation isotopique (Reich *et al.* 2008) le fort taux de croissance masquant probablement les différences inter-tissulaires de renouvellement métabolique. Les différences inter-tissulaires de vitesses d'incorporation isotopique sont donc d'autant plus marquées que la contribution du renouvellement métabolique à l'incorporation isotopique est prédominante, ce qui indique que ces différences sont principalement liées à des variations du paramètre m selon les tissus. Ainsi, les études réalisées chez les rongeurs, rapportent des taux de renouvellement métabolique (m) systématiquement plus élevés (2 à 7 fois) pour le foie que pour le muscle (MacAvoy *et al.* 2005; Arneson *et al.* 2006; Miller *et al.* 2008; Kurle 2009).

Toutefois, l'interprétation du paramètre m (ou λ dans les modèles ne distinguant pas l'effet spécifique de la croissance) n'est pas évidente et reste controversée. Tieszen *et al.* ont fait l'hypothèse que les différences de vitesse d'incorporation isotopique entre les tissus étaient liées à l'activité métabolique des tissus, définie comme la consommation énergétique du tissu (Tieszen *et al.* 1983). Selon cette hypothèse, les tissus ou individus ayant une activité métabolique plus intense présenteraient des vitesses d'incorporation isotopique plus élevées que les tissus ou individus ayant une faible activité métabolique, ce qui expliquerait par exemple que le foie incorpore plus rapidement la composition isotopique du régime que le muscle (Tieszen *et al.* 1983; Miller *et al.* 2008). Si cette interprétation est appuyée par la mise en évidence dans deux études d'une corrélation négative entre la consommation en oxygène et le temps de $\frac{1}{2}$ vie de l'isotope lourd dans plusieurs tissus (Tieszen *et al.* 1983) ou individus (MacAvoy *et al.* 2006), elle est cependant de plus en plus contestée, d'autres données expérimentales ne semblant pas la valider. Il a par exemple été montré que l'augmentation de l'activité métabolique chez des oiseaux exposés à des températures basses n'affectait pas l'incorporation isotopique de l'azote dans les cellules sanguines (Carleton & Martinez del Rio 2005). L'interprétation plus généralement admise, basée sur le fait que les P sont les constituants principaux des tissus corporels, est que la vitesse d'incorporation isotopique dans les tissus dépend plus spécifiquement de la vitesse de renouvellement protéique de chaque tissu, c'est-à-dire des taux de synthèse et de dégradation protéiques tissulaires (Carleton & Martinez del Rio 2005; Wolf *et al.* 2009; Martinez del Rio *et al.* 2009) et non de l'activité métabolique globale du tissu. La mise en évidence de vitesses d'incorporation isotopique plus importantes dans les tissus splanchniques (foie et intestin), qui ont des taux de renouvellement protéiques élevés, que dans les tissus périphériques (muscle, poils) (MacAvoy *et al.* 2005; MacNeil *et al.*

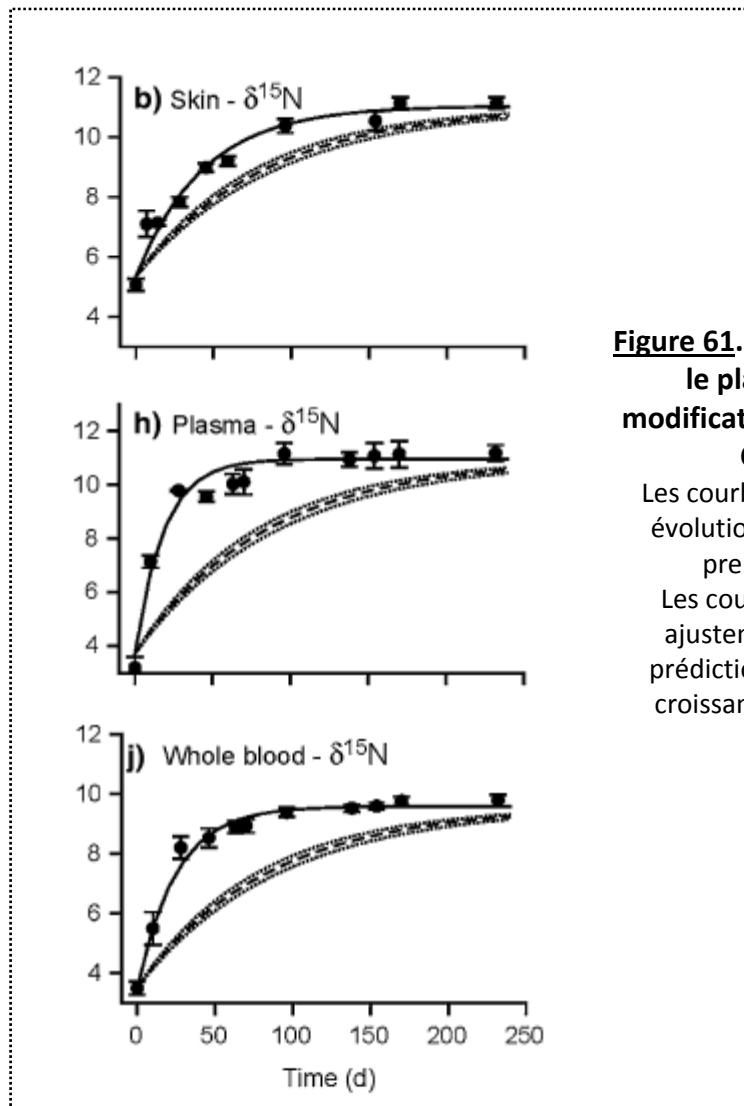


Figure 61. Evolutions des $\delta^{15}\text{N}$ dans la peau (b), le plasma (h) et le sang (j) après une modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime chez la tortue Caouanne (*Caretta caretta*).

Les courbes en trait pointillé correspondent aux évolutions de $\delta^{15}\text{N}$ prédites par un modèle ne prenant en compte que la croissance.

Les courbes en trait plein correspondent aux ajustements par régression non-linéaire des prédictions d'un modèle prenant en compte la croissance et le renouvellement tissulaire aux données expérimentales.

D'après Reich et al. (2008).

2006; Arneson *et al.* 2006; Miller *et al.* 2008) confirme cette hypothèse. Le fait que les tissus avec un taux de renouvellement protéique élevé aient souvent, également, une forte activité métabolique, peut expliquer la relation supposée précédemment entre la vitesse d'incorporation isotopique et l'activité métabolique. Cependant, le renouvellement protéique n'étant pas le seul facteur déterminant l'activité métabolique d'un tissu, cette relation ne semble être qu'indirecte.

Si la plupart des modèles utilisés pour l'étude des vitesses d'incorporation isotopique utilisent comme variable indépendante le temps, des modèles, basés sur l'utilisation des variations de la masse corporelle comme variable indépendante, ont également été développés (Fry & Arnold 1982; Carleton & Del Rio 2010). Ces modèles, qui décrivent les évolutions des $\delta^{15}\text{N}$, non pas en fonction du temps, mais en fonction des variations de la masse corporelle, sont davantage employés chez des animaux ayant des taux de croissance élevés (Bosley *et al.* 2002; Frazer *et al.* 1997; Herzka & Holt 2000).

Malgré le lien évident entre la vitesse d'incorporation isotopique dans un tissu et son taux de renouvellement protéique, les cinétiques isotopiques tissulaires après un changement de l'enrichissement isotopique du régime n'ont jusqu'à présent pas été exploitées par les physiologistes pour étudier les taux de SP. Les valeurs de renouvellement isotopique estimées dans les études de «diet-shift» ne peuvent pas être directement extrapolées à des valeurs de taux de SP, principalement en raison du fait que les valeurs de renouvellement isotopique sont mesurées sur des tissus entiers et non spécifiquement sur la fraction protéique ; ces valeurs ne reflètent donc pas uniquement les taux de synthèse et dégradation protéiques mais également la vitesse à laquelle les tissus sont alimentés en AA alimentaires. La connaissance et l'analyse de ces cinétiques isotopiques présentent malgré tout un intérêt indéniable d'un point de vue physiologique et nutritionnel, puisqu'elles rendent compte de l'aspect dynamique du métabolisme azoté et de sa variabilité tissulaire. Les différences de vitesse d'incorporation isotopique entre les tissus renseignent également sur le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre isotopique dans les différents tissus. Par exemple les données de «diet-shift» obtenues chez des rongeurs indiquent qu'environ 30 jours sont nécessaires pour atteindre l'équilibre isotopique dans le foie et plus de 100 jours dans le muscle. Il est par conséquent indispensable de tenir compte de cet aspect dynamique des abondances isotopiques naturelles pour interpréter des différences entre tissus et individus.

En conclusion, les données d'abondances isotopiques naturelles disponibles dans la littérature et présentées dans cette partie, bien que provenant majoritairement d'études en écologie et très peu d'études en nutrition ou physiologie, soulignent les liens étroits existant entre le métabolisme azoté et les $\delta^{15}\text{N}$ naturels des différents pools azotés et le caractère prometteur de ces $\delta^{15}\text{N}$ pour constituer des marqueurs de modulations métaboliques. Cependant, l'interprétation des variations d'abondances isotopiques naturelles est rendue difficile par la complexité et l'intrication des voies métaboliques impliquées. Des modèles mathématiques ont été développés dans le but de mieux comprendre l'origine des fractionnements isotopiques et d'avoir une vision globale de la mise en place des modulations des

$\delta^{15}\text{N}$, mais faute de données expérimentales suffisamment nombreuses et précises, ces modèles ne fournissent qu'une approche qualitative du système.

C. CONCLUSIONS ET JUSTIFICATION DES TRAVAUX PERSONNELS

Le métabolisme des P et AA dans l'organisme est un système fortement compartimenté, qui met en jeu un ensemble complexe de métabolites et de flux azotés. Les flux intra-tissulaires de synthèse et dégradation protéiques permettent le renouvellement continu et le maintien de la masse protéique, et divers flux inter-tissulaires assurent des échanges continus d'AA et autres composés azotés entre les différentes zones de ce système fortement régionalisé. Nous avons vu, dans la première partie de l'introduction bibliographique, que ces flux étaient coordonnés et finement régulés à l'échelle de l'organisme afin de répondre à la discontinuité des apports alimentaires et de maintenir l'homéostasie azotée à court terme. À plus long terme, des modulations de l'amplitude, de l'orientation et de la distribution de ces flux, en réponse à des variations des conditions nutritionnelles (par ex. qualité et quantité de l'apport en P alimentaires) sont déterminantes pour l'adaptation de l'organisme à ces conditions et le maintien de l'intégrité des tissus. A l'inverse, une dérégulation des flux dans des conditions nutritionnelles plus drastiques (par ex. restriction protéique sévère) ou physiopathologiques (par ex. IR, syndrome métabolique, diabète) peut conduire à une perte de masse protéique. Cependant, on connaît encore très mal la dynamique globale des flux azotés inter- et intra-organes, ainsi que la façon dont l'ensemble de ces flux est modulé en fonction de l'apport en P alimentaires ou dans des situations telles que l'IR, principalement en raison de limites méthodologiques. En effet, bien que des méthodes nombreuses et variées, reposant essentiellement sur l'utilisation de traceurs isotopiques, aient été développées pour l'étude du métabolisme azoté et la quantification des différents phénomènes ou flux, celles-ci présentent différentes limites méthodologiques et ne fournissent que des données parcellaires ou concernant des sous-systèmes isolés. Une technique particulière est souvent dédiée à l'étude d'un processus métabolique spécifique ou à l'estimation d'un type de flux particulier : par exemple, les cinétiques protéiques sont étudiées par la perfusion d'AA marqués, les cinétiques de l'urée par l'administration d'urée marquée, les flux d'absorption par l'ingestion de P marquées ... Par conséquent, l'ensemble de ces données ne permet pas d'avoir une vision et une compréhension systémiques à la fois de l'organisation des flux azotés inter- et intra-organes, des interactions entre les tissus et composés métaboliques et des redistributions ou réorientations des différents flux métaboliques qui ont vraisemblablement un rôle important dans l'adaptation à des variations des conditions nutritionnelles ou physiopathologiques. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouveaux outils plus intégratifs pour permettre de reconstituer l'organisation des flux azotés inter- et intra-organes.

En parallèle, nous avons vu, dans la deuxième partie de l'introduction bibliographique, que les abondances isotopiques naturelles $\delta^{15}\text{N}$ des différents pools azotés peuvent constituer des marqueurs du métabolisme azoté et de ses modulations. En effet, les différentes données de la littérature, qui ont été essentiellement obtenues en écologie et plus rarement et récemment en nutrition, montrent que les $\delta^{15}\text{N}$ varient de manière intra-individuelle (entre les pools métaboliques au sein d'un individu) et inter-individuelle (entre les individus au sein d'une population) et suggèrent que ces variations sont étroitement liées à des modulations du métabolisme azoté, et plus particulièrement, dans les cas

rapportés, à des variations du bilan azoté, en raison de l'existence d'effets isotopiques associés à certaines voies métaboliques. Ainsi, les $\delta^{15}\text{N}$ corporels, en tant que paramètres intrinsèques des différents composés azotés corporels (AA, P, urée) sont façonnés par les différents processus métaboliques (synthèses et dégradations protéiques, transaminations, désaminations ...) et leurs variations sont la résultante intégrée de modulations des flux métaboliques. Ils témoignent des différentes caractéristiques du métabolisme azoté : de son aspect compartimenté par leur forte variabilité intra-individuelle, de son aspect dynamique par leurs variations temporelles, et de sa modulation selon les conditions nutritionnelles et les situations physio-pathologiques spécifiques par leurs différences inter-individuelles et leurs modulations dans ces conditions. Cependant, en raison de la complexité et de l'intrication des voies métaboliques dont elles résultent, les variations des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ sont difficiles à interpréter directement.

Ce travail de thèse est basé sur deux hypothèses complémentaires. La première hypothèse est que les différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre les différents pools et tissus de l'organisme résultent des modulations régionales des flux azotés et que les variations inter-individuelles des $\delta^{15}\text{N}$ traduisent des modulations de ces flux en fonction des conditions nutritionnelles et/ou physio-pathologiques. La seconde hypothèse est que l'information contenue dans les données de $\delta^{15}\text{N}$ des différents pools azotés de l'organisme peut être extraite et analysée par modélisation compartimentale, afin de mieux comprendre les phénomènes créant la discrimination isotopique et sa variabilité, et de reconstituer les flux azotés inter- et intra-organes qui ont donné naissance à ces valeurs de $\delta^{15}\text{N}$. La première hypothèse est liée au fait que les différentes voies anaboliques et cataboliques peuvent avoir des affinités différentes pour les deux isotopes stables de l'azote (par exemple, les réactions de désamination et de transamination utilisent préférentiellement les molécules portant l'isotope léger plutôt que lourd), ce qui engendre un fractionnement isotopique, c.-à-d. une différence de $\delta^{15}\text{N}$, entre pools précurseurs et produits dont l'ampleur est susceptible de varier en fonction de l'activité relative de ces voies métaboliques, selon la structure des échanges. Cette hypothèse a été préalablement testée à travers un travail théorique qui a consisté à formaliser mathématiquement, par des modèles à 2 ou 3 compartiments, des sous-systèmes représentatifs des différents types de transfert impliqués dans le métabolisme azoté, afin d'étudier si et comment les $\delta^{15}\text{N}$ des compartiments représentés étaient modifiés lors de modulations des flux de transfert considérés. Les résultats de ce travail (présentés dans la fiche technique n°1), ainsi que de quelques autres travaux théoriques rapportés dans la littérature, (Schoeller 1999; Hayes 2001) montrent, qu'au niveau d'embranchements métaboliques avec deux voies concurrentes, le $\delta^{15}\text{N}$ du précurseur dépend de l'importance relative des flux dans chacune de ses voies d'utilisation. En ce qui concerne notre seconde hypothèse, les quelques modèles corps-entier qui ont déjà été développés ont permis de tester certaines pistes théoriques d'explication concernant l'origine du fractionnement isotopique et les variations de $\delta^{15}\text{N}$ lors de variations quantitatives de l'apport azoté (Balter *et al.* 2006; Ponsard & Averbuch 1999; Martinez del Rio & Wolf 2005). Cependant ces modèles consistent en des représentations structurelles très simplifiées du métabolisme azoté, qui ne considèrent par exemple généralement qu'un seul pool protéique, et qui par conséquent ne permettent pas d'identifier les

différents processus à l'origine du fractionnement ni d'interpréter les modulations inter-organes des $\delta^{15}\text{N}$ en relation avec des modulations des flux métaboliques azotés. Ainsi, malgré les apports de ces modèles, les mécanismes par lesquels les signatures isotopiques s'établissent, c.-à-d. pourquoi et comment les tissus s'enrichissent différemment en ^{15}N , et la façon dont ces signatures sont modulées en relation avec des perturbations du métabolisme azoté, sont toujours largement méconnus. Le développement de modèles mathématiques plus complexes, prenant notamment en compte la compartimentation intra- et inter- tissulaire du métabolisme azoté, apparaît indispensable pour extraire et interpréter l'information sous-jacente relative aux flux azotés contenue dans ces données d'abondances isotopiques naturelles. La construction de tels modèles nécessite, en parallèle, l'acquisition de données de $\delta^{15}\text{N}$ plus détaillées, dans un plus grand nombre de pools métaboliques et dans des conditions nutritionnelles et physiologiques mieux contrôlées et caractérisées.

Dans cette optique, cette thèse a ainsi consisté à coupler expérimentation et modélisation afin de (1) mettre en évidence l'intérêt des $\delta^{15}\text{N}$ comme bio-marqueurs de modifications métaboliques associées à des changements de conditions nutritionnelles ou au développement de situations pré-pathologiques induites par l'alimentation ; (2) mieux comprendre l'origine et les modulations des $\delta^{15}\text{N}$ des différents pools azotés en lien avec le fonctionnement intégré du métabolisme azoté ; (3) utiliser les valeurs et variations des $\delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement pour estimer certains flux azotés et identifier comment ils sont modulés dans différentes conditions nutritionnelles et physiopathologiques. Le travail expérimental réalisé dans les ÉTUDES 1 et 2 nous a permis de répondre au premier objectif : il a consisté à étudier l'impact d'une modification de la qualité des P alimentaires (lait vs soja, ÉTUDE 1) et de l'installation précoce d'un syndrome métabolique associant IR et obésité (ÉTUDE 2) sur les $\delta^{15}\text{N}$ des fractions AA et P de nombreux tissus (foie, rein, muscle, peau ...) et des pools d'excrétion (urée, ammoniac, contenus intestinaux) chez le rat. Par rapport aux études rapportées dans la littérature qui ont montré des modulations des $\delta^{15}\text{N}$ dans des situations où le métabolisme et le bilan azoté sont fortement altérés (par ex. jeûne ou restriction sévère), nous avons cherché à l'inverse, dans ces 2 études, à déterminer si, et dans quelle mesure, les $\delta^{15}\text{N}$ étaient affectés par des conditions qui n'induisent pas une altération du bilan azoté global mais des modulations modérées des flux azotés (dans le cas d'une variation légère de la qualité P) voire subtiles et encore mal connues (dans le cas de l'instauration précoce d'un syndrome métabolique).

En parallèle, nous avons mené, dans les ÉTUDES 3 et 4, une approche mécanistique de modélisation compartimentale de nos données afin de répondre à nos 2^{ème} et 3^{ème} objectifs. Dans l'ÉTUDE 3, nous nous sommes focalisés sur le métabolisme azoté à l'échelle tissulaire et sur son aspect dynamique, en proposant d'utiliser les cinétiques d'incorporation isotopique dans les différents tissus, pour estimer des taux de renouvellement protéique tissulaires et en déduire des informations sur la structure et le fonctionnement des échanges entre AA et P dans chaque tissu. Pour ce faire, nous avons mesuré les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les fractions AA et P de différents tissus chez des rats après modification du $\delta^{15}\text{N}$ de leur régime, sur le principe des expérimentations de type « diet-shift » présentées dans la seconde partie de l'introduction bibliographique. Contrairement à ces expérimentations qui utilisent

classiquement des sources protéiques différentes ayant des $\delta^{15}\text{N}$ distincts, nous avons modifié artificiellement le $\delta^{15}\text{N}$ du régime en ajoutant une très petite quantité de la même P mais enrichie en ^{15}N , afin de ne pas introduire de facteurs de variation supplémentaires (comme une modulation de la nature et qualité de la source P qui affecte les flux azotés). Les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées dans cette étude restent malgré tout à des niveaux quasiment naturels d'enrichissements. Pour chaque tissu, les cinétiques d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$, ainsi mesurées dans les fractions AA et P ont été analysées par des modèles compartimentaux simples du renouvellement protéique.

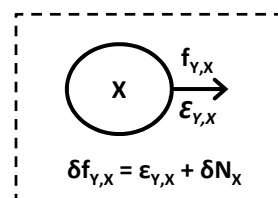
Enfin, dans l'ÉTUDE 4, nous avons développé un modèle multi-compartimental, cette fois à l'échelle multi-tissulaire et à l'état stationnaire, reproduisant l'ensemble des flux azotés inter- et intra-organes de l'organisme et permettant de rendre compte des phénomènes de fractionnement isotopique. Les modèles multi-compartimentaux dynamiques et mécanistes sont particulièrement bien adaptés à la représentation du métabolisme azoté, du fait du caractère dynamique marqué des processus métaboliques et de la forte compartimentation de l'organisme (organisation en pools métaboliques distincts). Ce type de représentation offre une vision systémique de l'ensemble des flux mis en jeu dans le fonctionnement et les modulations du métabolisme azoté, ainsi qu'une vision intégrée de l'ensemble des phénomènes de fractionnements isotopiques qui concourent conjointement à l'établissement des $\delta^{15}\text{N}$ observés dans les pools azotés. Dans un premier temps, le modèle a été développé et paramétré à partir de données de flux d'azote issues soit de la littérature soit des résultats d'estimation de l'étude 3 et de données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$ obtenues en conditions normales dans l'étude 2. Le modèle ainsi calibré a permis de reconstituer les mécanismes qui conduisent à l'observation de différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre pools azotés, en localisant les principaux effets isotopiques, et ainsi de mieux comprendre quels facteurs et perturbations sont les plus susceptibles d'affecter les $\delta^{15}\text{N}$, avec quelle amplitude et dans quel sens. Dans un deuxième temps, les simulations du modèle ont été confrontées aux variations de $\delta^{15}\text{N}$ mises en évidence expérimentalement dans les études 1 et 2 afin d'identifier ou de formuler des hypothèses quant aux flux azotés potentiellement affectés lors d'une modification de la source P ou de l'initiation précoce d'un syndrome métabolique.

RELATIONS ENTRE FLUX AZOTÉS ET ABONDANCES ISOTOPIQUES NATURELLES DE L'AZOTE ($\delta^{15}\text{N}$) DANS LES SYSTÈMES MÉTABOLIQUES

L'abondance naturelle relative des différents isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) varie de manière inter-individuelle (entre les individus au sein d'une population) mais également intra-individuelle (entre les pools métaboliques au sein d'un individu). Les différences d'enrichissement isotopique observées entre 2 composés azotés issus de voies métaboliques concurrentes (par exemple des composés produits dans des tissus différents) ou entre le substrat et le produit d'une transformation métabolique (par exemple, les AA et les protéines) proviennent de l'existence d'effets isotopiques associés à certains processus métaboliques. L'amplitude des variations de $\delta^{15}\text{N}$ observées dans un état nutritionnel et physiologique donné dépend de la structure du système métabolique et de l'activité relative de chacune des voies métaboliques (voies anabolique vs. catabolique par exemple) et des vitesses d'échange le long de ces voies métaboliques. Les $\delta^{15}\text{N}$ mesurables dans les différents pools du métabolisme azoté contiennent donc une information quantitative sur les flux azotés impliqués, et la variation de ces $\delta^{15}\text{N}$ en réponse à des modifications des conditions nutritionnelles ou physiologiques reflètent des modulations du métabolisme et de l'importance relative de ces flux. L'accès à cette information n'est cependant pas direct mais nécessite une analyse du fonctionnement du système par une approche de modélisation compartimentale.

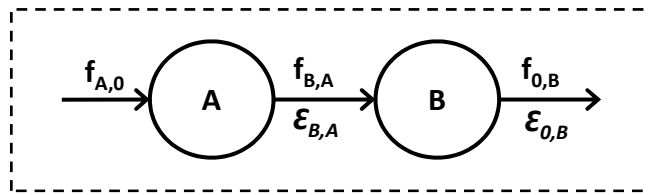
Notations générales utilisées :

- \mathbf{N}_x : Quantité totale d'azote dans le compartiment X (*mmol N*),
- $\mathbf{\delta N}_x$: Enrichissement isotopique du compartiment X (‰),
- $\mathbf{f}_{y,x}$: flux instantané d'azote du compartiment X vers le compartiment Y (*mmol N.j⁻¹*),
- $\mathbf{\delta f}_{y,x}$: Enrichissement isotopique du flux instantané $f_{y,x}$ (‰),
- $\mathbf{\epsilon}_{y,x}$: Facteur de fractionnement isotopique associé au flux $f_{y,x}$
et défini tel que $\mathbf{\epsilon}_{y,x} = \mathbf{\delta f}_{y,x} - \mathbf{\delta N}_x$.



Pour les 3 systèmes décrits par la suite, les équations d'évolution de N et δN ont été obtenues en appliquant, pour chaque compartiment, le principe de conservation de la masse à l'azote total (N) et à l'isotope lourd de l'azote (^{15}N), respectivement. Selon ce principe, la variation de N ou ^{15}N dans un compartiment pendant un court intervalle de temps (dt) est égale à la différence entre la somme des flux alimentant ce compartiment et la somme des flux sortant de ce compartiment. Les équations ainsi obtenues ont ensuite été simplifiées sous l'hypothèse d'état stationnaire pour les tailles des compartiments (i.e. les quantités d'azote dans les compartiments sont constantes) et d'équilibre isotopique (i.e. les $\delta^{15}\text{N}$ des compartiments sont constants).

1. système organisé selon une structure caténaire



Les évolutions des tailles et des enrichissements isotopiques des compartiments A et B sont décrites par les équations :

$$\frac{dN_A(t)}{dt} = f_{A,0}(t) - f_{B,A}(t) \quad \frac{dN_B(t)}{dt} = f_{B,A}(t) - f_{0,B}(t)$$

$$\frac{d\delta N_A(t)}{dt} = \frac{f_{A,0}(t)}{N_A(t)} \cdot [\delta f_{A,0}(t) - \delta N_A(t)] - \frac{f_{B,A}(t)}{N_A(t)} \cdot \epsilon_{B,A}$$

$$\frac{d\delta N_B(t)}{dt} = \frac{f_{B,A}(t)}{N_B(t)} \cdot [\delta N_A(t) - \delta N_B(t) - \epsilon_{B,A}] - \frac{f_{0,B}(t)}{N_B(t)} \cdot \epsilon_{0,B}$$

À l'état stationnaire élémentaire et isotopique, les équations se simplifient de la manière suivante :

$$f_{A,0} = f_{B,A} = f_{0,B}$$

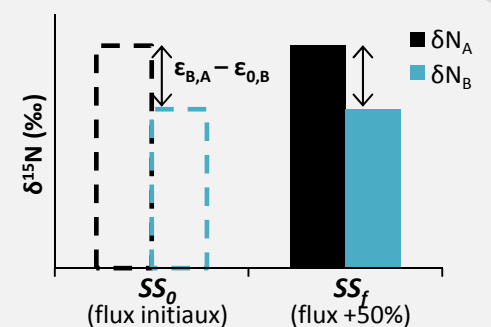
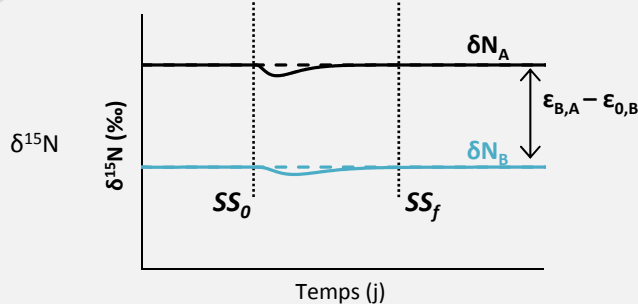
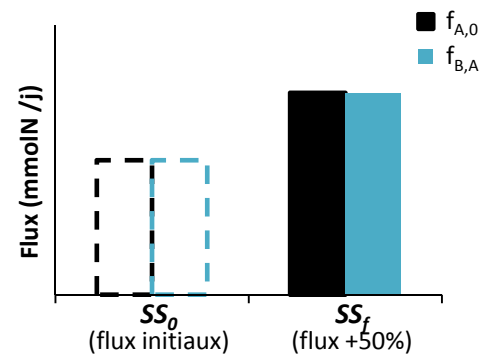
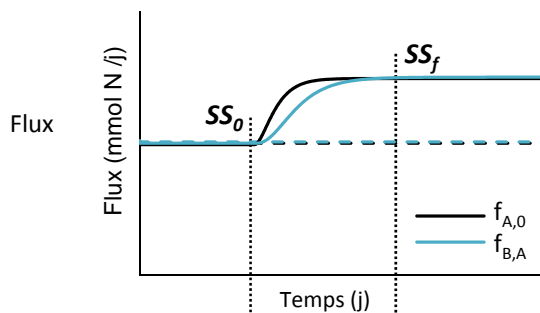
$$\delta N_A = \delta f_{A,0} - \epsilon_{B,A}$$

$$\delta N_B = \delta N_A + \epsilon_{B,A} - \epsilon_{0,B}$$

Evolution des flux et $\delta^{15}N$ entre deux états stationnaires élémentaires et isotopiques SS_0 et SS_f :

$\delta^{15}N$ aux états stationnaires élémentaires et isotopiques SS_0 et SS_f

Exemple pour $\epsilon_{B,A} < 0$ et $f_{A,0}$ et $f_{B,A}$ augmentés de 50% entre SS_0 et SS_f

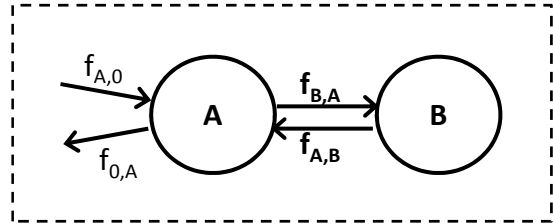


⇒ Dans un système présentant une structure caténaire, l'évolution des enrichissements isotopiques à l'état non-stationnaire dépend des flux de transfert entre les compartiments.

Au contraire, à l'état stationnaire et à l'équilibre isotopique, les valeurs des enrichissements isotopiques atteintes dans les compartiments sont indépendantes de l'importance des flux et dépendent uniquement de l'amplitude des effets isotopiques associés aux voies de transfert.

2. système de type précurseur-produit avec échange réversible

Ce type de structure correspond par exemple à la représentation des processus tissulaires de synthèse et dégradation protéiques, avec A représentant les AA libres et B les protéines du tissu.



Les évolutions des tailles et des enrichissements isotopiques des compartiments A et B sont décrites par les équations :

$$\frac{dN_A(t)}{dt} = f_{A,0}(t) - f_{0,A}(t) + f_{A,B}(t) - f_{B,A}(t)$$

$$\frac{dN_B(t)}{dt} = f_{B,A}(t) - f_{A,B}(t)$$

$$\frac{d\delta N_A(t)}{dt} = \frac{f_{A,0}(t)}{N_A(t)} \times (\delta f_{A,0}(t) - \delta N_A(t)) - \frac{f_{0,A}(t)}{N_A(t)} \times \varepsilon_{0,A} - \frac{f_{B,A}(t)}{N_A(t)} \times \varepsilon_{B,A} + \frac{f_{A,B}(t)}{N_A(t)} \times (\delta N_B(t) - \delta N_A(t) + \varepsilon_{A,B})$$

$$\frac{d\delta N_B(t)}{dt} = \frac{f_{B,A}(t)}{N_B(t)} \cdot [\delta N_A(t) - \delta N_B(t) - \varepsilon_{B,A}] - \frac{f_{A,B}(t)}{N_B(t)} \cdot \varepsilon_{A,B}$$

À l'état stationnaire élémentaire et isotopique, les équations se simplifient de la manière suivante :

$$f_{A,0}(t) = f_{0,A}(t)$$

$$f_{B,A}(t) = f_{A,B}(t)$$

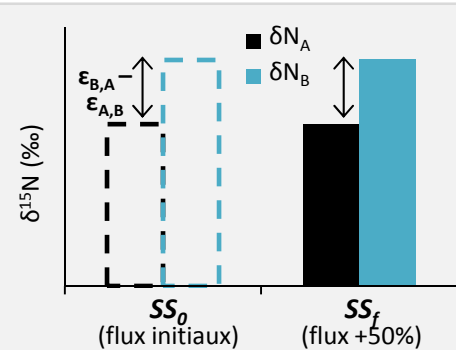
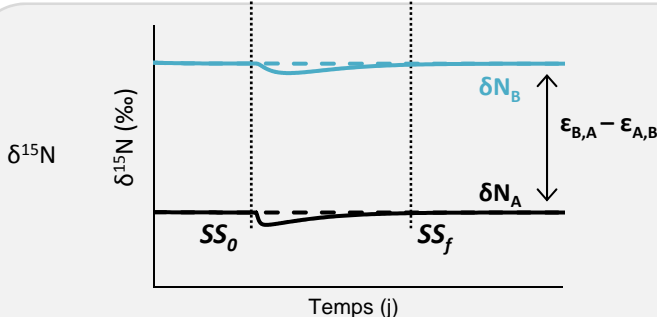
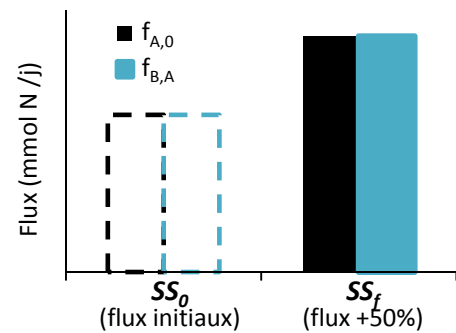
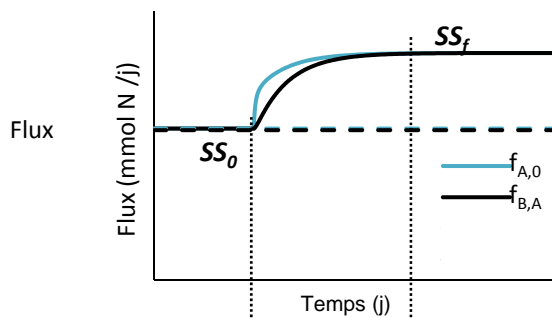
$$\delta N_A = \delta f_{A,0} - \varepsilon_{0,A}$$

$$\delta N_B = \delta N_A + \varepsilon_{B,A} - \varepsilon_{A,B}$$

Evolution des flux et $\delta^{15}N$ entre deux états stationnaires élémentaires et isotopiques SS_0 et SS_f :

Exemple pour $\varepsilon_{B,A} > 0$ et $\varepsilon_{A,B} = 0$ et $f_{A,B}$ et $f_{B,A}$ augmentés de 50% entre SS_0 et SS_f

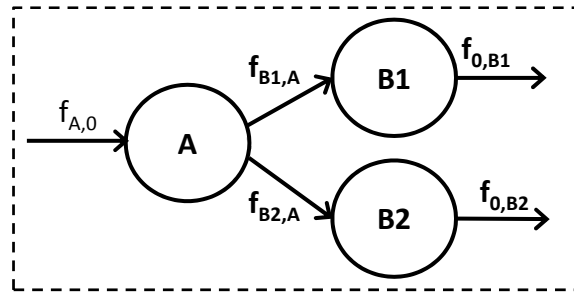
$\delta^{15}N$ aux états stationnaires élémentaires et isotopiques SS_0 et SS_f



⇒ Dans un système présentant une structure de type précurseur-produit, à l'état stationnaire et à l'équilibre isotopique, la différence entre les enrichissements isotopiques des compartiments A et B est indépendante de la valeur des flux entre A et B mais est égale à la différence entre les effets isotopiques associés aux deux voies d'échange. Les enrichissements isotopiques des compartiments A et B évoluent lorsque les flux d'échange ne sont plus constants et différent l'un de l'autre ($f_{B,A} \neq f_{A,B}$).

3. système présentant un embranchement métabolique

Ce type de structure correspond par exemple à la représentation des processus concurrents de synthèse d'urée (B1) et de protéines (B2) à partir des acides aminés (A), par exemple au niveau du foie.



Les évolutions des tailles et des enrichissements isotopiques des compartiments A et B sont décrites par les équations :

$$\frac{dN_A}{dt} = f_{A,0} - f_{B1,A} - f_{B2,A}$$

$$\frac{dN_{B1}}{dt} = f_{0,B1} - f_{B1,A} \quad \frac{dN_{B2}}{dt} = f_{0,B2} - f_{B2,A}$$

$$\frac{d\delta N_A(t)}{dt} = \frac{f_{A,0}(t)}{N_A(t)} \cdot (\delta f_{A,0}(t) - \delta N_A(t)) - \frac{f_{B1,A}(t)}{N_A(t)} \cdot \epsilon_{B1,A} - \frac{f_{B2,A}(t)}{N_A(t)} \cdot \epsilon_{B2,A}$$

$$\frac{d\delta N_{B1}(t)}{dt} = \frac{f_{B1,A}(t)}{N_{B1}(t)} \cdot (\delta N_A(t) - \delta N_{B1}(t) - \epsilon_{B1,A}) - \frac{f_{0,B1}(t)}{N_{B1}(t)} \cdot \epsilon_{0,B1}$$

$$\frac{d\delta N_{B2}(t)}{dt} = \frac{f_{B2,A}(t)}{N_{B2}(t)} \cdot (\delta N_A(t) - \delta N_{B2}(t) - \epsilon_{B2,A}) - \frac{f_{0,B2}(t)}{N_{B2}(t)} \cdot \epsilon_{0,B2}$$

À l'état stationnaire élémentaire et isotopique, les équations se simplifient de la manière suivante :

$$f_{A,0} = f_{B1,A} + f_{B2,A}$$

$$f_{0,B1} = f_{B1,A} \quad f_{0,B2} = f_{B2,A}$$

$$\delta N_A = \delta f_{A,0} - \frac{f_{B1,A}}{f_{B1,A} + f_{B2,A}} \cdot \epsilon_{B1,A} - \frac{f_{B2,A}}{f_{B1,A} + f_{B2,A}} \cdot \epsilon_{B2,A}$$

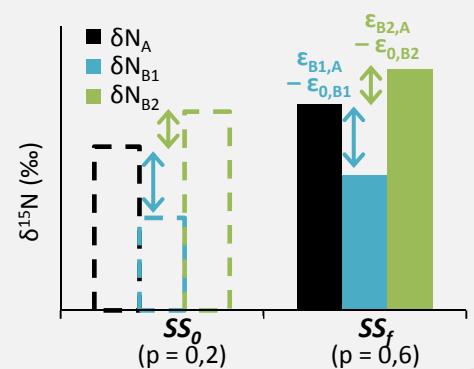
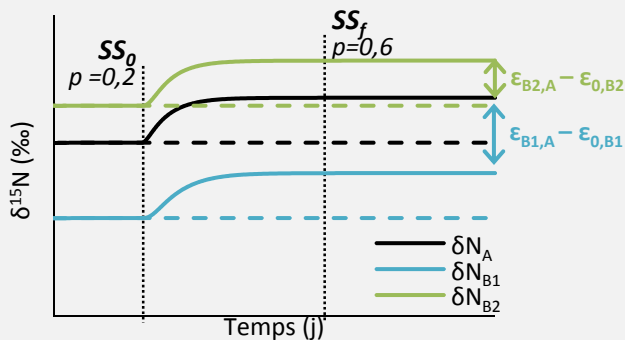
$$\delta N_{B1} = \delta N_A + \epsilon_{B1,A} - \epsilon_{0,B1}$$

$$\delta N_{B2} = \delta N_A + \epsilon_{B2,A} - \epsilon_{0,B2}$$

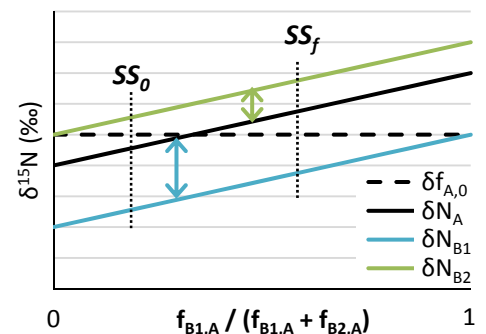
Evolution des flux et $\delta^{15}N$ entre deux états stationnaires élémentaires et isotopiques SS_0 et SS_f :

Exemple pour $\epsilon_{B1,A} = -2$; $\epsilon_{B2,A} = +1$; $\epsilon_{0,B1} = \epsilon_{0,B2} = 0$, avec $p = 0,2$ dans SS_0 et $p = 0,6$ dans SS_f ($p = f_{B1,A} / (f_{B1,A} + f_{B2,A})$)

$\delta^{15}N$ aux états stationnaires élémentaires et isotopiques SS_0 et SS_f



⇒ Dans un système présentant une structure constituée d'un embranchement avec 2 voies métaboliques, à l'état stationnaire et à l'équilibre isotopique, l'enrichissement isotopique dans le compartiment précurseur (A) dépend de l'importance relative des flux dans chacune des voies et de l'effet isotopique associé à chaque voie. À l'inverse, la différence entre l'enrichissement isotopique dans chaque compartiment produit B1 et B2 et l'enrichissement isotopique dans le pool précurseur A est indépendant de la valeur des flux.



Les enrichissements isotopiques dans les compartiments A, B1 et B2 ont été calculés en considérant $\{ \epsilon_{B1,A} = -2$; $\epsilon_{B2,A} = +1$; $\epsilon_{0,B1} = \epsilon_{0,B2} = 0$; $\delta f_{A,0} = 5$ $\}$. Une augmentation de la proportion relative d'azote transitant par la voie dont l'effet isotopique est le plus en faveur de l'isotope léger ($f_{B1,A}$) induit une augmentation de l'enrichissement dans le compartiment A, et par conséquent dans les compartiments B1 et B2.

CHAPITRE 2 : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE 2 : TRAVAUX PERSONNELS

A. ÉTUDE 1 (ARTICLE N°1) :

VARIATIONS DES ABONDANCES ISOTOPIQUES NATURELLES EN AZOTE ($\delta^{15}\text{N}$) DANS DIFFÉRENTS TISSUS CHEZ LE RAT EN RÉPONSE À UNE MODULATION NUTRITIONNELLE : EFFET DE LA QUALITÉ DES PROTÉINES ALIMENTAIRES.

Cette étude a donné lieu à la publication d'un article¹ (**Article n°1**, présenté dans ce manuscrit) et a fait l'objet d'une communication orale en congrès² et d'un poster³.

¹Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D & Fouillet H. **The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet ^{15}N discrimination factors in laboratory rats.** PLoS ONE. 2011 ; 6(11):e28046. Epub 22 Nov 2011.

²Poupin N., H. Fouillet, F. Mariotti, D. Tome, J.-F. Huneau et C. Bos. La qualité des protéines alimentaires influence les compositions isotopiques naturelles en azote des tissus chez le rat. 4^{ème} congrès de la Société Française de Nutrition (SFN), 10-12 décembre 2009, Montpellier, France.

³Poupin N., H. Fouillet, F. Mariotti, D. Tome, J.-F. Huneau and C. Bos. Dietary protein quality influences the pattern of natural isotopic composition of nitrogen in rats. *Experimental Biology (EB)*, 24-28 avril 2010, Anaheim, CA, USA. FASEB J. 24: 740.6.

Contexte et objectifs :

Il est désormais bien connu qu'en raison de l'existence d'effets isotopiques sur certaines voies métaboliques, l'organisme et ses tissus ont des enrichissements isotopiques naturels en azote ($\delta^{15}\text{N}$) supérieurs à celui du régime, et que la discrimination isotopique d'un tissu ($\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{tissu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{régime}}$) peut varier selon différents paramètres quantitatifs et qualitatifs de l'apport alimentaire en P, probablement en raison des variations métaboliques induites par ces variations d'apport. Ces connaissances émanent cependant d'études en écologie où les données sont limitées à certains tissus et où les conditions nutritionnelles sont souvent non contrôlées, avec des régimes qui diffèrent à la fois par leur teneur et par leur source en P. De ce fait, les effets spécifiques de la qualité protéique sur les $\Delta^{15}\text{N}$ des différents tissus sont encore largement méconnus. Dans cette étude, nous avons étudié spécifiquement l'impact d'une modulation de la qualité protéique sur les $\Delta^{15}\text{N}$ de plusieurs fractions azotées dans différents tissus, en comparant l'effet de deux sources protéiques de qualité légèrement différente, les P de lait et les P de soja.

Méthodes :

Deux groupes de rats Wistar mâles (n=9 rats par groupe) ont reçu pendant 3 semaines un régime expérimental contenant 20% de protéines de lait (groupe MP) ou de soja (groupe SP). À l'issue de ces trois semaines, les animaux ont été sacrifiés, après une nuit de jeûne, afin de prélever plusieurs tissus (foie, muqueuse intestinale, estomac, colon, rein) et un échantillon de sang portal. Les teneurs en azote

et les $\delta^{15}\text{N}$ ont été mesurés par EA-IRMS dans les deux régimes, dans les fractions protéiques (P) et non-protéiques (AA) des différents tissus et du plasma, ainsi que dans l'urée plasmatique, de manière à calculer les $\Delta^{15}\text{N}$ dans ces différents pools pour chaque régime.

Résultats & discussion :

Nos résultats montrent que les $\Delta^{15}\text{N}$ des fractions P sont toujours supérieurs aux $\Delta^{15}\text{N}$ des fractions AA et au $\Delta^{15}\text{N}$ de l'urée plasmatique. De plus, les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ des fractions P varient selon les tissus, avec des valeurs s'échelonnant de 1,35‰ dans les P du côlon à 3,81‰ dans les P plasmatiques chez les rats du groupe MP, et de 2,24‰ dans les P de la muqueuse intestinale à 4,61‰ dans les P plasmatiques chez les rats du groupe SP, les P plasmatiques présentant les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ les plus élevées dans les 2 groupes. Nous avons également mis en évidence que les $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires étaient significativement plus élevés chez les rats nourris avec des P de soja par rapport à ceux nourris avec des P de lait, pour tous les tissus à l'exception de la muqueuse intestinale, et ce malgré l'absence de différence de composition corporelle entre les rats des deux groupes. De plus, l'amplitude des différences de $\Delta^{15}\text{N}$ entre les 2 groupes diffère selon les tissus : elle est par exemple de 2,2‰ dans les P du colon, de 1,2‰ dans les P constitutives du foie mais de seulement 0,8‰ dans les P plasmatiques. Les variations de $\Delta^{15}\text{N}$ observées entre les tissus et entre les 2 groupes reflètent vraisemblablement des modulations de l'utilisation relative des AA alimentaires et endogènes dans les différentes voies métaboliques. Plus spécifiquement, l'enrichissement plus important en ^{15}N des tissus des rats nourris avec des P de soja pourrait être dû à une utilisation moins directe des AA alimentaires pour les protéosynthèses, et à l'inverse à une augmentation de l'utilisation des AA endogènes issus de processus de recyclage (transaminations, désaminations) qui induisent un fractionnement isotopique.

Conclusions :

Les résultats de ce travail montrent que les $\Delta^{15}\text{N}$ tissulaires augmentent lorsque la qualité des P alimentaires diminue, et signent ainsi les modulations régionales du métabolisme des AA et des P qui sont induites par des modifications qualitatives de la source protéique alimentaire.

ARTICLE n°1

The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet ¹⁵N discrimination factors in laboratory rats.

Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D & Fouillet H.
PLoS ONE. 2011 ; 6(11):e28046.
Epub 22 Nov 2011.

The Nature of the Dietary Protein Impacts the Tissue-to-Diet ^{15}N Discrimination Factors in Laboratory Rats

Nathalie Poupin^{1,2}, Cécile Bos^{1,2}, François Mariotti^{1,2}, Jean-François Huneau^{1,2}, Daniel Tomé^{1,2}, Hélène Fouillet^{1,2*}

1 INRA, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France, **2** AgroParisTech, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France

Abstract

Due to the existence of isotope effects on some metabolic pathways of amino acid and protein metabolism, animal tissues are ^{15}N -enriched relative to their dietary nitrogen sources and this ^{15}N enrichment varies among different tissues and metabolic pools. The magnitude of the tissue-to-diet discrimination ($\Delta^{15}\text{N}$) has also been shown to depend on dietary factors. Since dietary protein sources affect amino acid and protein metabolism, we hypothesized that they would impact this discrimination factor, with selective effects at the tissue level. To test this hypothesis, we investigated in rats the influence of a milk or soy protein-based diet on $\Delta^{15}\text{N}$ in various nitrogen fractions (urea, protein and non-protein fractions) of blood and tissues, focusing on visceral tissues. Regardless of the diet, the different protein fractions of blood and tissues were generally ^{15}N -enriched relative to their non-protein fraction and to the diet ($\Delta^{15}\text{N} > 0$), with large variations in the $\Delta^{15}\text{N}$ between tissue proteins. $\Delta^{15}\text{N}$ values were markedly lower in tissue proteins of rats fed milk proteins compared to those fed soy proteins, in all sampled tissues except in the intestine, and the amplitude of $\Delta^{15}\text{N}$ differences between diets differed between tissues. Both between-tissue and between-diet $\Delta^{15}\text{N}$ differences are probably related to modulations of the relative orientation of dietary and endogenous amino acids in the different metabolic pathways. More specifically, the smaller $\Delta^{15}\text{N}$ values observed in tissue proteins with milk than soy dietary protein may be due to a slightly more direct channeling of dietary amino acids for tissue protein renewal and to a lower recycling of amino acids through fractionating pathways. In conclusion, the present data indicate that natural $\Delta^{15}\text{N}$ of tissue are sensitive markers of the specific subtle regional modifications of the protein and amino acid metabolism induced by the protein dietary source.

Citation: Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D, et al. (2011) The Nature of the Dietary Protein Impacts the Tissue-to-Diet ^{15}N Discrimination Factors in Laboratory Rats. PLoS ONE 6(11): e28046. doi:10.1371/journal.pone.0028046

Editor: Stephane Blanc, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, France

Received: June 8, 2011; **Accepted:** October 31, 2011; **Published:** November 22, 2011

Copyright: © 2011 Poupin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Nathalie Poupin is supported by a doctoral fellowship from the French Ministry for Research. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: One of the authors (Daniel Tomé) is a member of PLoS ONE academic editorial board.

* E-mail: Helene.Fouillet@agroparistech.fr

Introduction

In ecological studies, naturally-occurring stable isotope signatures of animals have been extensively used to track diets and reconstruct trophic relationships within food webs [1–3]. Animals are generally ^{15}N -enriched over their diet, with an average discrimination factor ($\Delta^{15}\text{N}$, the difference in ^{15}N natural abundance between body and diet) of 3.4‰ [4], which varies among tissues and metabolic pools [4–6]. This discrimination originates from the existence of kinetic isotope effects in metabolic pathways involving the bond-breaking or synthesis of nitrogenous compounds, during which the molecules that contain the lighter nitrogen isotope (^{14}N) are preferentially utilized to the detriment of the same molecules containing the heavier isotope (^{15}N). When located at a metabolic branch point, such kinetic isotope effects induce a preferential flow of ^{14}N into the products generated by the reaction with the larger isotope effect, which results in an isotopic fractionation between the metabolic pools produced by the competing reactions, as reflected by a difference in $\Delta^{15}\text{N}$ of these pools [7]. More specifically, deamination and transamination enzymes are likely to preferentially convert amino groups containing ^{14}N [8,9], which is thought to result in the urinary

excretion of ^{15}N -depleted end products and the incorporation of residual ^{15}N -enriched amino acids into the body [10,11] in line with the body-to-diet positive $\Delta^{15}\text{N}$. Interestingly, there is a growing body of evidence that the magnitude of $\Delta^{15}\text{N}$ vary between individuals depending on their specific nutritional, physiological or pathological conditions. For instance, the hair ^{15}N natural abundance values are good markers of animal protein consumption [12] and vary with pregnancy [13], nutritional stress [14], anorexia [15] and cirrhosis [16] in humans. More specifically, $\Delta^{15}\text{N}$ values in some animal tissues have been shown to vary with protein intake, balance or starvation [6,14,15,17–19] as well as with dietary protein source and quality [6,20,21]. However, because the latter studies were meta-analyses of literature data over different species from studies where the quantitative protein intake was not controlled for, there is a large risk of confusion between the specific effects of the qualitative and quantitative aspects of protein intake. Indeed, a difference in the dietary protein source is often associated with a difference in the level of protein intake and these two factors may affect $\Delta^{15}\text{N}$ values [22]. Accordingly, dedicated experimental investigations under controlled nutritional conditions are required to examine the changes in the pattern of isotopic discrimination between the

animal tissues and the diet that specifically relate to the nature and the quality of the dietary protein source.

The magnitude of $\Delta^{15}\text{N}$ has been proposed to reflect the efficiency of dietary protein assimilation and the importance of amino acid recycling [17,23,24], which both vary with the dietary protein source and quality [25–27]. In the present work, we hypothesized that dietary protein of different composition and nutritional characteristics would result in different discrimination factors in nitrogen pools. Since different dietary proteins may differentially impact amino acid metabolism in tissues [25,28], we also hypothesized that the magnitude of the impact of the dietary protein source on nitrogen discrimination factors might vary between tissues. Most studies reporting variations in natural ¹⁵N abundances depending on nutritional or physiological conditions have focused on pools that can be easily sampled, such as blood or hair [12–16,18,20,29]. Therefore, the data are fragmented, and the potential isotopic variations in other active metabolic pools have seldom been described, while such variations may interestingly indicate underlying changes in amino acid and protein metabolism. In this context, multiple simultaneous $\Delta^{15}\text{N}$ measurements taken from different tissues may trace complex changes in inter-organ protein metabolism. In this study, we determined the isotopic nitrogen composition of a large set of pools in rats after their adaptation to two dietary protein sources (milk and soy proteins) differing slightly in their amino acid composition and their effect on the tissue protein metabolism [25,28].

Results

Body composition, tissue mass and nitrogen content

The two experimental groups receiving a diet with either milk protein (MP) or soy protein (SP) had similar growth rates and tissue masses (Table 1). Nitrogen contents of the protein (PF) and non-protein (nPF) fractions of tissues at the end of the 3-wk experimentation period were similar between groups (Table S1), except for a lower nitrogen content in the nPF of the total muscle mass (–37%) in the rats fed with SP compared to MP. None of the total nitrogen content of tissues was impacted by the diet (Table S1). No differences were found in nitrogen content of plasma proteins and urea between groups (Table S1).

Variations in $\Delta^{15}\text{N}$ among tissues and proteins

Using the ¹⁵N natural abundances ($\delta^{15}\text{N}$) measured in each sampled pool (Table S2), nitrogen stable isotope discrimination values ($\Delta^{15}\text{N}$, the difference in $\delta^{15}\text{N}$ between the pool under consideration and the diet) were estimated for the fast turning-over pools that had likely reached, or almost reached, their isotopic equilibrium with the diet at the end of the 3-wk dietary period, and $\Delta^{15}\text{N}$ values were calculated at different levels (whole visceral area, each individual tissue and each nitrogen fraction in a given tissue and in plasma). At the tissue level, $\Delta^{15}\text{N}$ values were positive and differed greatly among tissues, with liver having the highest ¹⁵N abundance among the sampled visceral tissues for both groups (Table 2). The $\Delta^{15}\text{N}$ values of tissues were generally close to the $\Delta^{15}\text{N}$ values of their PF, because of the relative amounts of nitrogen in tissue fractions. The $\Delta^{15}\text{N}$ of PF exhibited significant inter-tissues differences (Fig. 1A) and ranged from +1.35‰ ($\pm 0.25\%$) in colon to +3.81‰ ($\pm 0.18\%$) in plasma in the MP group, and from +2.24‰ ($\pm 0.39\%$) in small intestine (SI) mucosa to +4.61‰ ($\pm 0.24\%$) in plasma in the SP group. For both groups, the plasma proteins (liver exported proteins, measured in the vena cava) had the highest $\Delta^{15}\text{N}$ values, and the liver constitutive proteins had $\Delta^{15}\text{N}$ values lower than those of plasma proteins but

Table 1. Body weight, tissue masses and plasma variables in rats fed a milk protein- or a soy protein-based diet for 3 wk.

	Milk Protein diet (n = 9)	Soy Protein diet (n = 9)
Initial body weight (g)	234±7	234±6
Final body weight (g)	361±17	356±17
Tissue mass (g/100 g BW)		
Stomach	0.40±0.03	0.37±0.02
Small intestine mucosa	0.71±0.14	0.75±0.20
Liver	2.98±0.12	2.99±0.26
Kidneys	0.65±0.02	0.63±0.04
Gastrocnemius muscle	0.35±0.02	0.36±0.02
Soleus Muscle	0.08±0.01	0.08±0.01
Plasma proteins (g/L)	52.4±3.5	55.3±3.8
Plasma urea (mmol/L)	6.6±0.4	6.2±1.2

Values are means ± SD. BW, Body Weight. There was no effect of the dietary protein source on tissue masses (Post hoc tests with Bonferroni adjustments, $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0028046.t001

higher than those of the other visceral proteins (all $P < 0.05$, Tables S3 & S4).

Effect of diet on $\Delta^{15}\text{N}$ in tissues and proteins

$\Delta^{15}\text{N}$ also varied relative to the protein source. At the tissue level, liver, kidney and colon were more enriched in ¹⁵N in rats fed the SP diet than in rats fed the MP diet, resulting in a higher overall visceral $\Delta^{15}\text{N}$ (3.53‰ \pm 0.14‰ and 2.58‰ \pm 0.11‰ with SP and MP respectively, Table 2). At the protein level, $\Delta^{15}\text{N}$ values were also higher with SP than MP diet in the PF of all tissues except SI mucosa (Fig. 1A). These differences between the two diets also varied between tissues. In colon proteins, the $\Delta^{15}\text{N}$ values were ~160% higher in the SP group than in the MP group (3.52‰ and 1.35‰, respectively), ~60% higher in kidney proteins (2.75‰ and 1.73‰, respectively) and stomach proteins (3.39‰ and 2.05‰, respectively), ~40% higher in liver constitutive proteins (4.14‰ and 2.98‰, respectively) and ~20% higher in liver-exported plasma proteins (4.61‰ and 3.81‰, respectively).

Variations in $\Delta^{15}\text{N}$ between nitrogen fractions within plasma and tissues

Furthermore, $\Delta^{15}\text{N}$ values differed between nitrogen fractions within plasma (PF vs. urea), and also within tissues (PF vs. nPF). Whatever the diet, plasma urea was depleted in ¹⁵N relative to the diet and relative to the plasma PF, with no diet effect on the $\Delta^{15}\text{N}$ values of plasma urea (–1.36±1.66‰ and –1.61±1.22‰ in MP and SP groups, respectively). Plasma urea was also ¹⁵N-depleted relative to the liver nPF, its precursor pool (Fig. 1B,C). In tissues, the PF were always enriched in ¹⁵N relative to the diets (Fig. 1A) whereas the nPF had either higher, similar or lower ¹⁵N abundances compared to the diet depending on both tissue and diet (Fig. 1B). In tissues, the PF was generally enriched in ¹⁵N relative to the nPF (Table 2), except in some tissues where there was no difference between fractions (namely, liver for both MP and SP groups and SI mucosa for the SP group only). Differences in ¹⁵N abundance between PF and nPF varied from tissue to tissue and between diets (Table 2): they were higher for the SP diet than for the MP diet in colon, kidneys and stomach, whereas they were lower in plasma and SI mucosa.

Table 2. Variations in nitrogen isotopic discrimination values among the different tissues and between nitrogen fractions within tissues for rats fed a milk protein- or a soy protein-based diet for 3 wk.

	Milk Protein diet		Soy Protein diet	
	(n = 9)		(n = 9)	
	$\Delta^{15}\text{N}$	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{PF}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{NPF}}$	$\Delta^{15}\text{N}$	$\Delta^{15}\text{N}_{\text{PF}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{NPF}}$
	‰			
Liver	3.00 ± 0.16 ^a	-0.18 ± 1.80	4.13 ± 0.10 ^{a*}	0.31 ± 1.34
Small intestine mucosa	2.03 ± 0.39 ^b	2.12 ± 0.50	2.23 ± 0.40 ^c	0.13 ± 0.55*
Stomach	1.86 ± 0.75 ^b	1.32 ± 1.00	2.41 ± 0.35 ^c	10.99 ± 1.05*
Kidneys	1.59 ± 0.22 ^{bc}	1.88 ± 0.33	2.04 ± 0.34 ^{c*}	7.10 ± 1.44*
Colon	1.23 ± 0.27 ^c	1.99 ± 0.50	3.29 ± 0.19 ^{b*}	4.10 ± 0.67*
Overall (visceral area)	2.58 ± 0.11	1.05 ± 0.98	3.53 ± 0.14*	3.20 ± 1.13*

Weighted isotopic discrimination values ($\Delta^{15}\text{N}$) were calculated for each visceral tissue (as the weighted average of its protein and non-protein fractions $\Delta^{15}\text{N}$ reported in Fig. 1) and globally for the visceral tissues (as the weighted average of liver, small intestine mucosa, stomach, kidneys and colon $\Delta^{15}\text{N}$). Differences in $\Delta^{15}\text{N}$ values between protein and non-protein fractions ($\Delta^{15}\text{N}_{\text{PF}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{NPF}}$) were calculated for each tissue. Values are means ± SD.

*Effect of the dietary protein source on tissue $\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{15}\text{N}_{\text{PF}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{NPF}}$ values (Post hoc tests with Tukey adjustments, $P < 0.05$). All values are significantly different from 0 (Student t-test, $P < 0.05$) except for the $\Delta^{15}\text{N}_{\text{PF}} - \Delta^{15}\text{N}_{\text{NPF}}$ values of the small intestine mucosa with the SP diet and of the liver with both diets. Values with different letters in a given column are significantly different (Post hoc tests with Tukey adjustments, $P < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0028046.t002

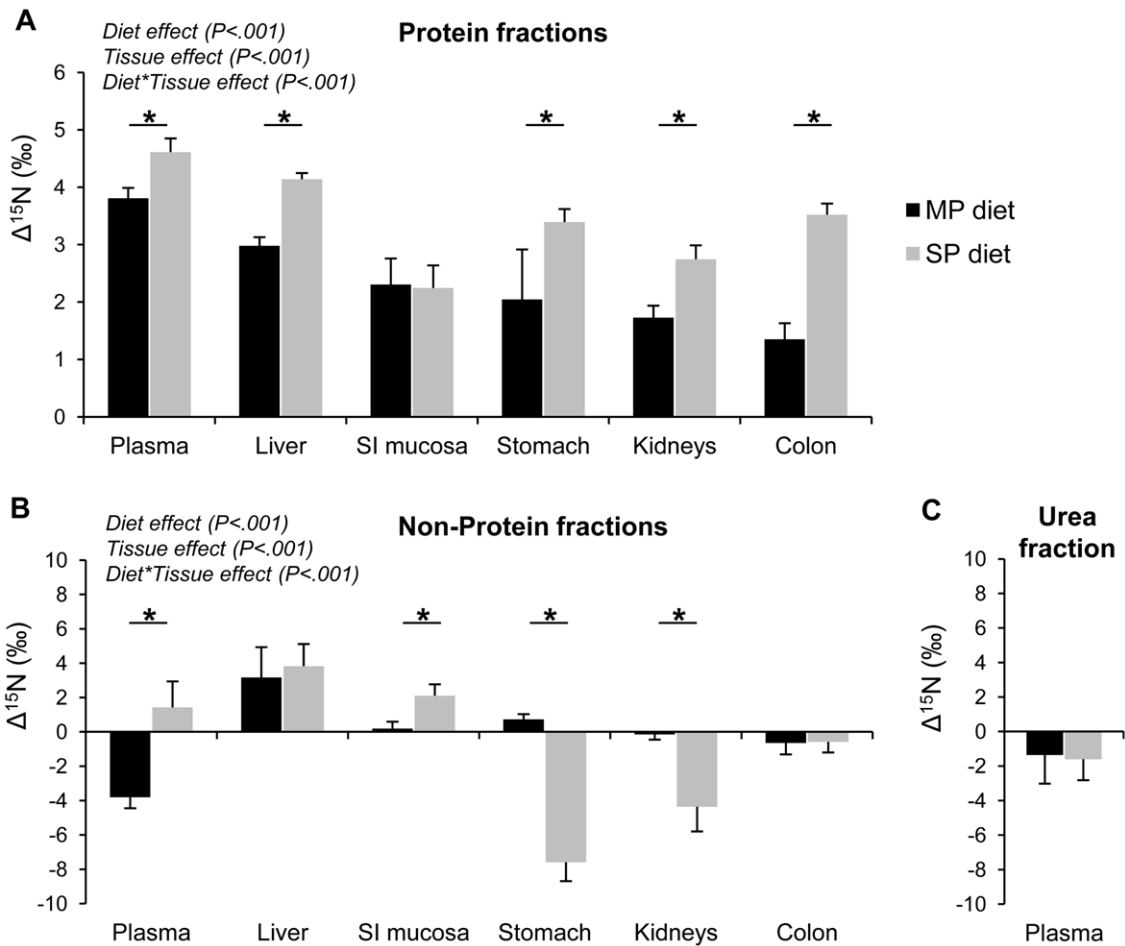


Figure 1. Nitrogen isotopic discrimination values ($\Delta^{15}\text{N}$) among the sampled tissues of rats. $\Delta^{15}\text{N}$ of (A) tissues protein fractions ($\delta^{15}\text{N}_{\text{protein fraction}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$), (B) tissue non-protein fractions ($\delta^{15}\text{N}_{\text{non-protein fraction}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$) and (C) plasma urea ($\delta^{15}\text{N}_{\text{plasma urea}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$), of rats fed the MP (black bars) and the SP (grey bars) diets. Values are means ± SD. *Effect of the dietary protein source in a given tissue (Post hoc tests with Tukey adjustments, $P < 0.001$). All values are significantly different from 0 (Student t-tests, $P < 0.05$) except for the non-protein fractions of SI mucosa and kidneys for the MP group. MP, Milk Protein; SP, Soy Protein; SI, Small Intestine.
 doi:10.1371/journal.pone.0028046.g001

Discussion

In this study, we investigated the specific impact of the dietary protein quality (milk vs. soy protein) on the nitrogen isotopic signatures in a large set of tissues and pools of rats under controlled conditions, i.e. under similar conditions of quantitative protein intake, growth and body composition between groups. The discrimination values ($\Delta^{15}\text{N}$) were calculated in the fast turning-over pools (visceral tissues and plasma) being at, or close to, their isotopic equilibrium with the diet at the end of the 3-wk experimental period. We showed that $\Delta^{15}\text{N}$ vary greatly among pools and are clearly impacted by the nature of the dietary protein in most of the pools. The observed $\Delta^{15}\text{N}$ differences between diets likely result from subtle modulations of the protein and amino acid metabolism induced by the differences in amino acid composition and quality between milk and soy proteins.

Variations in the discrimination values among nitrogen fractions within tissues and plasma

Contrary to ecological studies, which have generally reported $\Delta^{15}\text{N}$ values for plasma or tissues analyzed as a whole, we here specifically measured the natural ^{15}N abundance in different nitrogen fractions of tissues (PF and nPF) and plasma (PF, nPF and urea).

Firstly, our results of $\Delta^{15}\text{N}$ values for the tissue protein fractions, which represent the main part of tissue nitrogen, confirm that tissues, and more specifically tissue proteins, are generally ^{15}N -enriched relative to the diet, with a range of $\Delta^{15}\text{N}$ values (from 1.4‰ to 4.6‰) in line with literature values reported for whole tissues in rodents [1,4,8,30–36]. Also, we showed that, for a given tissue, $\Delta^{15}\text{N}$ values varied between its nitrogen fractions. PF were generally significantly ^{15}N -enriched compared to nPF, which may be explained by an isotope effect along one or several of the metabolic pathways within tissues, such as metabolic interconversions of amino acids, protein synthesis or protein breakdown.

$\Delta^{15}\text{N}$ values also varied between the different nitrogen fractions of plasma, with plasma urea being ^{15}N -depleted compared to plasma proteins. Plasma urea was also ^{15}N -depleted compared to the liver nPF, i.e. its main precursor pool, confirming the preferential removal of ^{15}N -depleted liver amino acids for urea production because of the isotope effect associated to deamination [8]. Nitrogen metabolism in the liver is a branched pathway, with precursor amino acids (liver nPF) being concurrently used for catabolic (urea production) or anabolic (synthesis of liver and plasma proteins) purposes. The isotopic fractionation observed between the end-products of each branch (i.e., ^{15}N -depletion of plasma urea relative to hepatic-synthesized proteins) suggests that the amino acids that are not directed toward deamination but used for protein synthesis become ^{15}N -enriched, and thereby contribute to the ^{15}N -enrichment of the hepatic-synthesized proteins. The magnitude of this fractionation is expected to depend both on the difference between the isotope effects associated to each of the hepatic metabolic pathways and on their relative activity [37,38]. Although it is a common hypothesis in the literature that deamination is involved in the ^{15}N enrichment of body tissues [39], this had not been demonstrated yet and our study is the first to actually report $\Delta^{15}\text{N}$ values for the metabolic pools of the hepatic branched pathway.

Variations in the discrimination values among body proteins

We observed significant differences in $\Delta^{15}\text{N}$ values among body proteins. For instance, whatever the dietary protein source, the plasma proteins (which mostly originate from synthesis in the liver)

had the highest ^{15}N abundance compared to all other sampled proteins including the liver constitutive proteins, and the liver proteins had a higher ^{15}N abundance than the other sampled proteins. Consistent observations of higher $\Delta^{15}\text{N}$ values in plasma than liver [5,40] and in liver than kidney [4,35] were already reported in the literature.

There is probably no simple mechanism that can solely explain the observed differences between tissues $\Delta^{15}\text{N}$. The isotopic signatures observed in the nitrogen pools of tissues are actually the result of the relative inward and outward fluxes of nitrogen isotopes in the many different pathways involved in the metabolism of proteins and amino acids (protein synthesis, protein degradation, non-protein metabolism, deamination, transamination, transport...), some of which being known to be associated with an isotope fractionating effect [9,41,42]. Therefore, variations in $\Delta^{15}\text{N}$ among body proteins may arise from differences in the number and intensity of these metabolic processes (for instance, greater recycling of amino acids from and for tissue protein turnover) and are probably associated with difference in tissues metabolic rates, as previously suggested to explain the greater ^{15}N abundance in the liver [31,32]. Notably, the observed differences in $\Delta^{15}\text{N}$ between tissues cannot be solely ascribed to differences in tissues turnover rates, since the reported $\Delta^{15}\text{N}$ values of the different body proteins did not rank the same way as their known turnover rate and this ranking greatly varied with the protein source. In addition, the observed differences in isotopic composition between the tissue proteins may be linked to their relative composition in amino acids, which exhibit different isotopic abundances [8]. Further investigations are needed to test and delimit the role of these possible mechanisms in producing $\Delta^{15}\text{N}$ differences between the tissue proteins.

Variations in the discrimination values in body proteins according to the dietary protein source

The dietary protein source strongly affected the nitrogen isotopic discrimination between body proteins and diet, with higher $\Delta^{15}\text{N}$ in rats fed soy than milk proteins for all reported proteins except that of the SI mucosa. Higher $\Delta^{15}\text{N}$ values have already been reported in liver of rats fed with plant vs. animal protein-based diets [1,8]. More specifically, higher $\Delta^{15}\text{N}$ values were observed in liver [8] and in plasma and jejunum proteins [38] of rats fed with soy vs. milk protein-based diets. We here show that this effect is a general feature, inasmuch as it is consistent over all the sampled visceral protein pools, except the small intestine. The amplitude of $\Delta^{15}\text{N}$ differences between diets varied among tissues, suggesting that the protein metabolism of tissues may be differentially impacted by the dietary protein source.

The differences in amino acid composition between these two dietary proteins, which induce subtle modulations in their metabolic fate and in the endogenous protein metabolism, certainly explain the higher $\Delta^{15}\text{N}$ values in rats fed soy than milk proteins. Studies in humans [26–28] and animals [25,43] have shown that the soy and milk proteins exhibit different overall and regional rates of utilization, the soy protein being less used for postprandial protein anabolism (i.e., lower net protein utilization) than the milk protein. Indeed, in the case of the soy protein, which contains a lower amount of indispensable amino acids, dietary amino acids are more deaminated and a larger proportion of amino acids incorporated in tissue proteins probably originate from endogenous amino acids that have been transaminated or recycled from protein degradation. Because these metabolic pathways are considered as a source of isotopic fractionation [8,42], the higher nitrogen isotopic discrimination with soy protein confirms the existence of these additional steps in the utilization of

soy protein. It can therefore be hypothesized that the best a dietary protein source matches the metabolic demand for indispensable amino acids, the larger is the proportion of dietary amino acids that are utilized for body protein synthesis and, as a result, the closer is the isotopic composition of the tissues to that of the diet. The fact that, in our study, we generally observed higher $\Delta^{15}\text{N}$ values in body proteins of SP-fed rats than MP-fed rats therefore strongly suggests that nitrogen isotopic discrimination increases when the dietary protein efficiency of deposition decreases. This interestingly agrees with the hypothesis of a negative relationship between $\Delta^{15}\text{N}$ and the net protein utilization of the diet protein source that was suggested in the literature from a set of fragmented data in ecological studies [6,20,21,23], where however, several important factors of variation (amount of nitrogen intake, growth rate, physiological condition, etc.) were not controlled for. By contrast, the present study assessed the impact of the dietary protein source on isotopic composition without any potential bias from variations in the protein intake, body composition or tissue mass (Table 1 and S1). Indeed, despite their differences in amino acids composition, the milk and soy proteins were provided in sufficient amounts in the diet (20% of energy) to satisfy the requirements for indispensable amino acids, as shown by the similar growth and tissue protein accretion in the two dietary groups. The existence of a relation between $\Delta^{15}\text{N}$ and dietary protein deposition efficiency is of significant importance because it indicates that the natural nitrogen isotopic enrichment pattern of tissues could be used as an indicator of the local anabolic use of dietary protein, and thus complements the data regarding total protein metabolism as obtained by classical tracer studies [44,45].

A limitation of this study is that the experimental diet was not provided over a long enough period of time to allow the slow-turning over, peripheral tissues to reach their isotopic equilibrium with the diet, so that we were only able to investigate the effect of the dietary protein source on tissue-to-diet discrimination values in the fast-turning over tissues, i.e. visceral organs and plasma. Indeed, the rate at which a tissue incorporates the isotopic signature of a diet varies among tissues and is slower for tissues with slow protein turnover rates and/or low growth rates [22]. For instance, more than 6 months are required to ensure nitrogen isotope equilibrium in muscle or fur in adult, non-growing rats [33]. We therefore did not calculate the $\Delta^{15}\text{N}$ in peripheral tissues as, after 3 wk, these values would still be impacted by the initial isotopic state, so that differences between diets in such $\Delta^{15}\text{N}$ values could not be solely attributed to a diet effect on protein metabolism and would thus be difficult to interpret. By contrast, in fast-turning over pools like liver or plasma, $\Delta^{15}\text{N}$ reaches a plateau after 2 weeks [8,46] or is near equilibrium after 3 weeks [33], as shown by data from diet-shift experiments in rodents. Concerning the other fast-turning over tissues like kidney, we found very few data of isotopic incorporation rates in the literature and the reported values often vary among studies according to the experimental conditions and growth rates [33,47]. In the present study, we believe that all the visceral tissues were very close to their isotopic equilibrium with the diet after 3-wk, given their high protein turnover rates and the high growth rate of the rats, which should have shortened the equilibration time [19]. Longer-term studies would be of interest to investigate, on a wider range of tissues, the effect of the dietary protein source that we here evidenced on visceral tissues.

In conclusion, the ^{15}N discrimination values varied among tissues, between the nitrogen fractions (PF, nPF and urea) and according to the dietary protein source. We showed consistently higher $\Delta^{15}\text{N}$ values in virtually all visceral proteins of rats fed soy than in those fed milk proteins and interpreted this higher

discrimination with soy than milk proteins as resulting from a lower dietary protein anabolic use and higher endogenous protein mobilization and recycling of amino acids. In view of these results, nitrogen stable isotope signatures of body proteins appear as highly sensitive markers of the delicate nutritional modulations of protein and amino acid metabolism. As far as we know, our work is the first demonstration that subtle tissue-specific modulations of protein metabolism induced by different dietary proteins and without any detectable effect on tissue composition actually leave a marked selective isotopic footprint in tissues. This novel approach, based on the investigation of the isotopic signatures of metabolic pools at natural abundance level, opens new, exciting perspectives to better characterize and understand the amino acid and protein metabolism. Some interesting mass-balance models have been developed to understand natural variations in $\Delta^{15}\text{N}$ at the level of the whole organism or its lean mass [17,19,48], and further modeling studies are still needed to mechanistically understand inter-tissue and inter-fraction variations in nitrogen isotopic composition.

Materials and Methods

Ethics Statement

Experiments were carried out in accordance with the recommendations in the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments (COMETHEA) of the Jouy-en-Josas INRA centre and AgroParisTech (Approval Number 11/015).

Animals and diets

Male Wistar Rats ($n=18$), initially weighing 191 g, were purchased from Harlan (France) and housed in a temperature-regulated room ($22\pm 2^\circ\text{C}$) on a 12-h light-dark cycle (dark period from 9:00 to 21:00). Before the beginning of the experiment, the rats were adapted to the laboratory conditions for one wk with free access to a commercial laboratory diet ($\delta^{15}\text{N}\approx 4\text{‰}$). Animals were then randomly divided into two groups and assigned to receive one of the two experimental diets. Initial body weights were similar for the two groups.

The two diets were isoenergetic, identical in their nutrient composition (20% of energy as protein, 30% as lipids and 50% as carbohydrates) and met the requirements for growth. They differed in their protein source, either milk protein (MP, $n=9$) or soy protein (SP, $n=9$) (Table 3). Diets were prepared by the UPAE (Unité de Préparation des Régimes Expérimentaux, French National Institut of Agronomic Research, INRA, Jouy en Josas, France).

Experimental protocol and sampling procedures

Following the 1-wk adaptation period, the rats were fed one of the two experimental diets for 3 wk. Rats were given free access to food from 9:00 to 19:00 (during the dark period) and had free access to water throughout the day. Body weight was measured twice weekly. At the end of week #3 (day 21 or 22), all the rats were killed after an overnight fast.

The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg of BW, a dose which is too small to significantly affect the measured isotopic signatures based on the mode of administration of this anesthetic and on distribution kinetics of barbiturates in tissues and plasma of rats [49]). The abdomen was opened and approximately 5 ml of blood were quickly withdrawn from the vena cava. The animals were then killed by rupture of the vena cava and aorta. The liver, small intestine (SI), stomach, colon, kidneys, gastrocnemius and soleus

Table 3. Composition of diets.

Component	Milk Protein Diet	Soy Protein Diet
	(n = 9)	(n = 9)
	<i>g/kg DM</i>	
Total milk protein	199.3	
Soy protein		199.3
Cornstarch	428.2	433.7
Sucrose	33.6	45.8
Lactose	17.4	
Soybean oil	127.7	132.9
Dairy fat	5.0	
Cellulose	52.8	53.6
AIN-93M-MX mineral mixture	36.9	37.5
AIN-93-VX vitamin mixture	10.6	10.7
Choline	2.4	2.5

DM, Dry Matter.

doi:10.1371/journal.pone.0028046.t003

muscles were rapidly dissected out, rinsed, weighed and snap frozen in liquid nitrogen. The SI was scraped to collect the mucosa, which was frozen separately. Hair and skin were sampled. All samples were stored at -20°C until analysis.

Samples preparation

In each tissue, the protein fraction (PF) and the non-protein fraction (nPF) were isolated for separate determination of nitrogen content and isotopic ratios in each fraction. Frozen tissues were pulverized with a mortar and pestle cooled in liquid nitrogen and precipitated by adding 700 μL of 5-sulfosalicylic acid (10%) per 100 mg of tissue. After centrifugation (2,500 g, 4°C , 15 min), the supernatant was extracted and the pellet was rinsed twice with 700 μL of 5-sulfosalicylic acid (10%). The soluble fraction (i.e., nPF containing the free amino acids) and the insoluble fraction (i.e., PF containing the protein-bound amino acids) were then freeze-dried.

In plasma, the different nitrogen fractions (PF, nPF and urea) were also separated. PF was isolated by precipitation with sulfosalicylic acid (200 μL , 1 g/mL). After 1-h storage at 4°C and centrifugation (2,000 g, 4°C , 20 min), the pellet was rinsed with 1 mL sulfosalicylic acid (1 g/mL), centrifuged again and freeze-dried. The extracted soluble fraction -containing nPF and urea- was neutralized and transferred onto 0.5 mL cation exchange resin (Dowex AG50X8, Biorad, Marnes-la-coquette, France) to bind the ammonium released from urea hydrolysis (8 μL urease for 2 h at 30°C). The ammonium-loaded resin was washed and kept at 4°C until analysis, while the urea-depleted supernatant, containing amino acids and peptides, was collected and filtered to eliminate peptides larger than 3 kDa (Amicon Ultra-4, Ultracel 3k, Millipore, Carrigtwohill, Ireland) and isolate nPF. Before isotopic determination, urea-derived-ammonia was eluted from the resins by the addition of KHSO_4 (2.5 mol/L).

Elemental analysis and isotopic determinations

The natural stable isotope ratios of nitrogen were determined in plasma urea and in PF and nPF of tissues and plasma using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime, VG Instruments, Manchester, UK) coupled to an elemental analyzer (EA 3000, Eurovector, Italy). Standards were included in every run to correct for the possible variations in raw values measured by the mass

spectrometer. Results were expressed using the delta notation according to the following equation:

$$\delta^{15}\text{N} = \left[\left(\frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right] \times 1000,$$

where R_{sample} and R_{standard} are the nitrogen isotope ratio of the heavier isotope to the lighter isotope ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) for the sample being analyzed and the internationally defined standard (atmospheric N_2 , $R_{\text{standard}} = 0.0036765$), respectively, and δ is the delta notation in parts per 1000 or per mill (‰) relative to the standard.

The total nitrogen content of the tissues PF and nPF and of the plasma PF were determined using the elemental analyzer (EA 3000, Eurovector, Italy), with atropine as standard. Urea concentrations in plasma were determined with a commercial kit using an enzymatic method (Urea kit S-1000, Biomerieux, Crajonne, France).

Calculations and statistics

Tissue samples were weighed before and after freeze-drying to estimate tissue dry matter. The nitrogen content of each sampled tissue fraction (PF or nPF) was calculated on the basis of the following equation:

$$\text{N (mmol)} = 1000 \times (\% \text{N} / 100 \times \% \text{DM} / 100 \times m) / 14,$$

where %N and %DM (%) are respectively the nitrogen and the dry matter percentages measured in the sample, and m (g) is the total mass of the tissue. Total muscle and skin masses were not measured, but were estimated as 45% [50] and 15% [51] of total body mass, respectively.

The nitrogen content of plasma PF and nPF was calculated as the product of the nitrogen concentration in the fraction and the plasma volume, estimated as 3.5% of body mass [52]. The nitrogen concentration in the plasma nPF was estimated using aminoacidemia values obtained by our group in similar conditions (3.1 mmol/L i.e., 4.4 mmol/L of nitrogen equivalents) [53]. The nitrogen content of the plasma urea pool (N_{urea} , mmol) was assessed on the basis of the plasma urea concentration (C_{urea} , mmol/L of urea nitrogen), its volume of distribution (i.e., total body water, estimated as 62.3% of the body mass, BM, Kg) [54], and a correction factor of 92% which represents the water content of the blood: $N_{\text{urea}} = C_{\text{urea}} \times 0.623 \times \text{BM} / 0.92$ [55].

Isotopic nitrogen discrimination between a pool and the diet was described as the difference in $\delta^{15}\text{N}$ using the Δ notation, where $\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{pool}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$ ($\Delta^{15}\text{N} > 0$ indicates a greater abundance in ^{15}N in the pool relative to the diet). As MP and SP diets had different natural isotopic ratios ($\delta^{15}\text{N}_{\text{diet}}$ were 7.7‰ for MP and 1.7‰ for SP), $\Delta^{15}\text{N}$ is used to compare the isotopic composition of tissues of animals fed different diets.

$\Delta^{15}\text{N}$ values were calculated in the fast turning-over pools having likely reached, or almost reached, their isotopic equilibrium with the diet at the end of the 3-wk experimental period (plasma urea and each of the PF and nPF of visceral tissues and plasma). For each visceral tissue and plasma, an overall $\Delta^{15}\text{N}$ value was calculated as the weighted average of the isotopic compositions of its different nitrogen fractions, as $\Delta^{15}\text{N} = \sum m_i \times \Delta_i / \sum m_i$, where m_i is the amount of nitrogen in the fraction i and Δ_i is the isotopic discrimination between the fraction i and the diet. Likewise, a pooled visceral $\Delta^{15}\text{N}$ was calculated as the weighted average of the isotopic compositions of the PF and nPF of liver, SI mucosa, stomach, kidneys and colon.

Results are expressed as means \pm SD. The effects of diet (MP versus SP) and tissue and their interaction were analyzed by a two-

way analysis of variance (Proc GLM, SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Post hoc tests with Tukey or Bonferroni adjustments were used for multiple comparisons between tissues and dietary groups (MP versus SP). *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

Supporting Information

Table S1 Nitrogen composition of tissues and plasma of rats fed a milk protein- or a soy protein-based diet for 3 wk. (DOC)

Table S2 ¹⁵N natural abundances (δ¹⁵N) in the different nitrogen fractions of tissues and plasma. (DOC)

Table S3 Statistical significances of differences in discrimination values (Δ¹⁵N) between body proteins in rats fed a milk protein-based diet for 3 wk. (DOC)

Table S4 Statistical significances of differences in discrimination values (Δ¹⁵N) between body proteins in rats fed a soy protein-based diet for 3 wk. (DOC)

Acknowledgments

This work was presented in part at the Experimental Biology Meeting in Anaheim, CA, U.S.A., April 24–28, 2010 (Abstract 740.6, published in FASEB J.). We thank the reviewers for their insightful remarks and suggestions, which helped to improve the quality of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB HF. Performed the experiments: NP CB HF. Analyzed the data: NP CB HF. Wrote the paper: NP HF FM JFH CB DT.

References

- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2008) Discrimination factors (Delta N-15 and Delta C-13) in an omnivorous consumer: effect of diet isotopic ratio. *Funct Ecol* 22: 255–263.
- Dalerum F, Angerbjorn A (2005) Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. *Oecologia* 144: 647–658.
- Hobson KA (1999) Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314–326.
- DeNiro MJ, Epstein S (1981) Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45: 341–351.
- Caut S, Angulo E, Courchamp F (2009) Variation in discrimination factors (Delta N-15 and Delta C-13): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J Appl Ecol* 46: 443–453.
- Vanderklift MA, Ponsard S (2003) Sources of variation in consumer-diet delta N-15 enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136: 169–182.
- Hayes JM (2001) Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Stable Isotope Geochemistry*. Washington: Mineralogical Soc America. pp 225–277.
- Gaebler OH, Vitti TG, Vukmirovich R (1966) Isotope effects in metabolism of ¹⁴N and ¹⁵N from unlabeled dietary proteins. *Can J Biochem* 44: 1249–1257.
- Macko SA, Estep MLF, Engel MH, Hare PE (1986) Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino-acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 50: 2143–2146.
- Gannes LZ, del Rio CM, Koch P (1998) Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol* 119: 725–737.
- Steele KW, Daniel RM (1978) Fractionation of nitrogen isotopes by animals - a further complication to use of variations in natural abundance of n-15 for tracer studies. *J Agric Sci* 90: 7–9.
- Petzke KJ, Boeing H, Klaus S, Metzges CC (2005) Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *J Nutr* 135: 1515–1520.
- Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, et al. (2004) Nitrogen balance and delta N-15: why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 2889–2896.
- Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, et al. (2005) Nitrogen balance and delta N-15: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 2497–2506.
- Mekota AM, Grupe G, Ufer S, Cuntz U (2006) Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 1604–1610.
- Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, Metzges CC (2006) Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 2973–2978.
- Martinez del Rio C, Wolf BO (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In: Starck JM, Wang T, eds. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates* Science Publishers, Inc. pp 141–174.
- Barboza PS, Parker KL (2006) Body protein stores and isotopic indicators of N balance in female reindeer (*Rangifer tarandus*) during winter. *Physiol Biochem Zool* 79: 628–644.
- Ponsard S, Averbuch P (1999) Should growing and adult animals fed on the same diet show different delta N-15 values? *Rapid Commun Mass Spectrom* 13: 1305–1310.
- Robbins CT, Felicetti LA, Sponheimer M (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* 144: 534–540.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (2001) Variation in delta N-15 and delta C-13 trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnol Oceanogr* 46: 2061–2066.
- Martinez del Rio C, Wolf N, Carleton SA, Gannes LZ (2009) Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biol Rev* 84: 91–111.
- Gaye-Siessegger J, Focken U, Abel H, Becker K (2004) Individual protein balance strongly influences delta N-15 and delta C-13 values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* 91: 90–93.
- Waters-Rist AL, Katzenberg MA (2010) The Effect of Growth on Stable Nitrogen Isotope Ratios in Subadult Bone Collagen. *Int J Osteoarchaeol* 20: 172–191.
- Deutz NEP, Bruins MJ, Soeters PB (1998) Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *J Nutr* 128: 2435–2445.
- Fouillet H, Juillet B, Gaudichon C, Mariotti F, Tome D, et al. (2009) Absorption kinetics are a key factor regulating postprandial protein metabolism in response to qualitative and quantitative variations in protein intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1691–R1705.
- Morens C, Bos C, Pueyo ME, Benamouzig R, Gauseres N, et al. (2003) Increasing habitual protein intake accentuates differences in postprandial dietary nitrogen utilization between protein sources in humans. *J Nutr* 133: 2733–2740.
- Fouillet H, Mariotti F, Gaudichon C, Bos C, Tome D (2002) Peripheral and splanchnic metabolism of dietary nitrogen are differently affected by the protein source in humans as assessed by compartmental modeling. *J Nutr* 132: 125–133.
- O'Brien DM, Kristal AR, Jeannet MA, Wilkinson MJ, Bersamin A, et al. (2009) Red blood cell delta N-15: a novel biomarker of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid intake. *Am J Clin Nutr* 89: 913–919.
- Ambrose SH (2000) Controlled diet and climate experiments on nitrogen isotope ratios of rats. In: Ambrose SH, Katzenberg MA, eds. *Biogeochemical approaches to paleodietary analysis*. New York: Kluwer Academic Publishers. pp 243–259.
- Arneson LS, MacAvoy SE (2005) Carbon, nitrogen, and sulfur diet-tissue discrimination in mouse tissues. *Can J Zool* 83: 989–995.
- DeMots RL, Novak JM, Gaines KF, Gregor AJ, Romanek CS, et al. (2010) Tissue-diet discrimination factors and turnover of stable carbon and nitrogen isotopes in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Can J Zool* 88: 961–967.
- Kurle CM (2009) Interpreting temporal variation in omnivore foraging ecology via stable isotope modelling. *Funct Ecol* 23: 733–744.
- Robbins CT, Felicetti LA, Florin ST (2009) The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ratio discrimination and assimilated diet estimation. *Oecologia* 162: 571–579.
- Yoneyama T, Ohta Y, Ohtani T (1983) Variations of natural carbon-13 and nitrogen-15 abundances in rat tissues and their correlation. *Radioisotopes* 32: 330–332.
- MacAvoy SE, Arneson LS, Bassett E (2006) Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* 150: 190–201.
- Schoeller DA (1999) Isotope fractionation: Why aren't we what we eat? *J Archaeol Sci* 26: 667–673.
- Sick H, Roos N, Saggau E, Haas K, Meyn V, et al. (1997) Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. *Z Ernahrung* 36: 340–346.
- Sponheimer M, Robinson TF, Roeder BL, Passey BH, Ayliffe LK, et al. (2003) An experimental study of nitrogen flux in llamas: is N-14 preferentially excreted? *J Archaeol Sci* 30: 1649–1655.
- Roth JD, Hobson KA (2000) Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Can J Zool* 78: 848–852.

41. Seila AC, Okuda K, Nunez S, Seila AF, Strobel SA (2005) Kinetic isotope effect analysis of the ribosomal peptidyl transferase reaction. *Biochemistry* 44: 4018–4027.
42. Silfer JA, Engel MH, Macko SA (1992) Kinetic fractionation of stable carbon and nitrogen isotopes during peptide-bond hydrolysis - experimental-evidence and geochemical implications. *Chem Geol* 101: 211–221.
43. Lohrke B, Saggau E, Schadereit R, Beyer M, Bellmann O, et al. (2001) Activation of skeletal muscle protein breakdown following consumption of soyabean protein in pigs. *Br J Nutr* 85: 447–457.
44. Fouillet H, Bos C, Gaudichon C, Tome D (2002) Approaches to quantifying protein metabolism in response to nutrient ingestion. *J Nutr* 132: 3208S–3218S.
45. Smith K, Rennie MJ (1996) The measurement of tissue protein turnover. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10: 469–495.
46. MacAvoy SE, Macko SA, Arneson LS (2005) Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 83: 631–641.
47. Arneson LS, MacAvoy S, Basset E (2006) Metabolic protein replacement drives tissue turnover in adult mice. *Can J Zool* 84: 992–1002.
48. Balter V, Simon L, Fouillet H, Lecuyer C (2006) Box-modeling of N-15/N-14 in mammals. *Oecologia* 147: 212–222.
49. Blakey GE, Nestorov IA, Arundel PA, Aarons IJ, Rowland M (1997) Quantitative structure-pharmacokinetics relationships: I. Development of a whole-body physiologically based model to characterize changes in pharmacokinetics across a homologous series of barbiturates in the rat. *J Pharmacokinetics Biopharm* 25: 277–312.
50. Morens C, Gaudichon C, Metges CC, Fromentin G, Baglieri A, et al. (2000) A high-protein meal exceeds anabolic and catabolic capacities in rats adapted to a normal protein diet. *J Nutr* 130: 2312–2321.
51. Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, et al. (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: R934–R942.
52. Waynforth HB (1980) Experimental and surgical technique in the rat. *Experimental and surgical technique in the rat*. London UK: Academic Press. pp xv + 269.
53. Morens C, Gaudichon C, Fromentin GE, Marsset-Baglieri A, Bensaid A, et al. (2001) Daily delivery of dietary nitrogen to the periphery is stable in rats adapted to increased protein intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E826–E836.
54. Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, Blachier F, Tome D, et al. (2011) Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab (Lond)* 8: 52.
55. Sharp PE, M.C. L (1998) *The laboratory rat* The Laboratory Animal Pocket Reference Series: CRC Press LLC.

B. ÉTUDE 2 :**VARIATIONS DES ABONDANCES ISOTOPIQUES NATURELLES EN AZOTE ET EN CARBONE ($\delta^{15}\text{N}$ ET $\delta^{13}\text{C}$) DANS DIFFÉRENTS TISSUS CHEZ LE RAT DANS UNE SITUATION PRÉ-PATHOLOGIQUE : EFFET D'UN SYNDROME MÉTABOLIQUE NUTRITIONNELLEMENT INDUIT ASSOCIANT INSULINO-RÉSISTANCE ET OBÉSITÉ.**

Cette étude, qui est en attente de résultats complémentaires de métabolomique avant publication, a pour l'instant fait l'objet d'une communication orale en congrès :

Poupin N., F. Mariotti, J.-F. Huneau, J.-P. Godin, D. Hermier, H. Fouillet. Les abondances isotopiques naturelles signent l'initiation nutritionnelle du syndrome métabolique. 10^{èmes} Journées Francophones de Nutrition (JFN), 12-14 décembre 2012, Lyon, France.

Contexte et objectifs :

Les différentes voies anaboliques et cataboliques peuvent avoir des affinités isotopiques différentes, ce qui engendre un fractionnement isotopique au niveau des embranchements métaboliques. Dans un pool donné, les abondances naturelles des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) et du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) peuvent alors différer selon l'activité relative des voies métaboliques entrantes et sortantes, et signer de façon intégrative les modifications métaboliques associées à certains états nutritionnels ou physiopathologiques. Cette étude a été réalisée dans le but d'explorer si le développement d'un syndrome métabolique (SM), induit par voie nutritionnelle, s'accompagne de signatures isotopiques particulières, et d'identifier lesquelles, afin de mieux caractériser les dysrégulations, encore peu connues, du métabolisme protéino-énergétique survenant lors de l'initiation du SM.

Méthodes :

Nous avons suivi le poids et la consommation de 60 rats nourris *ad libitum* pendant 10 semaines avec un régime obésogène gras et sucré contenant, en % de l'énergie, 54% de lipides majoritairement saturés, 25% de glucides et 21% de protéines. À l'issue de ces 10 semaines, nous avons sélectionné deux groupes de 10 rats parmi ceux devenus obèses et insulino-résistants (groupe SM, n=10) ou restés maigres et insulino-sensibles (groupe T, n=10). Ces rats ont été sacrifiés et des échantillons de sang, d'urine, des contenus intestinaux et de plusieurs tissus (muqueuse de l'intestin grêle (IG), foie, rein, muscle *tibialis anterior* (TA) et *extensor digitorum longus*, cœur, poumon, peau, poils, tissu adipeux épididymaire (TAE) et sous-cutané) ont été collectés. Après séparation de différentes fractions dans ces prélèvements, nous avons mesuré par spectrométrie de masse à ratio isotopique les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des contenus intestinaux, de l'urine et des P du plasma et des différents tissus, ainsi que les $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée et l'ammoniaque urinaires et des fractions AA libres du plasma et des différents tissus, et aussi les $\delta^{13}\text{C}$ des lipides des tissus adipeux.

Résultats & discussion :

Pendant les 10 semaines d'adaptation au régime obésogène, les rats SM, en proportion de leur masse corporelle, n'ont pas montré de différence de consommation mais avaient une efficacité alimentaire supérieure par rapport aux rats T. Au sacrifice, la masse corporelle totale et la masse de TAE des rats SM étaient plus élevées de respectivement 35% et 78% que celles des rats T et, leur triglycéridémie et leur insulïnémie étaient respectivement 1,8 et 8,2 fois supérieures. Nous avons observé, chez les rats SM, des $\delta^{15}\text{N}$ diminués dans les P du cœur et du plasma et dans les P et les AA du muscle TA, et à l'inverse des $\delta^{15}\text{N}$ augmentés dans les P de l'IG et du TAE et dans le contenu caecal. Les $\delta^{13}\text{C}$ étaient supérieurs dans les P du cœur et inférieurs dans les P du foie et dans la fraction lipidique du TAE chez les rats SM par rapport aux rats T. Les différences de $\delta^{15}\text{N}$ et de $\delta^{13}\text{C}$ observées entre les 2 groupes sont d'environ 0,1 et 0,3‰. Une analyse factorielle discriminante a permis d'identifier que les 3 abondances isotopiques naturelles contribuant le plus à différencier les groupes étaient les $\delta^{15}\text{N}$ des protéines de l'IG et les $\delta^{13}\text{C}$ des protéines du foie et du cœur, et qu'en combinant ces 3 seules valeurs on pouvait déterminer de façon fiable le groupe d'appartenance (SM ou T) d'un rat.

Conclusions :

Cette étude permet d'établir que les $\delta^{15}\text{N}$ de certains pools métaboliques sont modulés lors de l'initiation précoce d'un SM associant IR et obésité et constituent des signatures isotopiques des modulations métaboliques induites dans ces conditions. Les différences de $\delta^{15}\text{N}$ mises en évidence montrent que lors de l'installation d'un SM, différentes voies du métabolisme des protéines et acides aminés sont affectées dans l'IG, le foie, le cœur, le MTA et le TAE.

**Variations des abondances isotopiques naturelles en azote et en carbone ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) dans différents tissus chez le rat dans une situation pré-pathologique :
effet d'un syndrome métabolique nutritionnellement induit
associant insulino-résistance et obésité.**

Nathalie Poupin^{1,2}, François Mariotti^{1,2}, Jean-François Huneau^{1,2}, Tristan Mary-Huard³, Jean-Philippe Godin⁴, Dominique Hermier^{1,2} & Hélène Fouillet^{1,2}

¹ INRA, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

² AgroParisTech, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

³ UMR 518 INRA-AgroParisTech MIA (Mathématiques et Informatique Appliquées), F-75005 Paris, France

⁴ Centre de Recherche Nestlé, Nestec, Ltd., Lausanne, Suisse

RÉSUMÉ

Les abondances naturelles des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) et du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) dans les différents pools corporels sont liées à l'activité relative des différentes voies métaboliques dans l'organisme et peuvent signer de manière intégrative l'impact métabolique de conditions nutritionnelles ou physiopathologiques. Nous avons cherché à caractériser ces possibles signatures isotopiques dans le contexte de l'instauration nutritionnelle précoce d'un syndrome métabolique (SM). 60 rats ont reçu un régime gras et sucré potentiellement obésogène pendant 10 semaines, à l'issue desquelles nous avons sélectionné un groupe de rats sensibles au SM (groupe SM, n=10) et de rats témoins résistants au SM (groupe T, n=10), qui différaient en termes de poids corporel et de triglycéridémie et insulinémie plasmatiques (1,3, 1,8 et 8,2 fois plus grandes dans le groupe SM, respectivement). Chez ces rats SM et T, nous avons prélevé contenus intestinaux, sang, muqueuse de l'intestin grêle (IG), foie, rein, muscles *tibialis anterior* (TA) and *extensor digitorum longus* (EDL), cœur, rate, peau, poils, tissus adipeux épидidymaire (TAE) et sous-cutané (TASC). Nous avons mesuré par EA-IRMS les $\delta^{15}\text{N}$ des contenus intestinaux et des protéines (P) et des acides aminés (AA) du plasma et des tissus prélevés, ainsi que les $\delta^{13}\text{C}$ des contenus intestinaux, des P du plasma et des tissus, et des lipides des tissus adipeux. Les rats SM et T différaient significativement pour différentes valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (P du muscle TA, P du cœur, P de l'IG, P du plasma, P du TAE, AA du muscle TA et contenus caecaux) et de $\delta^{13}\text{C}$ (P du foie, P du cœur, lipides du TAE). Une analyse factorielle discriminante a permis d'identifier que les 3 abondances isotopiques contribuant le plus à différencier les groupes étaient les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'IG et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie et du cœur, et qu'en combinant ces 3 seules valeurs on pouvait déterminer de façon fiable le groupe d'appartenance (SM ou T) d'un rat. Ces résultats mettent en évidence que différentes voies du métabolisme des AA et des P sont affectées dans l'IG, le foie, le cœur, le muscle TA et le TAE pendant l'instauration nutritionnelle précoce du SM.

Mots clés : signatures isotopiques, syndrome métabolique, insulinorésistance, obésité.

INTRODUCTION

Les abondances naturelles des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$, l'abondance relative de l'isotope lourd ^{15}N par rapport au léger ^{14}N) et du carbone ($\delta^{13}\text{C}$, l'abondance relative de l'isotope lourd ^{13}C par rapport au léger ^{12}C) varient selon les pools métaboliques d'un individu (Arneson *et al.* 2006), en raison du fractionnement isotopique spécifique associé à chaque voie métabolique. En effet, les processus biochimiques sont sensibles à la masse des isotopes et utilisent préférentiellement les isotopes légers (Macko *et al.* 1986), ce qui induit un fractionnement isotopique entre pools précurseurs et produits, en particulier au niveau des embranchements métaboliques où les différentes voies anaboliques et cataboliques peuvent avoir des affinités isotopiques différentes (Sick *et al.* 1997). De ce fait, dans un pool donné, les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ peuvent différer selon l'activité relative des voies métaboliques entrantes et sortantes, et signer de façon intégrative les modifications métaboliques associées à certains états nutritionnels ou physiopathologiques. Ces signatures isotopiques en abondance naturelle commencent à peine à être exploitées en nutrition et physiopathologie, et il a été montré que le $\delta^{15}\text{N}$ des cheveux est à même de caractériser le végétarisme, l'anorexie, les effets du stress, de la grossesse ou de la cirrhose hépatique (Mekota *et al.* 2006; Petzke *et al.* 2010). L'isotopomique est ainsi une approche novatrice qui consiste à utiliser les signatures isotopiques naturelles des différents pools métaboliques pour caractériser des conditions physio-pathologiques et nutritionnelles et mieux comprendre leurs répercussions métaboliques.

Nous avons préalablement montré qu'une modulation du métabolisme protéique de type nutritionnelle (par la qualité des protéines alimentaires) laisse une empreinte isotopique visible au niveau des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires (Poupin *et al.* 2011) et nous cherchons désormais à établir si des modulations métaboliques liées à des conditions pré-pathologiques peuvent également générer des signatures isotopiques particulières. C'est très probablement le cas du syndrome métabolique, qui associe entre autres obésité viscérale et insulino-résistance (Alberti *et al.* 2009; Dandona *et al.* 2005), en raison des modifications du métabolisme protéino-énergétique qui lui sont associées. En effet, l'obésité et l'insulinorésistance induisent des perturbations du métabolisme protéique, et ce spécifiquement ou différemment dans les différents tissus, mais les données de la littérature à ce sujet sont encore rares et contradictoires (Guillet *et al.* 2011). Dans cette étude, nous voulions ainsi explorer si le développement d'un syndrome métabolique nutritionnellement induit s'accompagne de signatures isotopiques particulières, et identifier lesquelles afin de mieux caractériser les dysrégulations du métabolisme protéino-énergétique survenant lors de l'initiation du syndrome métabolique, qui sont encore peu connues. Pour ce faire, 60 rats Wistar mâles ont été placés sous un régime alimentaire gras et sucré, potentiellement obésogène, pendant 10 semaines à l'issue desquelles nous avons sélectionné deux groupes de 10 rats parmi ceux devenus obèses et insulino-résistants (groupe SM, rats en syndrome métabolique, $n=10$) versus ceux restés relativement maigres et insulino-sensibles (groupe T, rats témoins, $n=10$), et nous avons mesuré les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ de l'ensemble ("bulk") ou de différentes fractions (protéines, acides aminés, urée, ammoniaque, lipides) de leurs tissus (intestin, foie, reins, muscles, rate, cœur, peau, tissu adipeux), sang (plasma et cellules sanguines), urines et contenus intestinaux (colon et

caecum). La comparaison des valeurs obtenues pour les groupes SM et T nous a permis de montrer l'existence de signatures isotopiques des modifications du métabolisme protéino-énergétique advenant lors de l'instauration nutritionnelle précoce du syndrome métabolique, et d'identifier les pools dans lequel le métabolisme protéino-énergétique est modulé sous l'effet de l'obésité associée à l'insulino-résistance.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Protocole expérimental

Le schéma expérimental général est présenté en **Figure 1A**.

Lors d'une première phase, 60 rats Wistar mâles (poids moyen 200g) ont été soumis, après une première semaine d'acclimatation aux conditions de l'animalerie, à 10 semaines d'adaptation à un régime hypercalorique gras et sucré dont la composition est donnée dans le **Tableau 1**. Les lipides (93% de saindoux et 7% d'huile de soja), glucides (55% d'amidon de maïs et 45% de saccharose) et protéines (caséines) représentaient respectivement 54%, 25% et 21% de l'énergie totale du régime. Des travaux antérieurs ont montré que ce type de régime induit une obésité accompagnée d'une insulino-résistance chez une partie des rats, avec une intéressante variabilité inter-individuelle (Mariotti *et al.* 2008). Tout au long de cette période d'adaptation au régime, le poids des rats a été mesuré chaque semaine et leur consommation alimentaire une fois toutes les deux semaines.

Au bout de la neuvième semaine, chaque rat a subi une prise de sang (300 µl de sang sur 15µl d'EDTA à 10%) dans une veine latérale de la queue, afin de mesurer sa glycémie, triglycéridémie et insuliniémie plasmatiques. Au bout de la dixième semaine, nous avons sélectionné 2 groupes de 10 rats parmi les 60 initialement soumis au régime, sur la base de leur poids corporel et de leur insuliniémie et triglycéridémie mesurées en fin de neuvième semaine. Le premier groupe de 10 rats a été choisi parmi ceux restés relativement minces et insulinosensibles (groupe T, rats témoins, n=10) et l'autre groupe de 10 rats parmi ceux devenus les plus obèses et insulino-résistants (groupe SM, rats en syndrome métabolique, n=10).

À l'issue des dix semaines d'adaptation au régime, les 20 rats sélectionnés ont été pesés puis sacrifiés après une nuit de jeûne, par rupture de la veine cave après anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Au moment des sacrifices, nous avons déterminé la composition corporelle des animaux en mesurant le poids corporel total et le poids de différents organes comme le foie, les muscles TA (Tibialis Anterior) et EDL (Extensor Digitorum Longus), les reins, le cœur, la rate, les tissus adipeux épидidymaire (TAE), sous-cutané (TASC) et péri-rénal, et la carcasse. En outre, les prélèvements suivants ont été effectués au moment des sacrifices : le sang de la veine cave (5-8 ml), des échantillons de différents tissus (muqueuse de l'intestin grêle (IG), foie, muscles TA et EDL, reins, peau (sans poils), cœur, rate, TAE, TASC), ainsi que les contenus du caecum et du côlon, et l'urine de la vessie. La carcasse des animaux ainsi que la peau (avec poils) ont été disséquées et pesées.

Analyse des prélèvements

Traitements préalables et séparations des différentes fractions

Les échantillons de sang ont été centrifugés, pour séparer le plasma des cellules sanguines (RBC), et tous les prélèvements de tissus et de contenus gastro-intestinaux ont été pesés, aliquotés et congelés à -20°C . Un petit volume d'urine et de plasma ($50\mu\text{l}$) a été réservé pour mesurer les concentrations urinaires et plasmatiques d'urée par dosage enzymatique avec le Kit BioMérieux (urea Kit S-1000, BioMérieux).

Nous avons procédé à différentes séparations afin d'isoler les fractions de protéines (P), d'acides aminés libres (AA), d'urée, d'ammoniaque (NH_4) et de lipides (Lip) au sein du contenu total des prélèvements (Figure 1A).

Nous avons séparé les fractions P et AA dans tous les échantillons de tissus. Pour ce faire, les échantillons de tissus IG, foie, muscles TA et EDL, reins, peau, cœur, rate et RBC ont été broyés dans de l'azote liquide avec un mortier jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. La fraction P a été extraite par précipitation acide, par l'ajout d'acide sulfosalicylique (SSA) à 10% ($700\mu\text{l}/100\text{mg}$ de tissu broyé) et centrifugation (20min, 4°C , 10000 tours). Les surnageants ont été récupérés et transférés sur un filtre 3KDa puis centrifugés (2h, 4°C , 3820g) pour éliminer les peptides de taille inférieure à 3KDa, afin de récupérer dans le filtrat la fraction AA qui représente les acides aminés et quelques petits peptides. Les deux fractions P et AA ont ensuite été lyophilisées, et leur masse respective par unité de tissu frais a été quantifiée.

Dans les tissus adipeux, nous avons séparé les fractions Lip, P et AA. Les échantillons de TAE et TASC ont été broyés au Thurax (broyeur à tige), après ajout d'1 mL/échantillon de NaCl à 9g/L, puis centrifugés (20min, 2°C , 2000 tours) afin de séparer la fraction hydrosoluble (le sous-nageant contenant les fractions P et AA) et la fraction Lip (surnageant) qui a été conservée au congélateur à -20°C . Les fractions P et AA contenues dans le sous-nageant ont été séparées par précipitation acide par ajout de $700\mu\text{l}$ de SSA à 100% et centrifugation (20min, 4°C , 10000 tours). Ces deux fractions ont été lyophilisées, et leur masse respective par unité de tissu frais quantifiée.

Dans les échantillons de plasma, nous avons séparé les fractions P, AA et urée. L'extraction des deux premières fractions a été opérée par précipitation acide, et l'urée a été isolée par des résines échangeuses de cations Na^+ . Le contenu protéique du plasma (fraction P) a été isolé par précipitation au SSA à 100% ($100\mu\text{l}$) et centrifugation (20min, 2°C , 2000 tours). Après précipitation, la partie surnageante soluble contenant l'azote sous forme non protéique (fraction AA) a été transférée sur un filtre 3KDa puis centrifugée (2h, 4°C , 3820g), afin d'éliminer les peptides. Le filtrat (contenant les fractions AA et urée) a été neutralisé ($\text{pH}=7$) avec du NaOH et déposé sur une résine échangeuse de cations sous forme Na^+ , en présence d'uréase ($10\mu\text{l}$) pour hydrolyser l'urée (2h sur roue, 37°C à l'étuve) et récupérer les ions ammonium libérés sur la résine Na^+ . Le surnageant contenant la fraction AA a été récupérée, acidifiée ($180\mu\text{l}$ HCl) pour que les AA soient sous forme cationique, et les AA ont ensuite été extraits sur résine H^+ . Les deux résines Na^+ et H^+ ont été mises à sécher à l'étuve (50°C , 24h), et la fraction P a été lyophilisée.

Dans les urines prélevées dans la vessie, nous avons séparé les fractions NH_4 et urée. Chaque échantillon a été placé sur une première résine échangeuse de cations Na^+ pour fixer les ions ammonium urinaires (NH_4^+). Le surnageant contenant l'urée urinaire a été prélevé et transféré sur une deuxième résine Na^+ en

présence d'uréase (2h sur roue, 37°C à l'étuve) afin de récupérer les ions NH_4^+ issus de l'hydrolyse de l'urée. Les deux résines contenant ammonium et urée ont été séchées à l'étuve.

Les échantillons des contenus du côlon et caecum ont été lyophilisés.

Détermination des teneurs en N et C et des enrichissements isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$

Grâce à un analyseur élémentaire (EA) couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS), nous avons mesuré les teneurs (%N et %C) et les enrichissements isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$) en azote et en carbone dans les échantillons préalablement préparés et traités. La calibration du système a été opérée en utilisant un même standard pour l'EA et l'IRMS, la tyrosine, dont on connaît à la fois les teneurs (%N, 7,73 ; %C, 59,67) et les enrichissements ($\delta^{15}\text{N}$, 10‰ ; $\delta^{13}\text{C}$, -23,2‰) en azote et carbone. Les échantillons solides (échantillons lyophilisés, dans le cas des contenus intestinaux et des fractions P et AA des tissus, ou résines sèches, dans le cas des fractions urée et NH_4) ont été dosés dans des capsules souples en étain. Les urines de la vessie et les fractions Lip qui n'étaient pas solides ont d'abord été déposées sur du chromosorbe (une molécule inerte, dioxyde de silicone, qui ne contient ni carbone ni azote) afin de pouvoir les doser sous forme solide.

Comme présenté en **Figure 1B**, nous avons ainsi dosé les %N et $\delta^{15}\text{N}$ (i) des fractions P du sang et des tissus (IG, foie, muscles TA et EDL, reins, peau, cœur, rate, TASC, TAE, plasma, RBC), (ii) des fractions AA du sang et des tissus (sauf RBC, TAE et TASC, où les quantités étaient insuffisantes pour assurer une détermination fiable), (iii) du bulk des contenus intestinaux (colon et caecum), et (iv) du bulk et des fractions urée et NH_4 de l'urine. Nous avons également dosé les %C et $\delta^{13}\text{C}$ (i) des fractions P du sang et des tissus (IG, foie, muscles TA et EDL, reins, peau, cœur, rate, TASC, TAE, plasma, RBC), (ii) des fractions Lip des tissus adipeux (TAE et TASC), (iii) du bulk des contenus intestinaux (colon et caecum), et (iv) du bulk de l'urine. Nous n'avons pas mesuré les $\delta^{13}\text{C}$ des fractions AA, car la précipitation acide au SSA perturbe les enrichissements naturels en $\delta^{13}\text{C}$ dans cette fraction.

Calculs et Analyses statistiques

Calculs

Les tailles en azote (N, en g ou mol d'azote) et en carbone (C, en g ou mol de carbone) des différents pools échantillonnés ont été calculées à partir des teneurs en azote et carbone et des mesures de masse des pools avant et après lyophilisation :

$$N(\text{g}) = N_t \times m_{\text{tissu}} \text{ avec } N_t(\text{gN/g de tissu}) = (\%N/100) \times (m_{\text{ES}}/m_{\text{E}}), \text{ et } N(\text{mmol}) = 1000 \times N(\text{g}) / 14$$

$$C(\text{g}) = C_t \times m_{\text{tissu}} \text{ avec } C_t(\text{gC/g de tissu}) = (\%C/100) \times (m_{\text{ES}}/m_{\text{E}}), \text{ et } C(\text{mmol}) = 1000 \times C(\text{g}) / 12$$

Où %N et %C sont les teneurs en azote et carbone du pool mesurées en EA-IRMS (%), m_{ES} la masse de l'échantillon sec après lyophilisation (g), m_{E} la masse de l'échantillon avant lyophilisation (g), et m_{tissu} la masse du tissu considéré qui est pesée lors de l'abattage ou estimée (g). La masse de l'intestin n'ayant pas été pesée, elle a été estimée à 1,1 % du poids du rat, d'après des données préalables du laboratoire.

Les valeurs d'enrichissements isotopiques en azote et en carbone ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$, en ‰) ont été mesurées directement en EA-IRMS selon les formules suivantes :

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = [((^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{échantillon}} / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}}) - 1] \times 1000, \text{ avec } (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{standard}} = 0.00367 \text{ (air)}$$

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = [((^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{échantillon}} / (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}}) - 1] \times 1000, \text{ avec } (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{standard}} = 0.011123 \text{ (PeeDee Belemnite)}$$

Analyses statistiques

Différents tests statistiques ont été réalisés pour analyser les données obtenues. Nous avons d'abord testé, pour l'ensemble des rats des deux groupes, l'existence de corrélations entre une valeur isotopique donnée (c'est-à-dire le $\delta^{15}\text{N}$ ou $\delta^{13}\text{C}$ mesuré dans un pool spécifique) et différents paramètres biochimiques (insulinémie, triglycéridémie et glycémie), de composition corporelle (Poids, Masse Maigre, Masse Grasse, % Masse Grasse, TAE, % TAE...) et de consommation alimentaire (consommation absolue, consommation relative et efficacité de rétention alimentaire), à l'aide de Proc REG sous SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). De plus, pour analyser l'effet du groupe sur une signature isotopique donnée, les valeurs des groupes SM et T ont été comparées par des tests de Student (tests t), soit non sécurisés (non ajustés pour l'erreur globale de type 1), soit après ajustement de Bonferonni pour tenir compte du nombre global de comparaisons (Jouan-Flahault *et al.* 2004). Pour analyser l'effet du groupe sur une combinaison de différentes signatures isotopiques, nous avons également testé les effets globaux du groupe (SM vs T), du pool (foie vs muscle etc...) et de leur interaction (groupe*pool) sur ces combinaisons de signatures (Proc GLM sous SAS). Enfin, nous avons également procédé à des analyses factorielles discriminantes afin d'évaluer la capacité de différentes combinaisons de signatures isotopiques à discriminer les rats des deux groupes, et d'identifier les signatures qui distinguent le plus les deux groupes. Ces analyses factorielles discriminantes ont été menées en enchaînant des Proc STEPDISC et DISCRIM sous SAS avec validation croisée, en menant l'analyse sur un sous-ensemble représentatif des 20 rats (en sélectionnant 8 rats de chaque groupe), puis en la testant ensuite sur un échantillon indépendant (2 rats restants de chaque groupe), et ce 5 fois de suite pour généraliser les résultats (c.-à-d. pour 5 tirages aléatoires de la partition de 8 rats sur 10 par groupe).

RÉSULTATS

Caractéristiques des rats sélectionnés

Composition corporelle et paramètres biochimiques plasmatiques à la fin de l'adaptation au régime

Au sein des 60 rats soumis au régime gras et sucré potentiellement obésogène, nous avons sélectionnés à l'issue des dix semaines d'adaptation au régime un groupe de 10 rats restés relativement minces et insulino-sensibles (groupe T) et un groupe de 10 rats particulièrement gros et ayant développé une insulino-résistance (groupe SM). Les caractéristiques des rats sélectionnés à l'issue de la période d'adaptation sont présentées dans le **Tableau 2**.

Par rapport aux rats du groupe T, les rats obèses du groupe SM ont une insulinémie dix fois supérieure ($P < 0,001$). La triglycéridémie est elle aussi plus élevée chez les rats obèses ($P < 0,01$), mais la glycémie ne varie pas entre les deux groupes.

La composition corporelle absolue (en g) et relative (en g/100 g de poids corporel) des rats mesurée au moment des sacrifices est détaillée dans les **Figures 2A, 2B et 2C** qui détaillent respectivement les masses absolues et relatives des organes, et les teneurs absolues et relatives des P et

des AA libres tissulaires et plasmatiques. Par rapport aux rats du groupe T, les rats du groupe SM ont des masses absolues (Figure 2A1) plus importantes de carcasse ($P<0,01$), de tissu adipeux total ($P<0,01$), de TAE ($P<0,01$), de TA périrénal ($P<0,01$), de TASC ($P<0,01$), de peau plus poils ($P<0,01$), de foie ($P<0,01$), de reins ($P<0,01$), de rate ($P<0,05$), de muscles EDL ($P<0,01$) et TA ($P<0,05$) et de cœur ($P<0,01$). Au contraire, en valeur relative (Figure 2A2), les rats obèses ont moins de masse maigre, avec en particulier moins de carcasse ($P<0,01$), de muscles EDL ($P<0,01$) et TA ($P<0,05$) et de cœur ($P<0,05$), tandis qu'ils ont plus de tissu adipeux total ($P<0,01$), avec plus de TAE ($P<0,01$), de TA périrénal ($P<0,01$) et de TASC ($P<0,01$). En ce qui concerne spécifiquement les teneurs corporelles en P, par rapport aux rats du groupe T, les rats du groupe SM ont des masses absolues de P (Figure 2B1) plus importantes dans l'IG ($P<0,01$), le foie ($P<0,05$), le plasma ($P<0,01$), les RBC ($P<0,01$), les muscles TA ($P<0,05$) et EDL ($P<0,01$) et totaux ($P<0,01$), le cœur ($P<0,01$), les reins ($P<0,05$), les TASC ($P<0,01$) et le TAE ($P<0,01$). Au contraire, les teneurs relatives en P (Figure 2B2) sont similaires entre groupes dans le plasma et la plupart des tissus, à part dans le muscle TA où elle est inférieure ($P<0,05$) et dans le TASC où elle est supérieure ($P<0,05$) dans le groupe SM vs T. En ce qui concerne spécifiquement les teneurs corporelles en AA libres, par rapport aux rats du groupe T, les rats du groupe SM ont des masses absolues d'AA (Figure 2C1) plus importantes dans le plasma ($P<0,01$), le foie ($P<0,01$), les muscles EDL ($P<0,01$) et totaux ($P<0,01$) et le cœur ($P<0,05$), tandis que les teneurs relatives en AA (Figure 2C2) sont similaires entre groupes dans le plasma et tous les tissus.

Évolution du poids et de la consommation alimentaire lors de l'adaptation au régime

L'évolution du poids des animaux durant la période d'adaptation est représentée dans la **Figure 3A**. On constate que les rats du groupe SM prennent plus de poids que ceux du groupe T ($P<0,0001$) dès la deuxième semaine et pendant toute la période d'adaptation au régime.

La consommation alimentaire des deux groupes de rats au long de la période d'adaptation est représentée dans la Figure 3, exprimée en valeur absolue (**Figure 3B**) et relative (**Figure 3C**). La consommation alimentaire absolue (Figure 3B) est significativement supérieure dans le groupe SM vs T ($P<0,0001$) et tend à décroître avec le temps dans les deux groupes ($P<0,05$). En valeur relative (Figure 3C), il n'y a pas de différence significative de consommation alimentaire entre les deux groupes, mais celle-ci baisse dans le temps dans les deux groupes ($P<0,0001$). L'efficacité de la rétention alimentaire (calculée en rapportant le gain de poids à la consommation alimentaire sur chaque période de deux semaines) est représentée dans la **Figure 3D** : elle est significativement plus grande dans le groupe SM vs T pendant les quatre premières semaines d'adaptation au régime ($P<0,0001$), puis similaire entre groupes tandis qu'elle diminue avec le temps dans les deux groupes ($P<0,0001$).

Abondances isotopiques naturelles des rats des groupes SM et T sélectionnés à l'issue de l'adaptation au régime

$\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des protéines corporelles

Les abondances isotopiques naturelles en azote ($\delta^{15}\text{N}$) et carbone ($\delta^{13}\text{C}$) mesurées dans les P corporelles des rats des groupes SM et T sont présentées en **Figure 4**. Les $\Delta^{15}\text{N}$ ($\Delta^{13}\text{C}$) des P corporelles,

c'est-à-dire la différence entre le $\delta^{15}\text{N}$ ($\delta^{13}\text{C}$) des P corporelles et le $\delta^{15}\text{N}$ ($\delta^{13}\text{C}$) du régime, sont présentés dans la **Figure 6**.

Pour l'azote, par rapport aux rats du groupe T, les rats du groupe SM ont des $\delta^{15}\text{N}$ supérieurs dans les P de l'intestin ($P<0,01$) et du TAE ($P<0,05$), et des $\delta^{15}\text{N}$ inférieurs dans les P du muscle TA ($P<0,01$), du cœur ($P<0,05$), et du plasma ($P<0,05$). On observe également une tendance chez les rats du groupe SM à avoir des $\delta^{15}\text{N}$ supérieurs dans les P du foie ($P<0,1$). Pour le carbone, par rapport aux rats du groupe T, les rats du groupe SM ont des $\delta^{13}\text{C}$ inférieurs dans les P du foie ($P<0,01$) et des $\delta^{13}\text{C}$ supérieurs dans les P du cœur ($P<0,01$). En outre, il y a une tendance ($P<0,1$) chez les rats du groupe SM à avoir des $\delta^{13}\text{C}$ inférieurs dans les P des RBC et du plasma par rapport aux rats du groupe T.

Quelque soit le groupe, les P corporelles sont toutes plus enrichies en ^{15}N que le régime ($\Delta^{15}\text{N}$ positifs), avec des $\Delta^{15}\text{N}$ qui s'échelonnent entre 2,3‰ et 5,1‰ (Figure 6), et la plupart des P corporelles sont également plus enrichies en ^{13}C que le régime ($\Delta^{13}\text{C}$ positifs), excepté celles de l'intestin et du foie, qui ont des $\delta^{13}\text{C}$ similaires à celui régime, et celles de la peau, qui ont un $\delta^{13}\text{C}$ inférieur à celui du régime. De plus, on observe d'importantes variations inter-tissulaires entre les $\delta^{15}\text{N}$ et les $\delta^{13}\text{C}$ des différentes P.

$\delta^{15}\text{N}$ des acides aminés corporels

Les $\delta^{15}\text{N}$ mesurés dans les AA corporels sont représentés dans la **Figure 5**, et leurs $\Delta^{15}\text{N}$ dans la Figure 6. Le seul effet significatif du groupe concerne les AA du muscle TA, qui ont un $\delta^{15}\text{N}$ plus faible chez les rats du groupe SM ($P<0,05$). Les $\delta^{13}\text{C}$ n'ont pas pu être déterminées dans les AA corporels, car le SSA utilisé pour les précipitations protéiques contient du C ayant un $\delta^{13}\text{C}$ spécifique, ce qui a induit une pollution significative du $\delta^{13}\text{C}$ des fractions AA (mais pas des fractions P, du fait des faibles quantités d'acide introduites).

Quelque soit le groupe, on observe d'importantes variations entre les $\delta^{15}\text{N}$ des AA des différents tissus, avec toutes les fractions d'AA étudiées qui sont plus enrichies en ^{15}N que le régime ($\Delta^{15}\text{N}$ positifs), hormis les AA des muscles TA et EDL qui sont appauvries par rapport au régime. On observe également des différences de valeurs isotopiques entre les deux fractions de protéines et d'AA d'un même tissu, avec des $\delta^{15}\text{N}$ supérieurs dans la fraction P dans tous les tissus, sauf dans la rate où c'est l'inverse (Figure 6).

$\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des pools d'excrétion et de désamination

Les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des pools d'excrétion et de désamination sont représentés dans la **Figure 7**, tandis que les $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ correspondants ainsi que ceux des lipides des tissus adipeux sont représentés dans la **Figure 8**. Les rats du groupe SM ont des $\delta^{15}\text{N}$ supérieurs dans les contenus caecaux par rapport aux rats du groupe T ($P<0,05$), et il n'y a pas d'autres différences pour les $\delta^{15}\text{N}$ ou les $\delta^{13}\text{C}$ entre les deux groupes. Quelque soit le groupe, le $\Delta^{15}\text{N}$ est négatif dans l'urée plasmatique, nul dans l'urée urinaire et l'urine totale, et positif dans les contenus du caecum et du colon. Au contraire, le $\Delta^{13}\text{C}$ est au positif dans l'urine totale et négatif dans les contenus du caecum et du colon.

Bilan des pools présentant des différences de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ entre groupes SM et T

La **Figure 9** montre une synthèse des pools présentant des différences de $\delta^{15}\text{N}$ et/ou de $\delta^{13}\text{C}$ entre les deux groupes (les valeurs correspondantes de $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ sont reportées en **Figure 10**). Pour l'ensemble des valeurs, soit de $\delta^{15}\text{N}$, soit de $\delta^{13}\text{C}$, présentées en Figure 9, les effets globaux du groupe, du pool et de leur interaction ont été testés (proc GLM sous SAS), ce qui a permis de montrer un effet significatif du groupe pour les $\delta^{13}\text{C}$ ($P < 0,0001$), du pool pour les $\delta^{15}\text{N}$ et les $\delta^{13}\text{C}$ ($P < 0,0001$), et de l'interaction groupe*pool pour les $\delta^{15}\text{N}$ et les $\delta^{13}\text{C}$ ($P < 0,0001$). L'effet global du pool sur les valeurs isotopiques est important, avec tous les pools significativement ($P < 0,01$) différents les uns des autres pour leurs valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ou de $\delta^{13}\text{C}$ (sauf les $\delta^{15}\text{N}$ des P du cœur et du foie, et les $\delta^{15}\text{N}$ des P du muscle TA et du TAE).

En outre, certains des pools protéiques dont les valeurs isotopiques sont présentées en Figure 9 sont particulièrement intéressants, car ils ont la particularité de présenter des différences entre groupes à la fois pour leur $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$. Ce sont les P du foie (avec des $\delta^{15}\text{N}$ supérieurs et des $\delta^{13}\text{C}$ inférieurs dans le groupe SM comparativement au groupe T), les P du cœur (avec des $\delta^{15}\text{N}$ inférieurs et des $\delta^{13}\text{C}$ supérieurs dans le groupe SM par rapport au groupe T) et les P du plasma (avec des $\delta^{15}\text{N}$ et des $\delta^{13}\text{C}$ inférieurs dans le groupe SM par rapport au groupe T). Sur l'ensemble combiné de ces trois pools protéiques, les effets globaux du groupe, du pool et de leur interaction sont significatifs ($P < 0,05$) pour chacune des variables $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ (proc MANOVA sous SAS).

Une fois les tests t sécurisés (ajustements de Bonferroni pour l'ensemble des comparaisons possibles, seuil α passant de 5% à moins de 0,3%), seules 3 abondances isotopiques diffèrent significativement entre groupes : les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin, $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie et $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur (Figures 9 et 10).

Capacité des abondances isotopiques naturelles à constituer des biomarqueurs de la composition corporelle et de l'insulinorésistance

Corrélations entre valeurs isotopiques et paramètres de composition corporelle et biochimiques

Comme reporté en **Tableau 3**, nous avons testé l'existence de corrélations, pour l'ensemble des rats des deux groupes, entre leurs valeurs isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ ou $\delta^{13}\text{C}$ et certains de leurs paramètres biochimiques, de composition corporelle et de consommation alimentaire qui varient entre groupes (proc REG sous SAS, qui fournit les coefficients de corrélation de Pearson, r). En général, la valeur isotopique ($\delta^{15}\text{N}$ ou $\delta^{13}\text{C}$) d'un pool n'était pas significativement corrélée à la taille de ce pool (N ou C), sauf les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin ($r = 0,53$; $P < 0,05$), et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie ($r = -0,51$; $P < 0,05$), du cœur ($r = 0,54$; $P < 0,05$) et des RBC ($r = -0,48$; $P < 0,05$). Par ailleurs, il est intéressant de noter que différentes valeurs isotopiques étaient significativement corrélées à l'insulinémie plasmatique, à savoir les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin ($r = 0,47$; $P < 0,05$), du cœur ($r = -0,45$; $P < 0,05$) et du plasma ($r = -0,54$; $P < 0,05$), et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie ($r = -0,59$; $P < 0,01$) et du cœur ($r = 0,45$; $P < 0,05$). Les valeurs isotopiques significativement corrélées à la triglycéridémie plasmatique étaient les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin ($r = 0,49$; $P < 0,05$), du muscle TA ($r = -0,57$; $P < 0,01$) et du TAE ($r = 0,59$; $P < 0,05$), et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur ($r = 0,51$, $P < 0,05$). Les valeurs isotopiques significativement corrélées au pourcentage de masse grasse étaient les $\delta^{15}\text{N}$ des P du muscle

TA ($r=-0.57$, $P<0.01$) et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie ($r=-0,63$; $P<0,01$) et du cœur ($r=0,50$; $P<0,05$). Dans la **Figure 11** sont représentées graphiquement les corrélations entre les différents paramètres biochimiques, de composition corporelle et de consommation alimentaires testés et trois abondances isotopiques particulières, le $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'IG, le $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur et le $\delta^{13}\text{C}$ des P hépatiques, qui sont les abondances isotopiques qui contribuent le plus à distinguer les groupes d'un point de vue isotopique, comme indiqué par les tests t sécurisés. Il est intéressant de noter que chacune de ces trois abondances isotopiques est bien corrélée aux différents paramètres biochimiques, de composition corporelle et de consommation alimentaires qui différencient les groupes.

Capacité des valeurs isotopiques à discriminer les rats des deux groupes

Nous avons également procédé sous SAS à des analyses factorielles discriminantes (AFD), à l'aide de l'enchaînement de procédures "STEPLDISC" et "DISCRIM", afin de tester quelles variables isotopiques permettent de distinguer les groupes et de caractériser le groupe auquel un rat appartient (SM vs T), pour rechercher des signatures isotopiques de l'état physiopathologique de l'animal. La méthodologie employée et les résultats obtenus sont représentés en **Figure 12**. Les résultats indiquent que les variables isotopiques qui discriminent le plus les groupes sont les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin, des P du foie et du contenu caecal, ainsi que les $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur, du foie et du TASC (groupes 1 et 2 des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ les plus discriminantes reportées en Figure 12). Ainsi, 100% des rats sont bien classés dans leur bon groupe d'appartenance sur la base de la combinaison de trois de ces variables seulement, à savoir les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur et du foie (variables du groupes 1 en Figure 12), qui sont justement les variables qui sont significativement différentes entre groupes sur la base des tests t sécurisés et qui sont bien significativement corrélées aux niveaux d'insuline, à la masse grasse et à l'efficacité de rétention alimentaire précoce des rats (voir Tableau 3). Comme représenté en **Figure 13**, les rats des deux groupes sont parfaitement séparés sur la base de la combinaison de leurs $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin et $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur et du foie, et la combinaison des $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin et des $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur permet déjà 95% de bon reclassement (seul 1 rat du groupe SM est mal reclassé par une AFD n'utilisant que ces deux variables isotopiques). Par contre, si on ne prend en compte que la combinaison des quatre variables isotopiques des P du sang ($\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des P plasmatiques et des RBC), qui sont facilement accessibles de manière non invasive, on commet 20% d'erreur de classement (2 rats de chaque groupe T et SM sont reclassés par erreur dans l'autre groupe). Si on rajoute à ces quatre variables deux autres variables facilement accessibles qui sont les $\delta^{13}\text{C}$ du contenu colique et de l'urine, l'erreur commise n'est plus que de 15% (1 rat du groupe T et 2 rats du groupe SM reclassés par erreur dans l'autre groupe).

DISCUSSION

Les $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ de certains pools peuvent traduire l'activité relative de différentes voies métaboliques dans l'organisme, et donc signer l'état nutritionnel ou physiopathologique particulier de l'individu. Ces signatures isotopiques en abondance naturelle commencent à peine à être exploitées en nutrition et physiopathologie (Mekota *et al.* 2006; Petzke *et al.* 2010). Cette étude est ainsi nouvelle dans

son approche, et est la première, à notre connaissance, à rechercher des signatures isotopiques naturelles dans ces conditions physiopathologiques particulières, à savoir un syndrome métabolique précoce associant obésité et insulino-résistance.

Afin d'étudier les dérégulations métaboliques liées à l'induction nutritionnelle précoce d'un syndrome métabolique, nous avons étudié deux groupes de rats ayant développé (groupe SM) ou non (groupe T) une obésité accompagnée d'une insulino-résistance après dix semaines d'adaptation à un régime hyperlipidique potentiellement obésogène. Quelque soit leur groupe, les rats ont pris du poids de façon croissante au cours de la période d'adaptation au régime (Figure 3A), avec néanmoins une diminution progressive de la prise alimentaire relative (Figure 3C) et de l'efficacité de rétention alimentaire (Figure 3D) à partir de la quatrième semaine d'adaptation, du fait du ralentissement de la croissance qui approche de son plateau. Par rapport aux rats T qui restent relativement minces, les rats SM, qui deviennent obèses, ne consomment pas plus en valeur relative (Figure 3C), mais leur prise de poids supérieure est associée à une plus grande efficacité alimentaire lors des 4 premières semaines (Figure 3D). L'obésité des rats du groupe SM n'est donc pas due à une hyperphagie mais bien à une spécificité métabolique consistant en une moindre capacité à dissiper l'énergie apportée par le régime hyperlipidique, qui est alors stockée. En outre, l'analyse de la composition corporelle mesurée au moment des sacrifices (Figure 2) montre que si les rats obèses ont plus de masse maigre et de muscles en quantités absolues, ils ont, en quantités relatives, une moindre proportion de masse maigre et une plus grande proportion de masse grasse (représentée par la proportion de tissus adipeux relativement au poids corporel), ce qui est en accord avec les données de la littérature (Caballero & Wurtman 1991; Chevalier *et al.* 2005; Gougeon *et al.* 2008; Guillet *et al.* 2009).

Nous avons mis en évidence des différences isotopiques entre groupes (Figures 9 et 10) dans de nombreux pools protéiques, que ce soit pour leurs valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ (P de l'intestin, du foie, du muscle TA, du cœur, du plasma et du TAE) ou de $\delta^{13}\text{C}$ (P du foie, du cœur, du plasma et des RBC), ainsi que dans un pool d'AA libres ($\delta^{15}\text{N}$ des AA du muscle TA), un pool de contenu intestinal ($\delta^{15}\text{N}$ du contenu total caecal), et un pool de lipides ($\delta^{13}\text{C}$ des lipides du TAE). Le fait qu'on observe davantage de différences isotopiques entre groupes dans les pools protéiques que dans les autres types de pools provient certainement de la moindre variabilité entre individus d'un même groupe (i.e., de la moindre variabilité inter-individuelle intra-groupe) des valeurs isotopiques observées dans les fractions protéiques que dans les autres fractions. Ceci a vraisemblablement une signification métabolique, mais peut également provenir d'une plus grande hétérogénéité de composition des fractions autres que protéiques, avec en particulier une séparation moins efficace des fractions AA qui, bien qu'ayant été filtrées (filtres de 3 kDa), ont pu être polluées par de petits peptides.

Les abondances isotopiques qui distinguent le plus les deux groupes ont été identifiées par une AFD : ce sont les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur et du foie, qui considérées ensemble permettent de reclasser correctement 100% des rats dans les groupes T et SM. L'analyse statistique de l'ensemble des données individuelles révèle que le $\delta^{15}\text{N}$ ou le $\delta^{13}\text{C}$ d'un pool n'est généralement pas significativement corrélé à la taille en N ou C de ce pool, alors que plusieurs $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ présentent des corrélations significatives avec l'insulinémie plasmatique (ce sont les $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'IG, du cœur et du

plasma, et les $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie et du cœur, Table 3). Ceci montre que les variations de $\delta^{15}\text{N}$ ou $\delta^{13}\text{C}$ entre groupes ne sont pas dues à des différences de tailles de pools mais sont bien liées aux effets métaboliques de l'insulinorésistance sur ces pools. En outre, les abondances isotopiques les plus significativement différentes entre groupes sont bien corrélées à l'insulinémie comme au pourcentage de masse grasse de chaque rat (Table 3), ce qui fait qu'on peut considérer qu'elles constituent des signatures ou biomarqueurs isotopiques de l'insulinorésistance associée à l'obésité. Il est intéressant de noter que le muscle TA présente des variations de $\delta^{15}\text{N}$ entre groupes dans chacune de ses fractions de P et d'AA, ce qui est cohérent avec les données de la littérature qui montrent que l'insulinorésistance affecte le métabolisme protéique au niveau musculaire (Boirie *et al.* 2005; Chevalier *et al.* 2005; Guillet *et al.* 2009; Guillet *et al.* 2011). A l'inverse il n'y a pas d'effet groupe sur les abondances isotopiques du muscle EDL, ce qui suggère que les différents types de muscles puissent être différemment affectés par l'insulino-résistance et l'obésité en raison de leurs spécificités métaboliques (les muscles TA et EDL contenant respectivement plutôt des fibres de type I et II), en accord avec des résultats récents de la littérature (Masgrau *et al.* 2012 ; Sanchez *et al.* 2011). De plus, les P du cœur montrent également des variations entre groupes à la fois pour leurs $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$, ce qui est cohérent avec la description d'altérations du métabolisme protéique et énergétique dans le myocarde au cours de l'insulinorésistance (Iliadis *et al.* 2011; Abel *et al.* 2012). Enfin, ce sont les P de l'intestin dont le $\delta^{15}\text{N}$ est le plus significativement affecté entre groupes, alors que très peu de données existent sur la modulation du métabolisme protéique intestinal lors de l'insulino-résistance (Duez *et al.* 2008; Hayashi *et al.* 2011; Pavlic *et al.* 2010).

Finalement, l'existence de ces signatures isotopiques $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ attestent de modulations du métabolisme protéino-énergétique lors de l'initiation précoce du syndrome métabolique. En particulier, alors qu'on méconnaît encore largement l'impact de l'insulino-résistance et de l'obésité sur les flux métaboliques d'AA et de P dans les tissus (Guillet *et al.* 2011), nos résultats mettent en évidence que différentes voies du métabolisme des P et des AA sont affectées dans l'IG, le foie, le cœur, le muscle TA et le TAE. Le fait que les $\delta^{15}\text{N}$ sont modulés avec des sens différents selon les tissus (chez les rats SM vs T, les $\delta^{15}\text{N}$ sont supérieurs dans les P de l'IG, du foie et du TAE, mais inférieurs dans les P du muscle TA, du cœur et du plasma), suggère que le métabolisme de ces tissus puisse être différemment affecté par l'insulinorésistance et le syndrome métabolique. En outre, l'écart entre les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et de $\delta^{13}\text{C}$ des groupes SM et T est quantitativement faible même quand il est significatif, ce qui s'explique probablement par le fait que ces faibles différences isotopiques traduisent des dérégulations relativement légères du métabolisme protéino-énergétique qui adviennent lors de l'instauration nutritionnelle précoce d'un syndrome métabolique. Il serait intéressant de vérifier si ces différences s'accroissent et concernent éventuellement davantage de pools lors de la progression vers des conditions plus établies de syndrome métabolique ou de diabète.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'utilisation des signatures isotopiques a permis d'identifier les pools où le métabolisme protéique est potentiellement modulé par l'insulinorésistance associée à l'obésité, les données disponibles dans la littérature à ce sujet étant rares et contradictoires. Parmi les pools dont les signatures sont modulées entre groupes, on retrouve certains pools protéiques musculaires comme le muscle TA et le cœur (mais pas le muscle EDL), ainsi que les pools splanchniques des P intestinales et hépatiques. Nos résultats étayent la thèse, encore controversée, selon laquelle le métabolisme protéique musculaire est modulé par l'insulinorésistance (Guillet *et al.* 2011), et apportent également de nouvelles données en l'absence d'études dans la littérature sur le lien entre métabolisme protéique splanchnique et insulino-résistance et/ou obésité.

La présente étude, novatrice dans son approche, nous a permis d'établir que les signatures isotopiques de certains pools sont des biomarqueurs des modulations métaboliques liées à l'insulinorésistance et à l'obésité. Ce travail descriptif démontre l'existence et l'utilité de ces biomarqueurs, mais ne nous permet pas d'identifier et de comprendre les mécanismes à l'œuvre et qui sous-tendent ces variations de signatures isotopiques naturelles. Pour cela, le recours à la modélisation compartimentale devrait permettre d'analyser ces signatures isotopiques pour en extraire l'information quantitative qu'elles contiennent quant aux flux inter- et intra-organes d'azote et de carbone qui leur ont donné naissance, afin d'identifier en particulier quelles sont les voies métaboliques qui sont altérées sous l'effet de l'insulino-résistance associée à l'obésité.

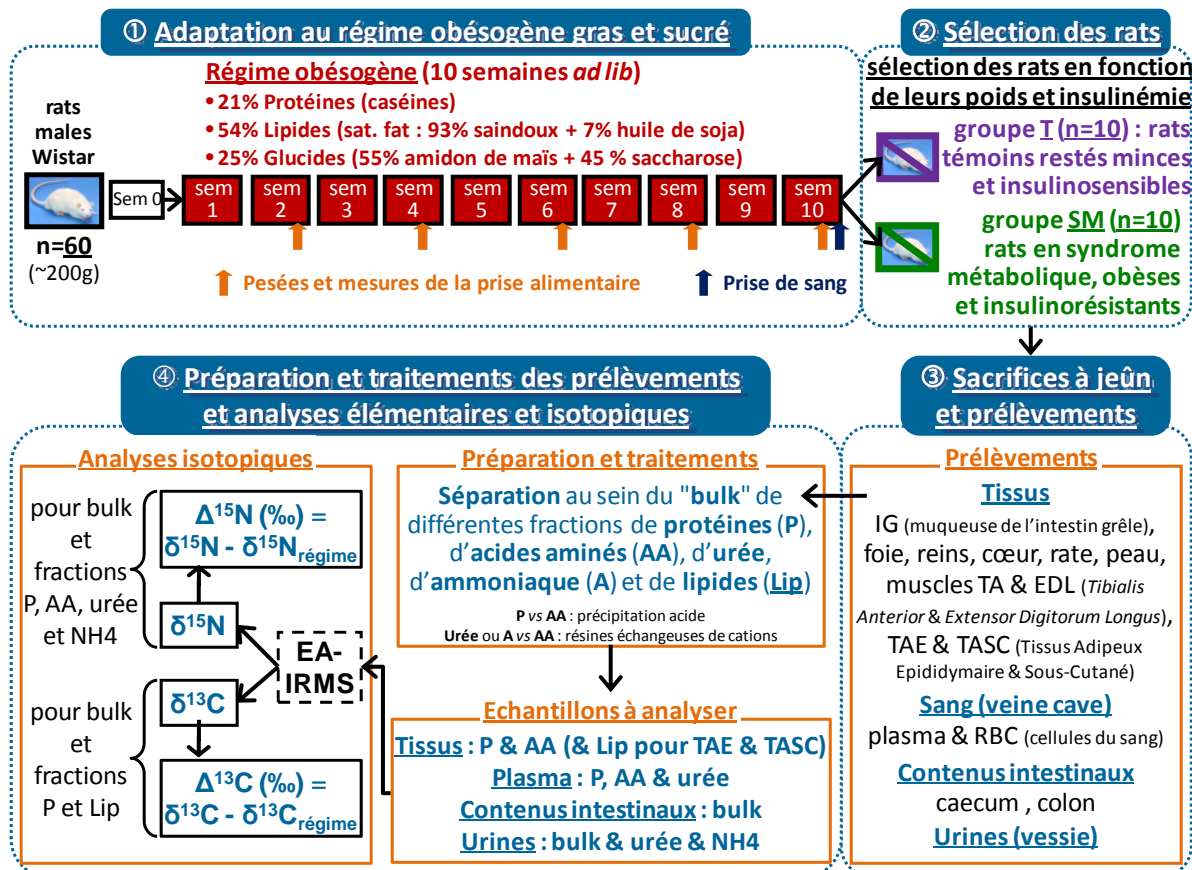
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel E.D., O'Shea K.M. and Ramasamy R. (2012). Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9): 2068-76.
- Alberti K.G., Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z., Cleeman J.I., Donato K.A., Fruchart J.C., James W.P., Loria C.M. and Smith S.C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16): 1640-5.
- Arneson L.S., MacAvoy S. and Basset E. (2006). Metabolic protein replacement drives tissue turnover in adult mice. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* 84(7): 992-1002.
- Boirie Y., Guillet C., Zangarelli A., Gryson C. and Walrand S. (2005). Deterioration of protein metabolism during ageing. *Nutrition clinique et métabolisme* 19: 138-142.
- Caballero B. and Wurtman R.J. (1991). Differential effects of insulin resistance on leucine and glucose kinetics in obesity. *Metabolism-Clinical and Experimental* 40(1): 51-58.
- Chevalier S., Marliss E.B., Morais J.A., Lamarche M. and Gougeon R. (2005). Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *Am J Clin Nutr* 82(2): 355-65.
- Dandona P., Aljada A., Chaudhuri A., Mohanty P. and Garg R. (2005). Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111(11): 1448-54.
- Duez H., Pavlic M. and Lewis G.F. (2008). Mechanism of intestinal lipoprotein overproduction in insulin resistant humans. *Atheroscler Suppl* 9(2): 33-8.
- Gougeon R., Morais J.A., Chevalier S., Pereira S., Lamarche M. and Marliss E.B. (2008). Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31(1): 128-33.
- Guillet C., Delcourt I., Rance M., Giraudet C., Walrand S., Bedu M., Duche P. and Boirie Y. (2009). Changes in Basal and Insulin and Amino Acid Response of Whole Body and Skeletal Muscle Proteins in Obese Men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94(8): 3044-3050.
- Guillet C., Masgrau A. and Boirie Y. (2011). Is protein metabolism changed with obesity? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 14(1): 89-92.
- Hayashi A.A., Webb J., Choi J., Baker C., Lino M., Trigatti B., Trajcevski K.E., Hawke T.J. and Adeli K. (2011). Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301(2): G326-37.
- Iliadis F., Kadoglou N. and Didangelos T. (2011). Insulin and the heart. *Diabetes Res Clin Pract* 93 Suppl 1: S86-91.
- Jouan-Flahault C., Casset-Semanaz F. and Minini P. (2004). [Multiplicity of inferences in clinical trials: adjustment methods, clinical interpretation issues]. *Med Sci (Paris)* 20(2): 231-5.
- Macko S.A., Estep M.L.F., Engel M.H. and Hare P.E. (1986). Kinetic fractionation of stable isotope nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 50(10): 2143-2146.
- Mariotti F., Hermier D., Sarrat C., Magne J., Fenart E., Evrard J., Tome D. and Huneau J.F. (2008). Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high-saturated fat, high-sucrose diet in rats. *Br J Nutr* 100(5): 984-91.
- Masgrau A., Mishellany-Dutour A., Murakami H., Beaufriere A.M., Walrand S., Giraudet C., Migne C., Gerbaix M., Metz L., Courteix D., Guillet C. and Boirie Y. (2012). Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *J Physiol* 590(Pt 20): 5199-210.
- Mekota A.M., Grupe G., Ufer S. and Cuntz U. (2006). Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20(10): 1604-1610.

- Pavlic M., Xiao C., Szeto L., Patterson B.W. and Lewis G.F. (2010). Insulin acutely inhibits intestinal lipoprotein secretion in humans in part by suppressing plasma free fatty acids. *Diabetes* 59(3): 580-7.
- Petzke K.J., Fuller B.T. and Metges C.C. (2010). Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13(5): 532-540.
- Poupin N., Bos C., Mariotti F., Huneau J.F., Tome D. and Fouillet H. (2011). The Nature of the Dietary Protein Impacts the Tissue-to-Diet N-15 Discrimination Factors in Laboratory Rats. *Plos One* 6(11).
- Sanchez O.A., Copenhaver E.A., Chance M.A., Fowler M.J., Towse T.F., Kent-Braun J.A. and Damon B.M. (2011). Postmaximal contraction blood volume responses are blunted in obese and type 2 diabetic subjects in a muscle-specific manner. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(2): H418-27.
- Sick H., Roos N., Saggau E., Haas K., Meyn V., Walch B. and Trugo N. (1997). Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. *Zeitschrift Fur Ernährungswissenschaft* 36(4): 340-346.

Figure 1 : Protocole expérimental et mesures isotopiques réalisées

A. Protocole



B. Mesures isotopiques

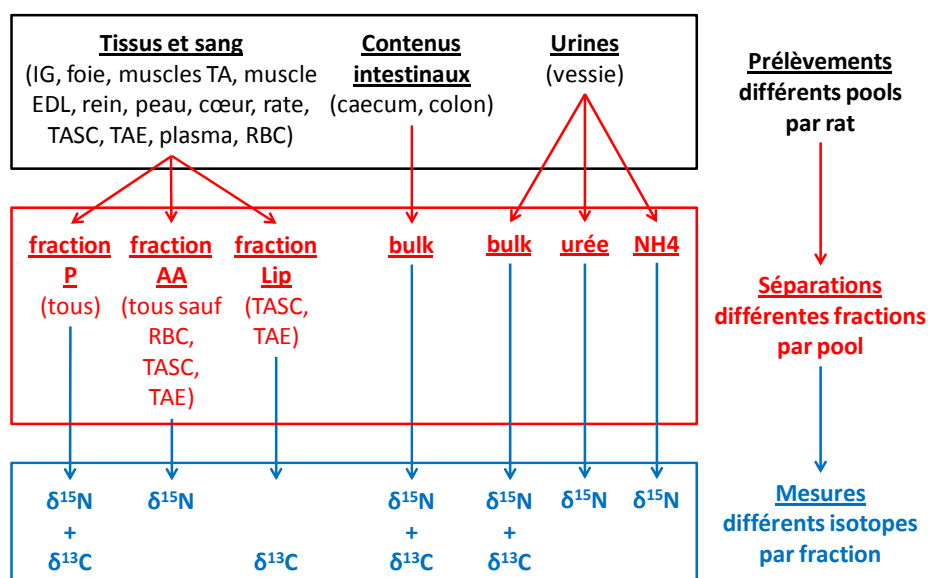


Tableau 1 : Composition du régime hypercalorique gras et sucré

	g/kg	% masse	cal/kg	% énergie
Caséine HCL	263,0	26,3	1 052	20,9
L-Cystine	3,5	0,4	14	0,3
Amidon de maïs	175,0	17,5	700	13,9
Saccharose	143,0	14,3	572	11,4
Saindoux	280,0	28,0	2 520	50,0
Huile de soja	20,0	2,0	180	3,6
AIN 93G Mineral mix	40,0	4,0		
AIN 93VX Vitamin mix	13,0	1,3		
Alpha-cellulose	60,0	6,0		
Choline	2,5	0,3		
Total	1 000,0	100,0	5 038	100,0
Protéines totales	266,5	26,7	1 066	21,2
Glucides totaux	318,0	31,8	1 272	25,2
Lipides totaux	300,0	30,0	2 700	53,6
Total	884,5	88,5	5 038	100,0

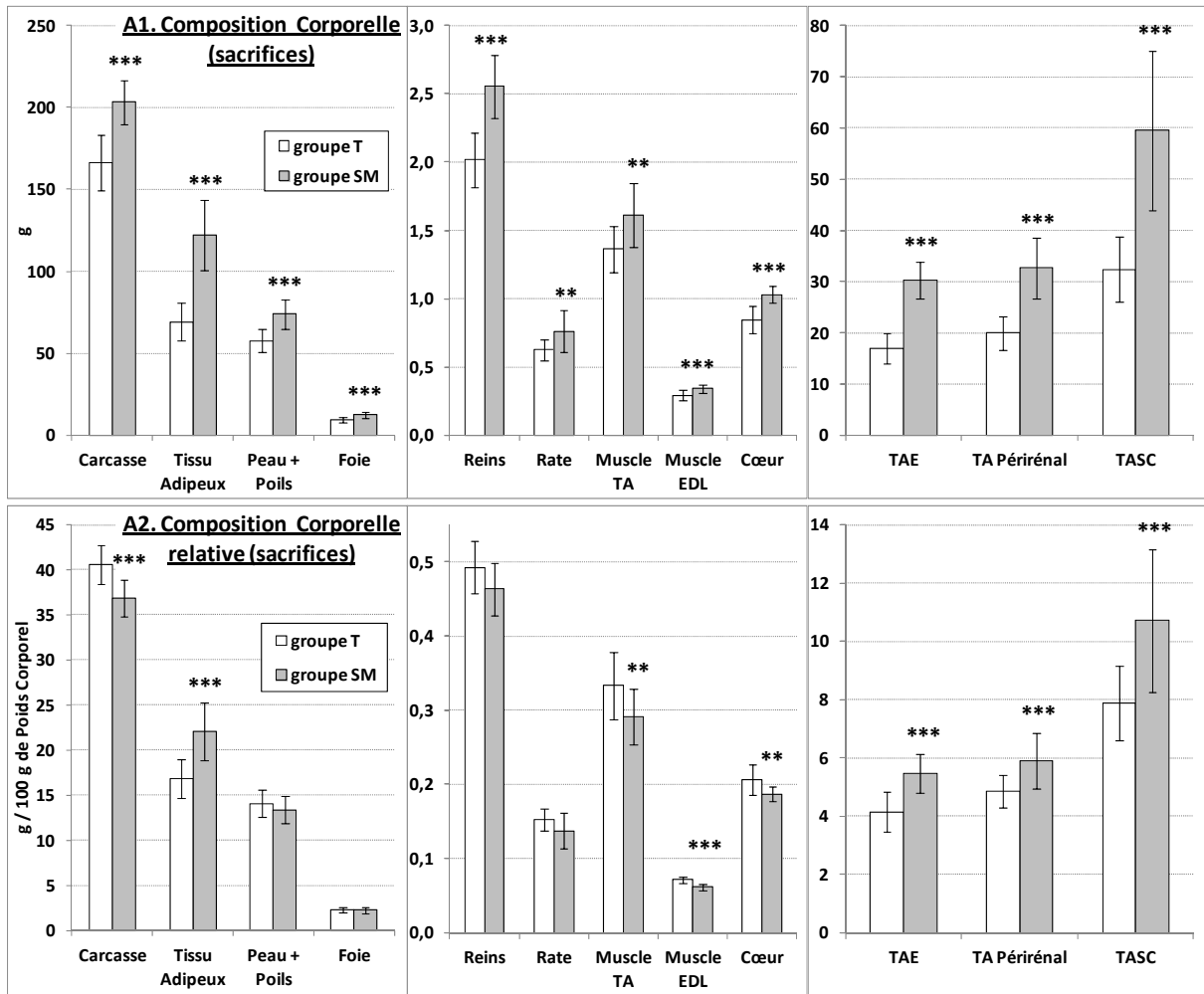
Tableau 2 : Caractéristiques des rats sélectionnés à la fin de l'adaptation au régime

	groupe T (n=10)	groupe SM (n=10)	SM vs T (test-t)
Poids vif (g)	410 ± 35	552 ± 26	x 1,3 (P<0,001)
Glycémie (mMol/L)	5,5 ± 0,6	6,0 ± 1,1	NS
Triglycéridémie (g/L)	0,56 ± 0,11	1,01 ± 0,45	x 1,8 (P<0,01)
Insulinémie (pMol/L)	24 ± 17	201 ± 118	x 8,2 (P<0,001)

Moyennes ± écart-types des caractéristiques des rats restés maigres et insulino-sensibles (groupe T, n=10) ou devenus obèses et insulino-résistants (groupe SM, n=10) après 10 semaines d'un régime obésogène gras et sucré.

NS : non significatif.

Figure 2A : Composition corporelle absolue (A1) et relative (A2) au moment des sacrifices masses des différents tissus

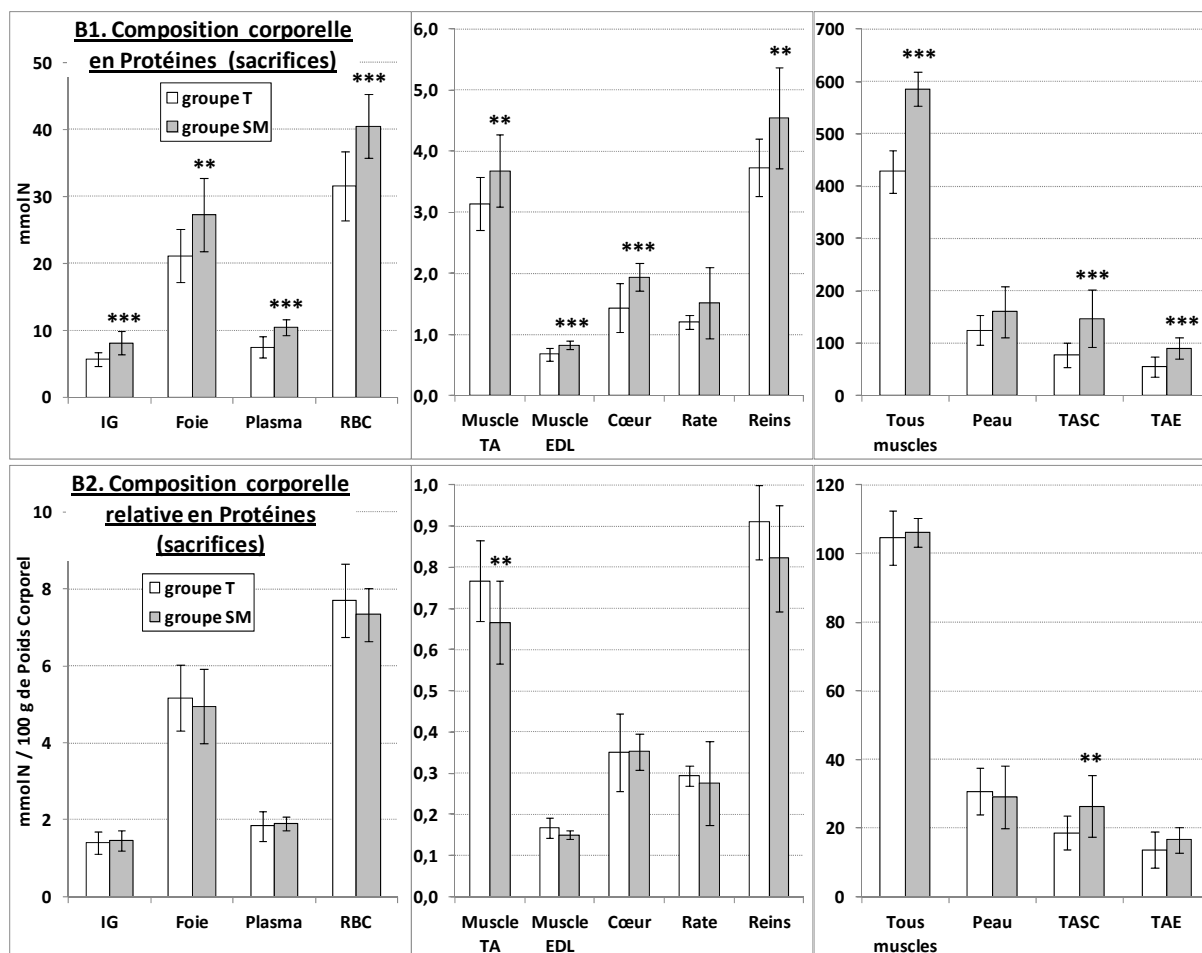


Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; Muscle EDL, Muscle *Extensor Digitorum Longus* ;
 TA, Tissu Adipeux ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; TASC Tissu Adipeux Sous-Cutané.

Moyennes ± écart-types de la composition corporelle absolue (g) et relative (g/100g de poids corporel) pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T) : *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ (test-t)

Figure 2B : Composition corporelle absolue (B1) et relative (B2) au moment des sacrifices : teneurs spécifiques en protéines tissulaires et plasmatiques

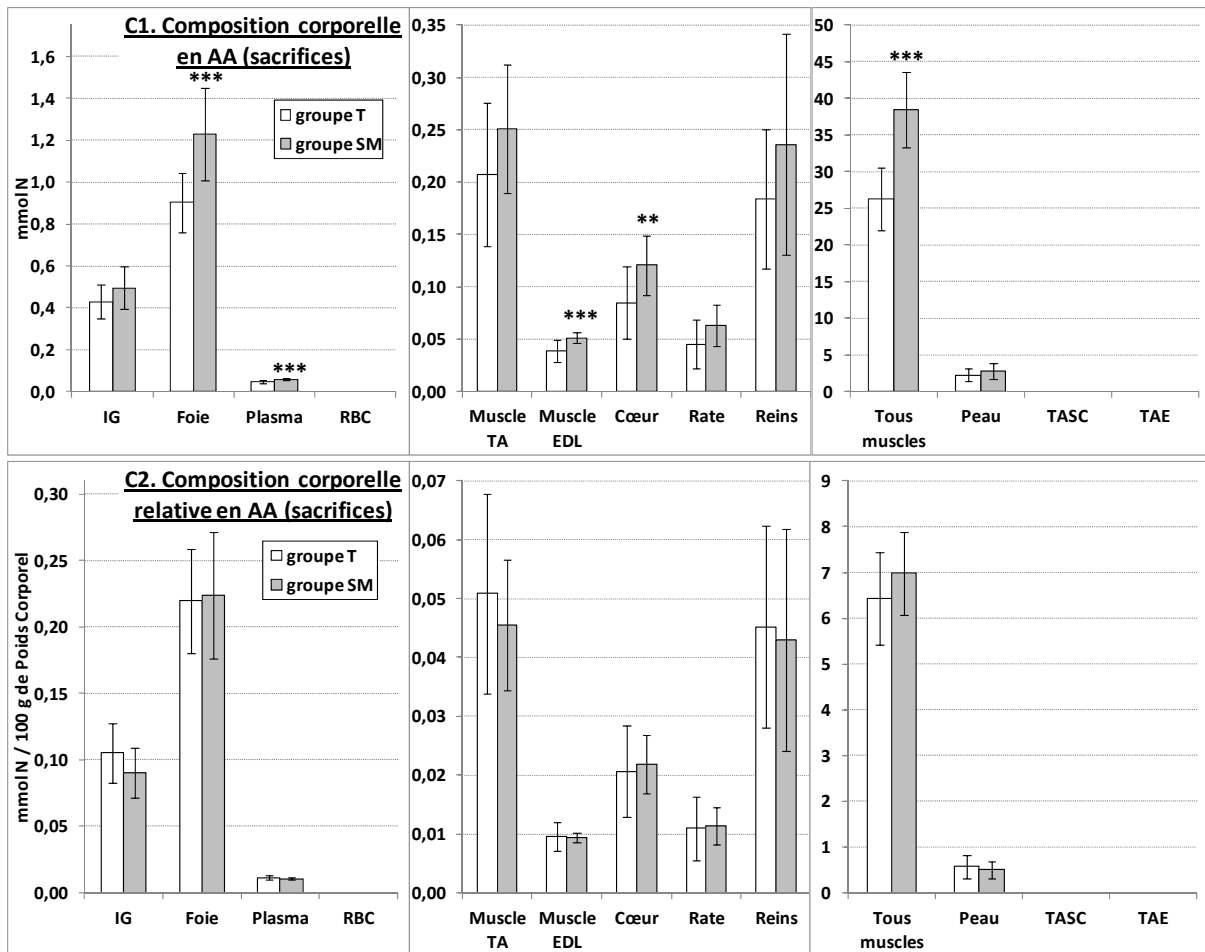


IG, muqueuse de l'intestin grêle ; RBC, cellules sanguines ; Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; Muscle EDL, Muscle *Extensor Digitorum Longus* ; TASC ; Tissu Adipeux Sous-Cutané ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire.

Moyennes ± écart-types de la composition corporelle absolue (mmol N) et relative (mmol N /100g de poids corporel) pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T) : *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ (test-t)

**Figure 2C : Composition corporelle absolue (C1) et relative (C2) au moment des sacrifices :
teneurs spécifiques en acides aminés libres tissulaires et plasmatiques**

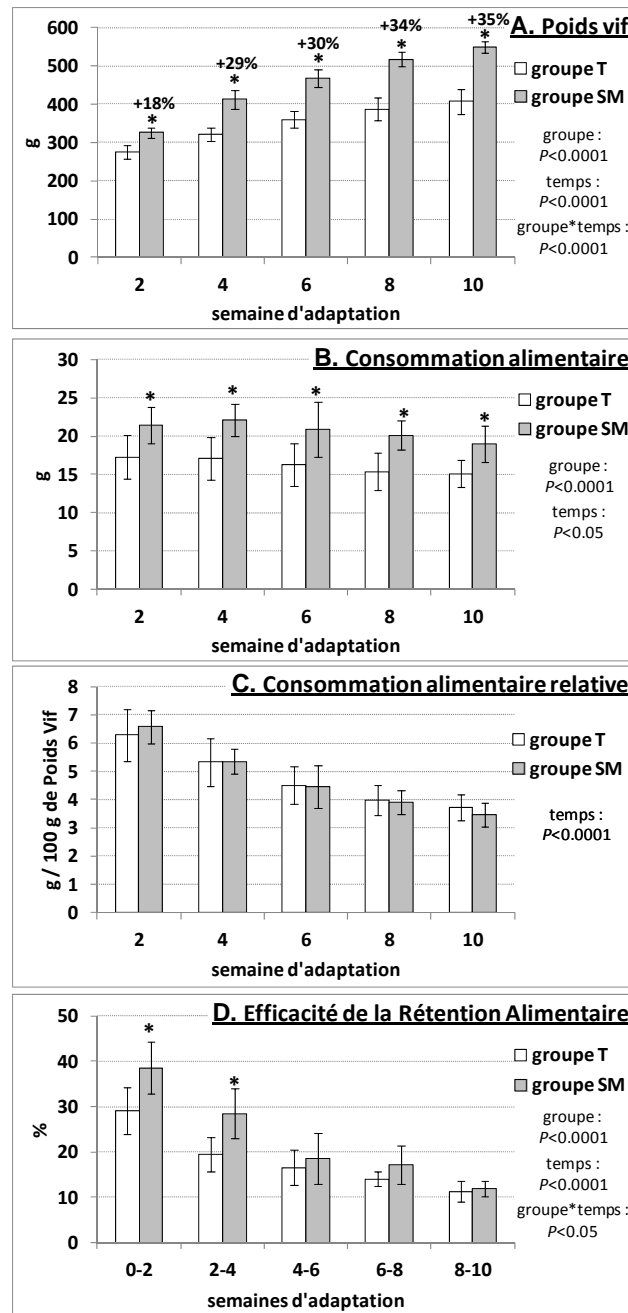


IG, muqueuse de l'intestin grêle ; RBC, cellules sanguines ; Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; Muscle EDL, Muscle *Extensor Digitorum Longus* TASC ; Tissu Adipeux Sous-Cutané ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire.

Moyennes \pm écart-types de la composition corporelle absolue (mmol N) et relative (mmol N /100g de poids corporel) pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T) : *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ (test-t)

Figure 3 : Évolution du poids (A), de la consommation alimentaire absolue (B) et relative (C) et de l'efficacité de la rétention alimentaire (D) des rats sélectionnés lors de l'adaptation au régime.

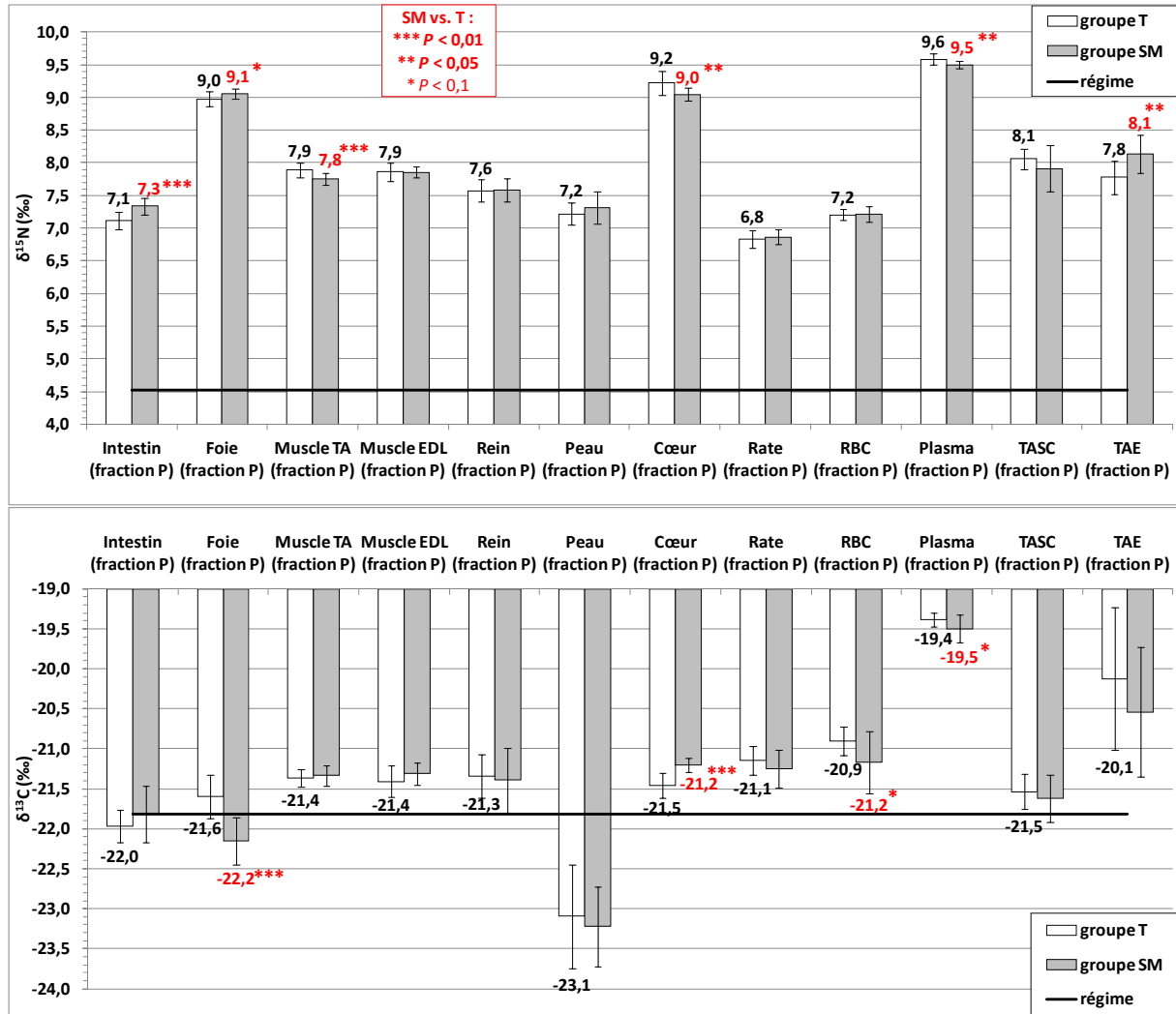


Moyennes ± écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

L'efficacité de la rétention alimentaire est calculée sur chaque période de deux semaines comme le gain de poids divisé par la consommation alimentaire sur cette période.

Pour chaque variable (poids, consommation et rétention alimentaire), les effets du groupe, du temps et de l'interaction groupe*temps ont été testées à l'aide d'un modèle mixte pour données répétées sous SAS. Différences entre groupes (SM vs T) à un temps donné : * $P < 0.01$.

Figure 4 : $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des protéines corporelles

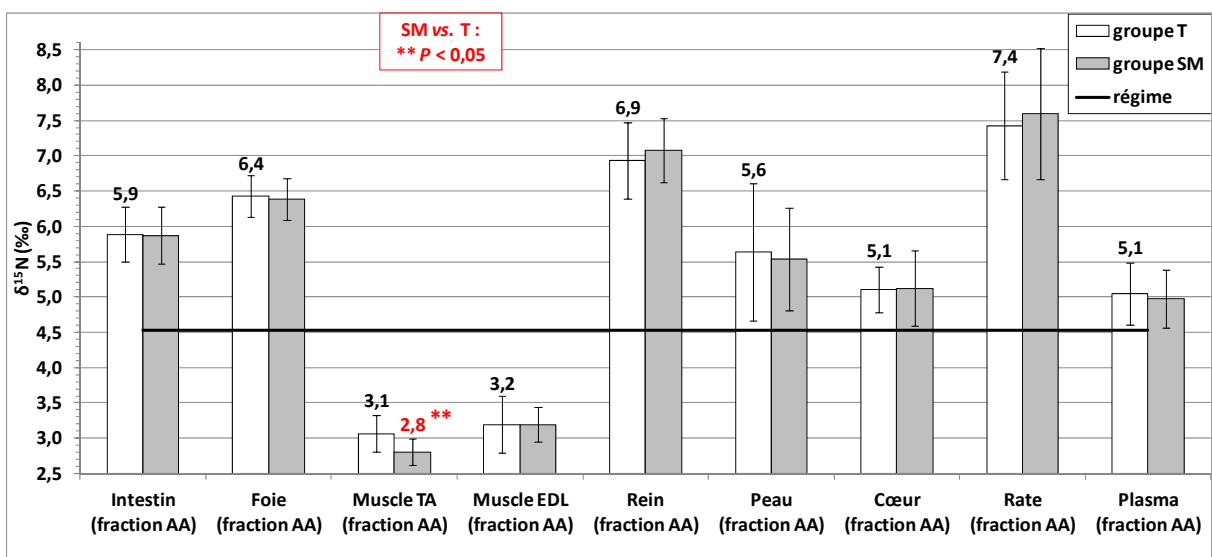


Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; Muscle EDL, Muscle *Extensor Digitorum Longus* ; RBC, cellules sanguines ; TASC, Tissu Adipeux Sous-Cutané ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; fraction P, fraction Protéique.

Moyennes \pm écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.1$.

Figure 5 : $\delta^{15}\text{N}$ des acides aminés corporels

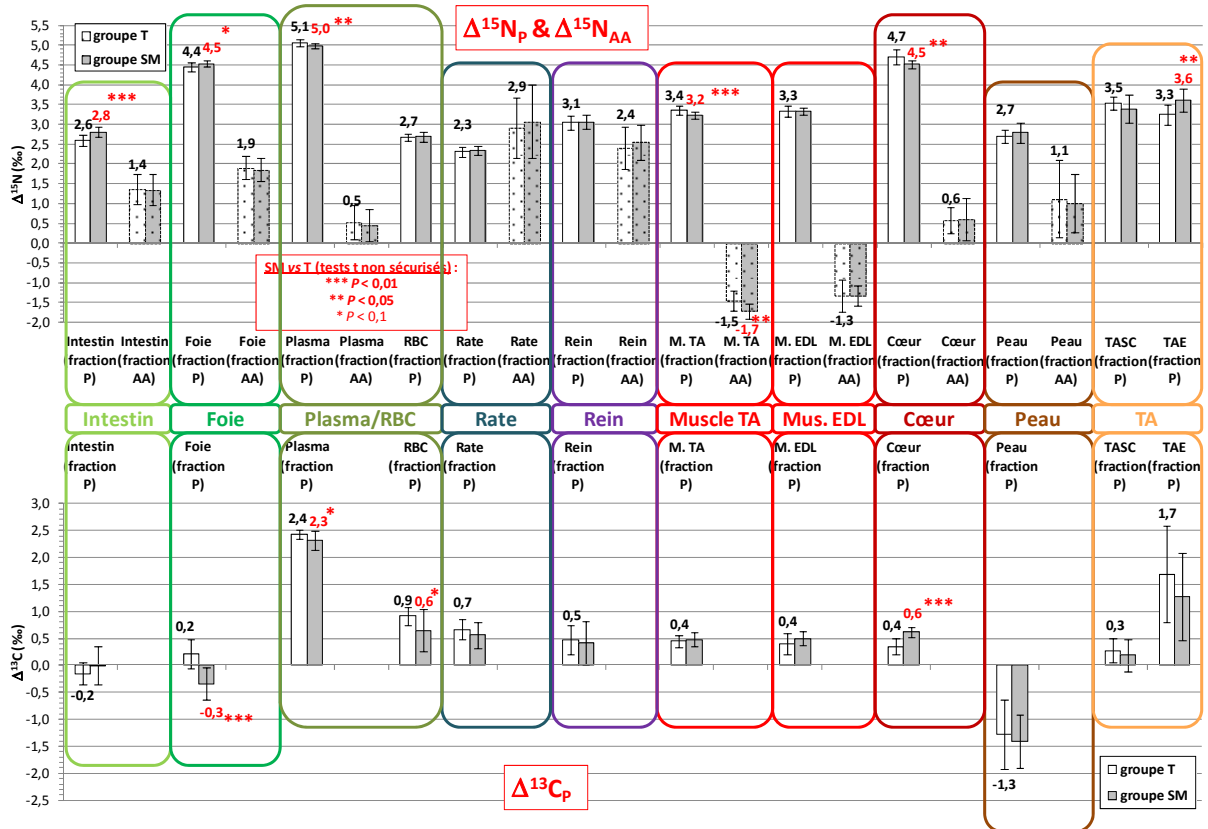


Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; Muscle EDL, Muscle *Extensor Digitorum Longus* ; fraction AA, fraction Acides Aminés.

Moyennes \pm écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : ** $P < 0.05$.

Figure 6 : $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ des protéines et des acides aminés corporels



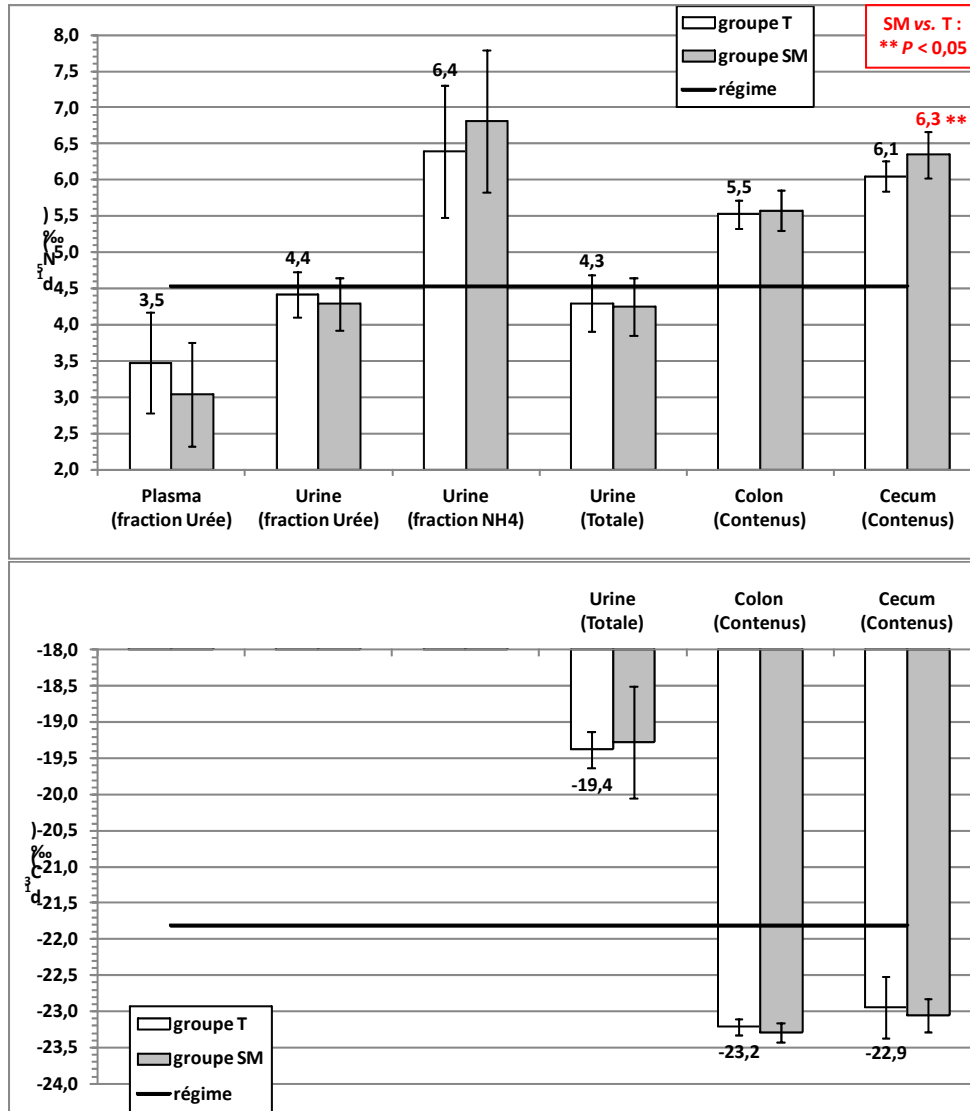
$$\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{pool}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{régime}} ; \Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{pool}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{régime}}$$

Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; Muscle EDL, Muscle *Extensor Digitorum Longus* ; RBC, cellules sanguines ; TASC, Tissu Adipeux Sous-Cutané ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; fraction P, fraction Protéique ; fraction AA, fraction Acides Aminés.

Moyennes ± écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : *** P < 0.01, ** P < 0.05, * P < 0.1.

Figure 7 : $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ des pools d'excrétion et de désamination

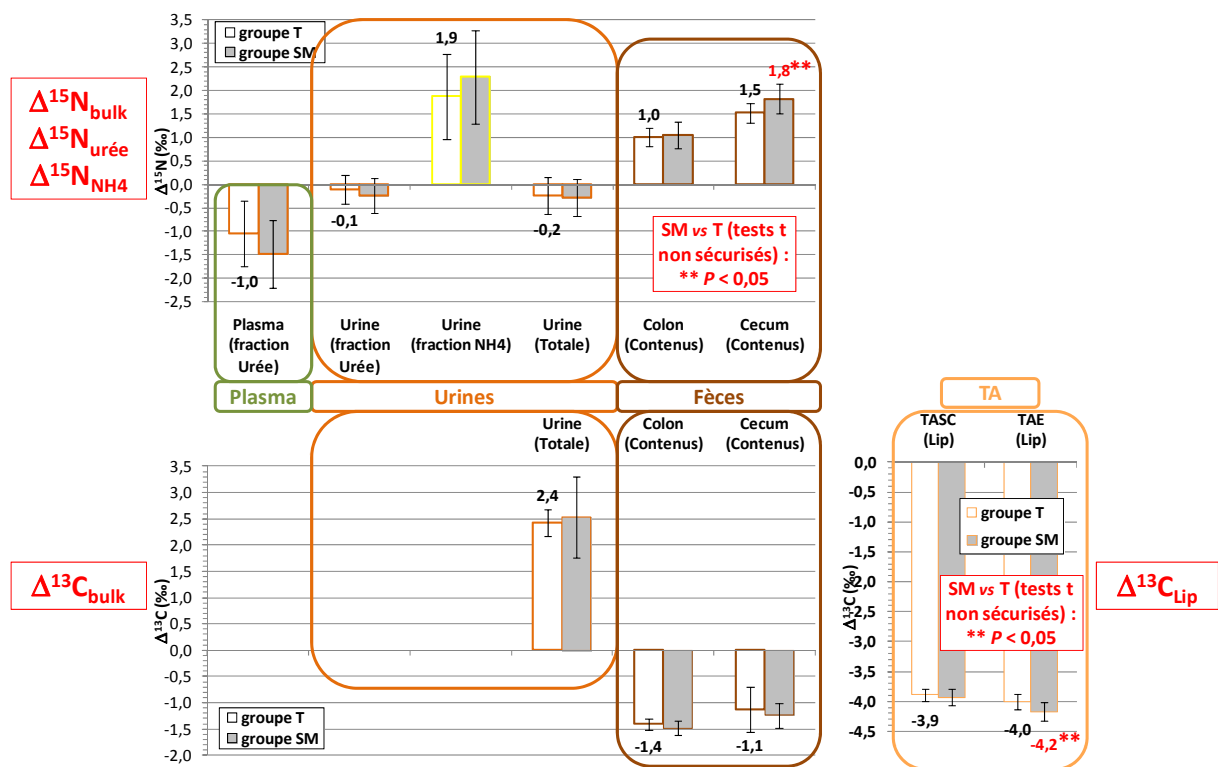


Fraction NH₄, fraction ammoniacale.

Moyennes \pm écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : ** $P < 0.05$.

Figure 8 : $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ des contenus intestinaux, des urines et des lipides des tissus adipeux



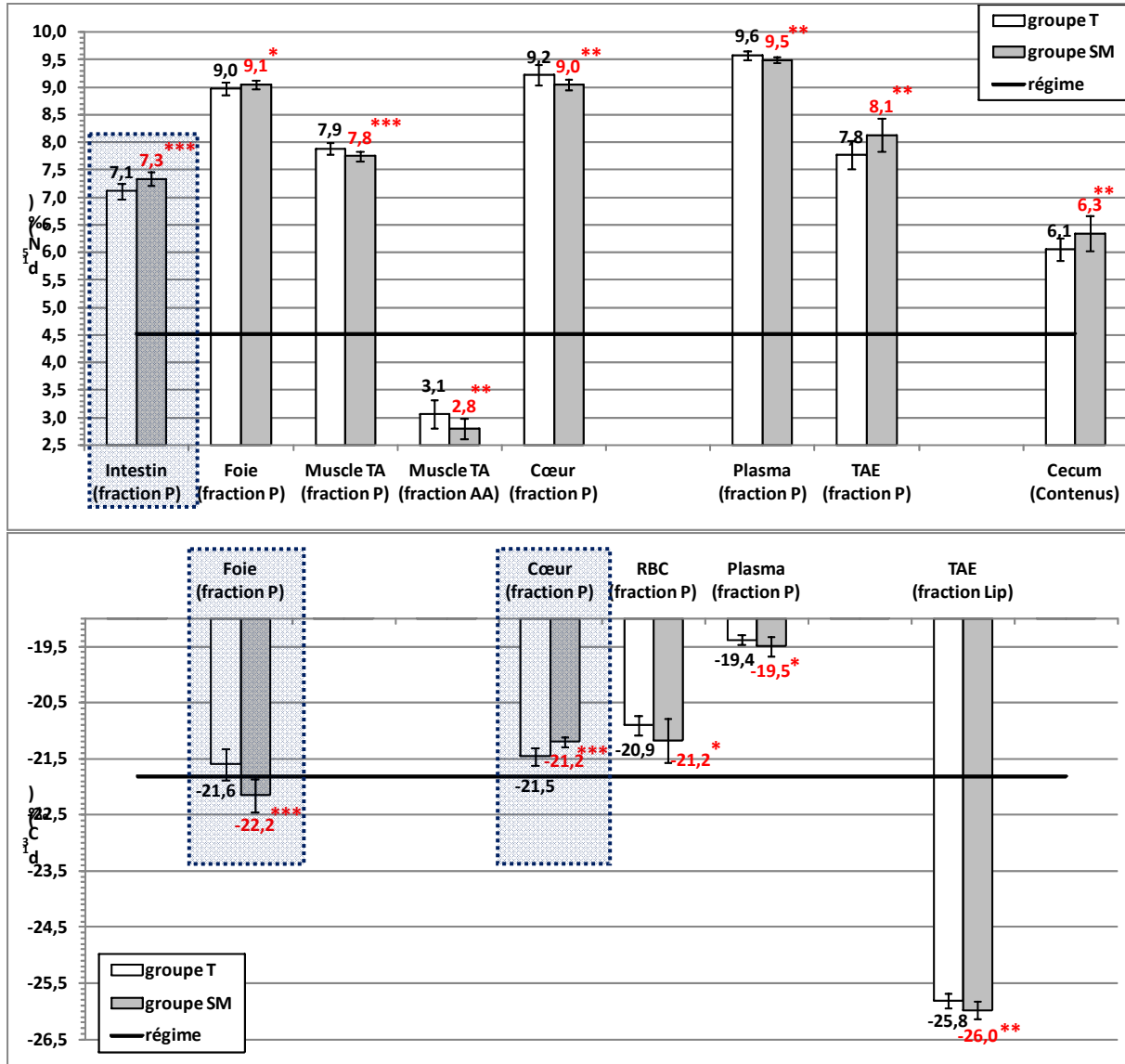
$$\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{pool}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{régime}} ; \Delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{pool}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{régime}}$$

TASC, Tissu Adipeux Sous-Cutané ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ;
NH4, fraction ammoniacque ; Lip, fraction lipidique.

Moyennes ± écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : ** P < 0.05.

Figure 9 : Bilan des pools présentant des différences de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ entre groupes



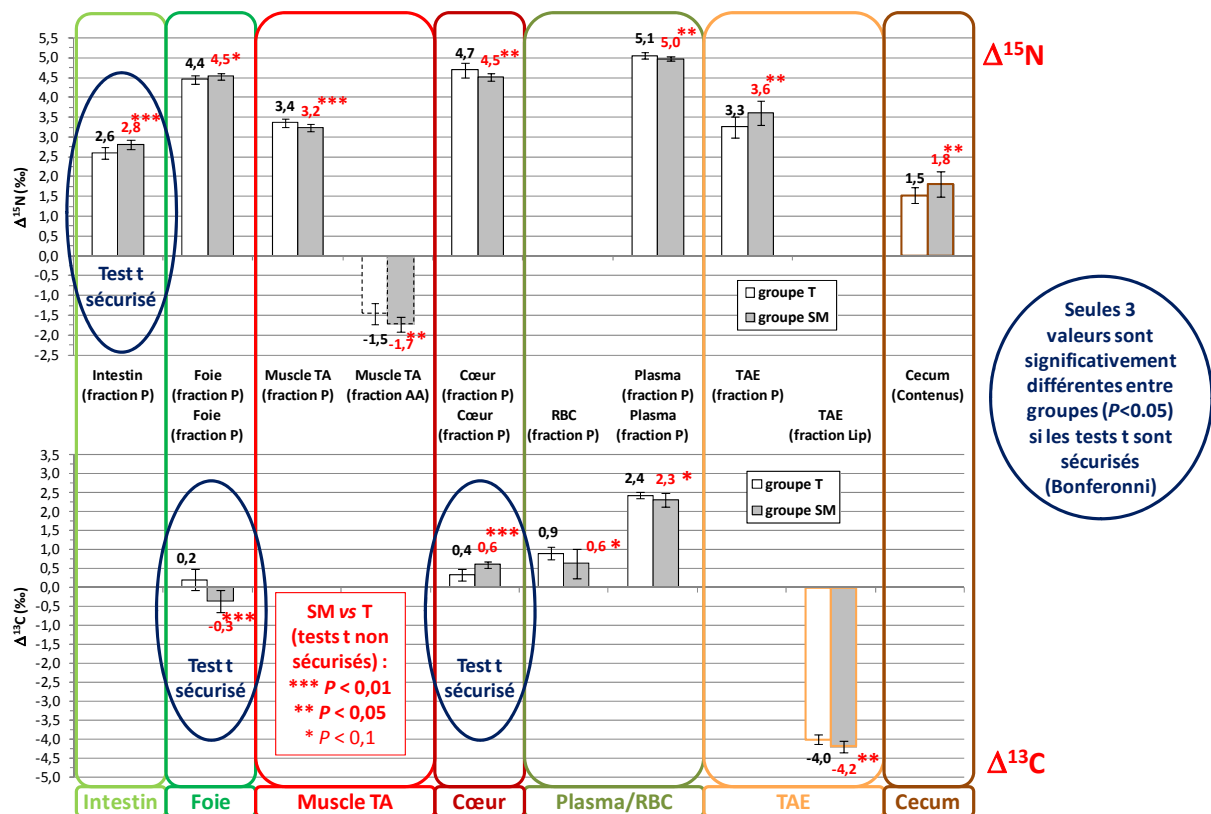
Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; RBC, cellules sanguines ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; fraction P, fraction Protéique ; fraction AA, fraction Acides Aminés ; fraction Lip, fraction Lipidique.

Moyennes \pm écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : *** $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.1$.

Comme signalé par les encadrements en bleu et pointillés, si les tests-t sont sécurisés (ajustements de Bonferonni, seuil $\alpha < 0,3\%$), seules 3 valeurs isotopiques diffèrent entre groupes : le $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin, le $\delta^{13}\text{C}$ des P du foie et le $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur.

Figure 10 : Bilan des pools présentant des différences de $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ entre groupes



$\Delta^{15}\text{N}$ ($\Delta^{13}\text{C}$), $\delta^{15}\text{N}$ ($\delta^{13}\text{C}$) du pool moins celui du régime.

Muscle TA, Muscle *Tibialis Anterior* ; RBC, cellules sanguines ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; fraction P, fraction Protéique ; fraction AA, fraction Acides Aminés ; fraction Lip, fraction Lipidique.

Moyennes \pm écart-types pour les rats des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Différences entre groupes (SM vs T, test-t non sécurisés) : *** $P < 0,01$, ** $P < 0,05$, * $P < 0,1$.

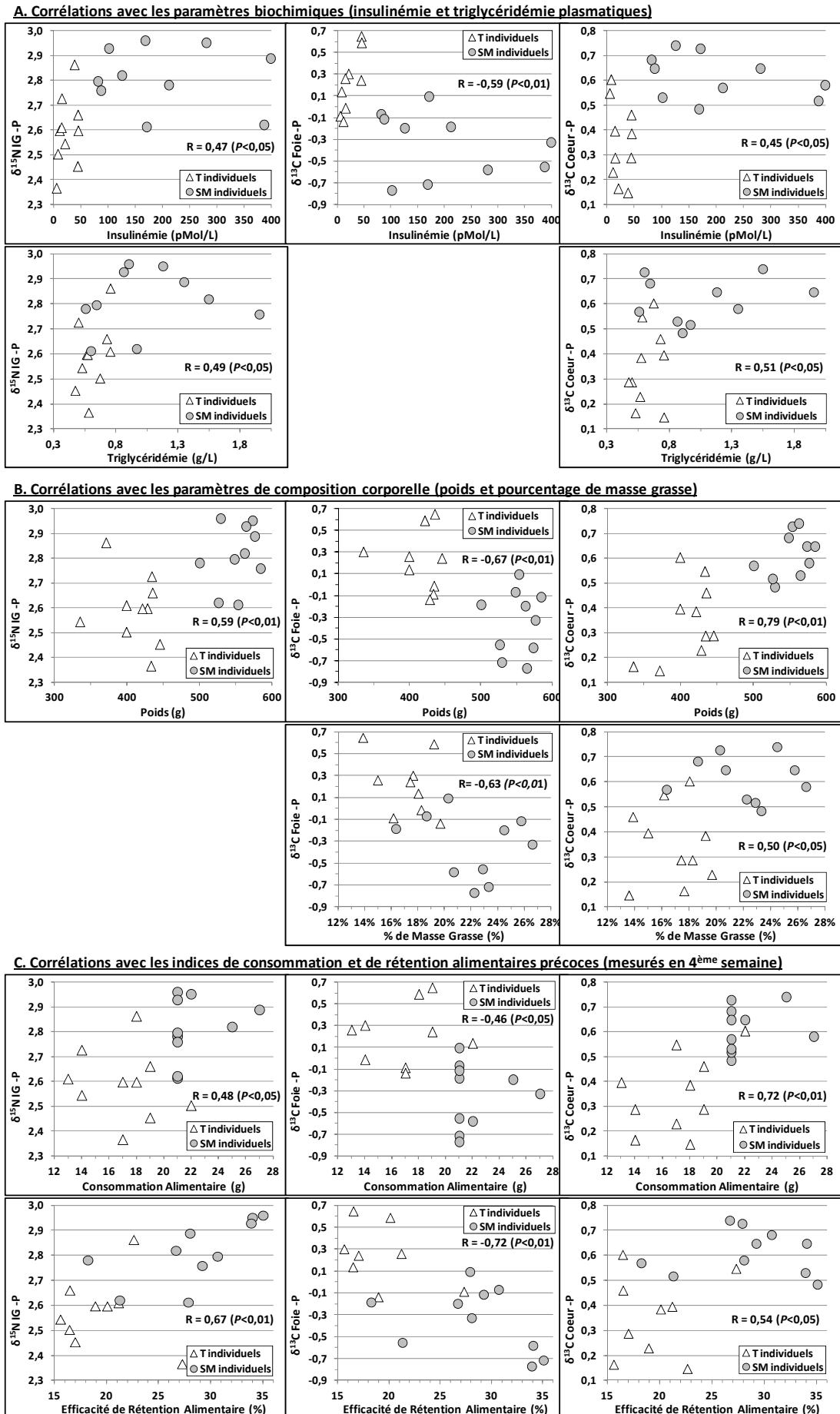
Tableau 3 : Corrélations entre les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ et différents paramètres biochimiques, de composition corporelle et de consommation alimentaire

Isotope :	Groupe 1			Groupe 2							Groupe 3						
	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{15}\text{N}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
	IG	Foie	Cœur	Mus TA	Mus TA	Cœur	Plasma	Cecum	TAE	TAE	IG	Foie	Rein	TASC	Mus EDL	RBC	Colon
Fraction :	P	P	P	P	AA	P	P	Bulk	P	Lip	AA	P	AA	P	P	P	Bulk
Effet groupe : SM vs T (tests t)																	
non sécurisés	0,002	0,001	0,000	0,009	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,01	0,96	0,08	0,55	0,26	0,22	0,06	0,19
sécurisés	0,028	0,01	0,004	0,15	0,30	0,30	0,37	0,54	0,55	0,22	16,35	1,36	9,33	4,47	3,70	1,09	3,17
Corrélations avec les paramètres biochimiques																	
Insulinémie : r	0,47	-0,59	0,45	-0,25	-0,43	-0,45	-0,54	0,43	0,29	-0,36	-0,11	0,24	-0,15	-0,27	0,17	-0,14	-0,03
P	0,04	0,008	0,05	0,30	0,06	0,05	0,01	0,07	0,32	0,12	0,66	0,30	0,54	0,26	0,49	0,55	0,91
Triglycéridémie : r	0,49	-0,39	0,51	-0,57	-0,13	-0,40	-0,17	0,14	0,59	-0,32	0,23	0,13	0,30	-0,48	-0,05	-0,05	-0,51
P	0,03	0,10	0,02	0,009	0,59	0,08	0,48	0,59	0,03	0,16	0,35	0,57	0,23	0,04	0,84	0,83	0,03
Glycémie : r	0,54	-0,47	0,01	-0,15	-0,15	-0,34	-0,13	0,09	0,08	-0,06	0,50	-0,03	0,31	0,25	-0,16	0,10	0,27
P	0,01	0,04	0,98	0,53	0,53	0,15	0,59	0,71	0,78	0,81	0,03	0,90	0,21	0,31	0,50	0,69	0,28
Corrélations avec les paramètres de composition corporelle																	
Poids : r	0,59	-0,67	0,79	-0,63	-0,55	-0,44	-0,59	0,28	0,48	-0,43	0,17	0,20	0,09	-0,34	0,45	-0,43	-0,36
P	0,006	0,002	<0,001	0,003	0,01	0,05	0,007	0,26	0,08	0,06	0,51	0,41	0,72	0,15	0,05	0,06	0,14
Masse Maigre : r	0,56	-0,60	0,81	-0,57	-0,57	-0,42	-0,66	0,25	0,41	-0,38	0,08	0,17	0,09	-0,25	0,54	-0,47	-0,36
P	0,009	0,006	<0,001	0,009	0,008	0,07	0,002	0,33	0,14	0,10	0,76	0,48	0,74	0,31	0,01	0,04	0,14
Masse Grasse : r	0,55	-0,68	0,66	-0,64	-0,43	-0,40	-0,40	0,29	0,55	-0,45	0,28	0,21	0,08	-0,45	0,24	-0,30	-0,32
P	0,01	0,001	0,002	0,003	0,06	0,08	0,08	0,24	0,04	0,04	0,27	0,37	0,74	0,05	0,31	0,20	0,20
% Masse Grasse : r	0,44	-0,63	0,50	-0,57	-0,33	-0,30	-0,22	0,28	0,48	-0,42	0,35	0,20	0,03	-0,46	0,06	-0,17	-0,22
P	0,05	0,004	0,02	0,009	0,16	0,20	0,35	0,26	0,08	0,07	0,15	0,39	0,91	0,05	0,79	0,48	0,37
TAE : r	0,57	-0,72	0,67	-0,56	-0,55	-0,33	-0,54	0,50	0,48	-0,43	0,08	0,41	0,01	-0,32	0,21	-0,22	-0,16
P	0,009	0,001	0,001	0,01	0,01	0,15	0,01	0,04	0,09	0,06	0,74	0,07	0,96	0,18	0,38	0,34	0,52
% TAE : r	0,39	-0,61	0,49	-0,41	-0,46	-0,16	-0,41	0,59	0,34	-0,37	0,01	0,54	-0,08	-0,22	-0,04	-0,03	0,05
P	0,09	0,006	0,03	0,07	0,04	0,16	0,07	0,01	0,23	0,11	0,96	0,01	0,75	0,37	0,86	0,89	0,86
Corrélations avec les paramètres de consommation alimentaire																	
Conso Wk4 : r	0,48	-0,46	0,72	-0,33	-0,41	-0,34	-0,49	0,30	0,45	-0,28	-0,19	0,29	-0,14	-0,35	0,15	-0,13	-0,34
P	0,03	0,05	0,000	0,16	0,07	0,14	0,03	0,23	0,11	0,23	0,44	0,22	0,57	0,14	0,53	0,58	0,17
Conso Wk4 rel : r	-0,15	0,09	0,36	0,15	0,05	0,09	-0,33	-0,08	-0,17	0,19	-0,58	0,12	-0,55	0,03	-0,01	0,16	-0,20
P	0,53	0,72	0,12	0,54	0,85	0,72	0,15	0,76	0,57	0,42	0,01	0,60	0,02	0,90	0,97	0,50	0,43
Eff Ret Wk4 : r	0,67	-0,72	0,54	-0,60	-0,33	-0,46	-0,40	0,16	0,52	-0,39	0,19	0,07	0,25	-0,05	0,51	-0,39	-0,11
P	0,002	0,001	0,02	0,006	0,17	0,05	0,09	0,55	0,07	0,10	0,46	0,79	0,33	0,86	0,03	0,09	0,68

Sont représentées ici chaque $\delta^{15}\text{N}$ ou $\delta^{13}\text{C}$ qui présente sur l'ensemble des 20 rats des deux groupes SM et T une corrélation r significative (signalée en rouge clair quand $P < 0,05$ et en rouge foncé quand $P < 0,01$) avec l'un des paramètres biochimiques, de composition corporelle ou de consommation alimentaire testés. Au sein de ces $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ qui présentent une corrélation significative, on peut distinguer 3 groupes de valeurs isotopiques : celles qui ne sont pas significativement différentes entre les rats SM et T (groupe 3), celles qui le sont avec des tests t non sécurisés (groupe 2) et celles qui le sont avec des tests t sécurisés (groupe 1).

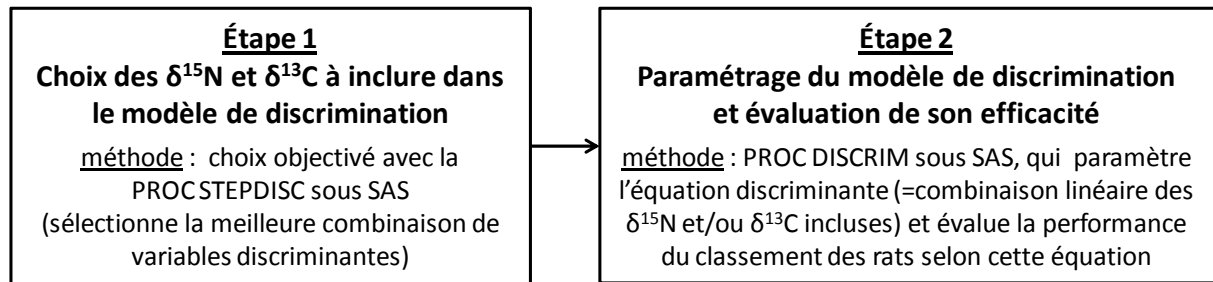
TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; Conso Wk4, Consommation alimentaire absolue mesurée à la fin de la semaine 4 (en g) ; Conso Wk4 rel, Consommation alimentaire relative mesurée à la fin de la semaine 4 (en g / 100 g de poids vif) ; Eff Ret Wk4, Efficacité de la rétention alimentaire mesurée entre les semaines 2 et 4 (comme le gain de poids divisé par la consommation alimentaire sur cette période, en %).

Figure 11 : Corrélations entre les 3 valeurs isotopiques qui discriminent le mieux les groupes et certains paramètres biochimiques (A), de composition corporelle (B) ou de consommation alimentaire (C)



$\delta^{15}\text{N-IG-P}$, $\delta^{15}\text{N des P}$ de la muqueuse de l'intestin grêle ; $\delta^{13}\text{C-Coeur-P}$, $\delta^{13}\text{C des P}$ du cœur ; $\delta^{13}\text{C-Foie-P}$, $\delta^{13}\text{C des P}$ hépatiques. Coefficients de Pearson (R) et probabilité (P) des corrélations linéaires (PROC REG, SAS) sur l'ensemble des individus des groupes T (n=10) et SM (n=10).

Figure 12 : Méthodologie et résultats de l'AFD (Analyse Factorielle Discriminante) permettant de tester la capacité des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ à discriminer les groupes SM et T



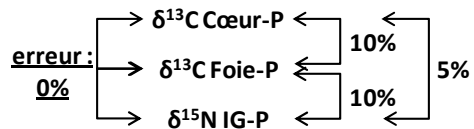
Avec validation croisée

- ce processus est mené sur un sous-ensemble représentatif des 20 rats (8 rats de chaque groupe), puis testé sur un échantillon indépendant (2 rats restants de chaque groupe)
 - et ce 5 fois consécutives (**5 itérations**), pour généraliser les résultats (i.e., pour 5 tirages aléatoires de la partition de 8 rats sur 10 par groupe)

➤ **Evaluation du pouvoir discriminant des $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ (identifié en étape 1)**

	$\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ sélectionnées par la procstepdisc	% de sélection sur les 5 itérations
groupe 1 : δ très discriminantes	$\delta^{13}\text{C}$ Cœur-P	100%
	$\delta^{13}\text{C}$ Foie-P	80%
	$\delta^{15}\text{N}$ IG-P	60%
groupe 2 : δ assez discriminantes	$\delta^{13}\text{C}$ TASC-P	60%
	$\delta^{15}\text{N}$ Cecum-Cont	40%
	$\delta^{15}\text{N}$ Foie-P	40%
groupe 3 : δ un peu discriminantes	$\delta^{13}\text{C}$ MuscleTA-P	20%
	$\delta^{13}\text{C}$ RBC-P	20%
	$\delta^{13}\text{C}$ TAE-P	20%
	$\delta^{15}\text{N}$ MuscleEDL-P	20%
	$\delta^{15}\text{N}$ Plasma-Urée	20%
	$\delta^{15}\text{N}$ RBC-P	20%
	$\delta^{15}\text{N}$ Rate-P	20%

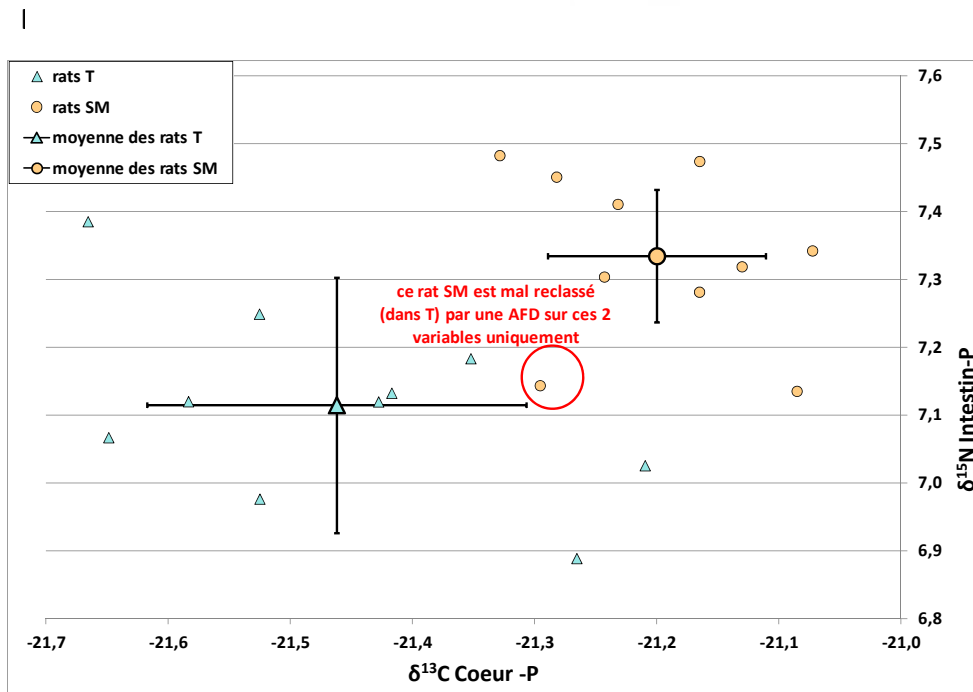
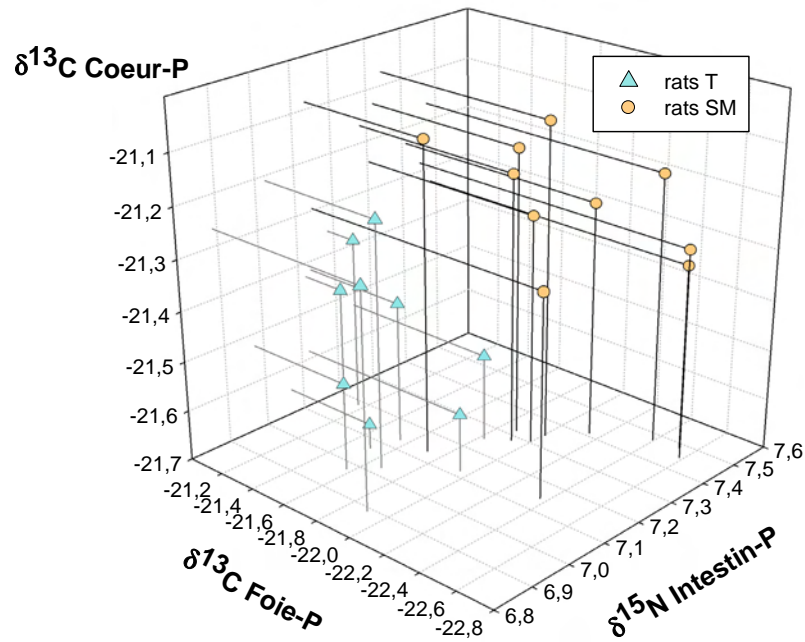
➤ **Capacité à discriminer les groupes SM et T (résultats finaux)**



en combinant les 3 seules $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ du groupe 1 ($\delta^{13}\text{C}$ Cœur-P, $\delta^{13}\text{C}$ Foie-P et $\delta^{15}\text{N}$ IG-P), on obtient 100% de bon classement des rats dans leur groupe, soit 0% d'erreur de classement (contre 5 % d'erreur en couplant uniquement $\delta^{13}\text{C}$ Cœur-P et $\delta^{15}\text{N}$ IG-P, ou 10 % d'erreur en couplant uniquement soit $\delta^{13}\text{C}$ Cœur-P et $\delta^{13}\text{C}$ Foie-P soit $\delta^{13}\text{C}$ Foie-P et $\delta^{15}\text{N}$ IG-P)

IG, muqueuse de l'intestin grêle ; TASC, Tissu Adipeux Sous-Cutané ; MuscleTA, Muscle Tibialis Anterior ; RBC, cellules sanguines ; TAE, Tissu Adipeux Epididymaire ; MuscleEDL, Muscle Extensor Digitorum Longus. -P, fraction Protéique ; -Urée, fraction urée ; -Cont, contenus luminaux.

Figure 13 : Signatures isotopiques des groupes SM et T



Les rats des deux groupes SM et T sont parfaitement séparés sur la base de la combinaison de leurs $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin et $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur et du foie (A), et la combinaison des $\delta^{15}\text{N}$ des P de l'intestin et des $\delta^{13}\text{C}$ des P du cœur permet déjà 95% de bon reclassement (B, seul 1 rat du groupe SM est mal reclassé par une AFD n'utilisant que ces deux variables isotopiques)

C. ÉTUDE 3 (ARTICLE N°2) :

ANALYSE DES DYNAMIQUES TISSULAIRES D'INCORPORATION ISOTOPIQUE ($\delta^{15}\text{N}$) APRÈS UN CHANGEMENT DE RÉGIME POUR L'ÉTUDE DU RENOUVELLEMENT PROTÉIQUE.

Cette étude a donné lieu à la publication d'un article¹ (**Article n°2**, présenté dans ce manuscrit) et une partie des résultats de cette étude a également fait l'objet de deux communications orales en congrès^{2,3} et d'un poster⁴.

¹Poupin N., Huneau J-F, Mariotti F, Tomé D, Bos C, & Fouillet H. **Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues**. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2012. Epub 7 Nov 2012 [Epub ahead of print].

²Poupin N., Huneau JF., Mariotti F., Bos C., Tomé D., Fouillet H. Une nouvelle méthode d'estimation des taux de renouvellement protéique multi-organes par l'analyse des trajectoires isotopiques azotées tissulaires après augmentation de l'enrichissement du régime. 8^{èmes} Journées Francophones de Nutrition (JFN), 8-10 décembre 2010, Lille, France.

³Poupin N., Bos C., Mariotti F., Tomé D., Huneau JF., Fouillet H. Les cinétiques d'enrichissement isotopique naturel de l'azote mesurées dans différents tissus après un changement de régime reflètent les taux tissulaires de renouvellement protéique. 4^{èmes} journées des Jeunes Chercheurs de la Société Française des Isotopes Stables (SFIS), 22-23 octobre 2009, Thiverval-Grignon, France.

⁴Poupin N., Huneau JF., Mariotti F., Bos C., Tomé D., Fouillet H. A new method for the multi-tissue estimation of protein turnover by compartmental analysis of the nitrogen isotope dynamics in rats fed a ^{15}N -enriched diet. *Experimental Biology (EB)*, 9-13 avril 2011, Washington DC, USA. FASEB J. 25: 983.14.

Contexte et objectifs :

L'étude du renouvellement protéique tissulaire est d'un intérêt majeur en nutrition, mais se heurte à des difficultés méthodologiques et nécessite le développement d'approches complémentaires. En effet, les taux de synthèse protéique (FSR) tissulaires sont généralement estimés par des méthodes basées sur l'utilisation d'AA traceurs sur des périodes de temps courtes et dans des conditions nutritionnelles et physiologiques aiguës et particulières. Par ailleurs, on sait encore peu de choses sur le degré de compartimentation du renouvellement protéique et la complexité des échanges entre AA et P dans les différents tissus. Dans cette étude, nous avons développé une nouvelle approche basée sur l'analyse, par modélisation compartimentale, des évolutions temporelles des enrichissements isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) dans les fractions d'AA libres et de P de différents tissus après la modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime. La dynamique d'incorporation isotopique dans un tissu étant liée à son renouvellement protéique, cette approche a pour but (i) d'estimer des FSR sur des périodes de temps longues, dans des conditions nutritionnelles et physiologiques moyennes, et (ii) d'explorer la structure et le fonctionnement des échanges entre AA et P dans chaque tissu.

Méthodes :

Des rats mâles Wistar (n=43) ont été soumis pendant une période d'adaptation de 5 semaines à un régime standard contenant 20% de P de lait. À l'issue de cette période, les rats ont été nourris pendant 2 mois avec un régime de composition identique au régime initial, mais légèrement enrichi en ^{15}N (+20 ‰). Des groupes de 5 ou 8 rats ont été sacrifiés avant ou à 1, 2, 4, 8, 17, 31 et 58 jours après la modification

du $\delta^{15}\text{N}$ du régime et les $\delta^{15}\text{N}$ ont été mesurés dans les fractions AA ($\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$) et P ($\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$) de différents tissus (foie, rein, muscle Tibialis anterior, plasma, muqueuse intestinale et peau) afin de déterminer leurs évolutions cinétiques. Nous avons ensuite procédé à une analyse conjointe des cinétiques de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ et $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ de chaque tissu par modélisation compartimentale, afin d'explorer les relations entre AA et P dans chaque tissu. Dans les tissus où ces relations ont pu être modélisées par une structure bi-compartimentale simple, nous avons développé une méthode numérique permettant d'estimer la valeur de FSR tissulaire. Nous avons démontré la fiabilité et la précision de cette méthode sur des jeux de données théoriques simulées avant de l'appliquer aux données expérimentales. Concernant les tissus pour lesquels la méthode n'aboutissait pas à l'identification de valeurs de FSR, nous avons testé la capacité de modèles plus complexes à rendre compte des cinétiques de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ et $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ observées dans ces tissus.

Résultats & discussion :

Les trajectoires de $\delta^{15}\text{N}$ observées montrent que les différentes P tissulaires atteignent leur nouvel état d'équilibre à des vitesses différentes (par ex. plus rapidement pour les P hépatiques que musculaires) qui reflètent bien le FSR du tissu. Nous avons mis en évidence une compartimentation simple du renouvellement protéique dans le rein, le foie, le plasma et le muscle, où notre méthode numérique validée a permis d'estimer des valeurs de FSR de 103%/j, 101%/j, 58%/j et 11%/j, respectivement. Ces valeurs sont dans la gamme des valeurs de la littérature obtenues chez le rat par les techniques classiques de traceur, mais représentent des valeurs à plus long-terme et moyennes sur les phases postabsorptives et postprandiales. À l'inverse, nous avons mis en évidence que la représentation du renouvellement protéique par un modèle bi-compartimental simple ne permettait pas de rendre compte des cinétiques de $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ et $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ mesurées dans la muqueuse intestinale et la peau, ce qui indique que le métabolisme des AA et des P dans ces tissus présente une compartimentation plus complexe. Concernant la peau, des modèles à 3 compartiments, incluant 2 compartiments protéiques ayant des FSR distincts, ont permis de reproduire les cinétiques isotopiques, ce qui est cohérent avec la complexité anatomique de la peau (différentes P du derme et de l'épiderme). Dans le cas de la muqueuse intestinale, nos résultats suggèrent que le problème de compartimentation concerne au contraire le pool des AA précurseurs des protéosynthèses qui ne pourrait pas être représenté par un unique compartiment, en raison de l'hétérogénéité de ses sources, avec probablement une utilisation directe des AA extracellulaires (channeling), sans que ceux-ci ne se mêlent au pool intracellulaire d'AA.

Conclusions :

La nouvelle approche que nous avons développée permet d'estimer des FSR sur des périodes de temps relativement longues qui moyennent les variations nyctémérales des cinétiques protéiques, ce qui est particulièrement intéressant pour étudier les effets moyens et chroniques d'un régime ou traitement sur le renouvellement protéique en nutrition-santé. De plus, par ses apports cognitifs, cette étude souligne l'intérêt de l'analyse par modélisation compartimentale des cinétiques d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$ pour explorer la compartimentation du renouvellement protéique dans les différents tissus.

ARTICLE n°2

Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues.

Poupin N, Huneau J-F, Mariotti F, Tomé D, Bos C, & Fouillet H.
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2012.
Epub 7 Nov 2012 [Epub ahead of print].

Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues

Nathalie Poupin,^{1,2} Jean-François Huneau,^{1,2} François Mariotti,^{1,2} Daniel Tomé,^{1,2} Cécile Bos,^{1,2} and Hélène Fouillet^{1,2}

¹INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), CRNH-IdF (Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Ile de France), UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France; and ²AgroParisTech, CRNH-IdF, UMR914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France

Submitted 9 July 2012; accepted in final form 6 November 2012

Poupin N, Huneau J, Mariotti F, Tomé D, Bos C, Fouillet H. Isotopic and modeling investigation of long-term protein turnover in rat tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R218–R231, 2013. First published November 7, 2012; doi:10.1152/ajpregu.00310.2012.—Fractional synthesis rates (FSR) of tissue proteins (P) are usually measured using labeled amino acid (AA) tracer methods over short periods of time under acute, particular conditions. By combining the long-term and non-steady-state ¹⁵N labeling of AA and P tissue fractions with compartmental modeling, we have developed a new isotopic approach to investigate the degree of compartmentation of P turnover in tissues and to estimate long-term FSR values under sustained and averaged nutritional and physiological conditions. We measured the rise-to-plateau kinetics of nitrogen isotopic enrichments ($\delta^{15}\text{N}$) in the AA and P fractions of various tissues in rats for 2 mo following a slight increase in diet $\delta^{15}\text{N}$. Using these $\delta^{15}\text{N}$ kinetics and a numerical method based on a two-compartment model, we determined reliable FSR estimates for tissues in which P turnover is adequately represented by such a simple precursor-product model. This was the case for kidney, liver, plasma, and muscle, where FSR estimates were 103, 101, 58, and 11%/day, respectively. Conversely, we identified tissues, namely, skin and small intestine, where P turnover proved to be too complex to be represented by a simple two-compartment model, evidencing the higher level of subcompartmentation of the P and/or AA metabolism in these tissues. The present results support the value of this new approach in gaining cognitive and practical insights into tissue P turnover and propose new and integrated FSR values over all individual precursor AA and all diurnal variations in P kinetics.

protein kinetics; compartmental modeling; fractional synthesis rate; nitrogen stable isotopes; isotope incorporation rate

THE BODY IS MADE UP OF NUMEROUS proteins (P) that differ markedly in their nature, function, and turnover kinetics. The different P of plasma and tissues are continuously synthesized from and degraded to free amino acids (AA), with synthesis and degradation rates that vary largely among P and as a function of nutritional, physiological, and pathophysiological conditions (52). This continuous turnover of P ensures their renewal with a relative flexibility in adapting to the environmental and endogenous variations. To understand how P homeostasis is achieved and controlled in health and disease, methods are needed to assess the rates of P turnover in tissues and to better understand its metabolic compartmentation. Much effort has been devoted to measuring the P synthesis rates, and several approaches have been proposed (12, 19, 20, 41, 52, 53),

whereas little is known about P turnover compartmentation (1, 27, 28, 35, 52).

P fractional synthesis rates (FSR) in tissues and plasma are classically determined using precursor-product tracer methods, which consist in quantifying the temporal rate of incorporation into the studied P pool of an isotopically labeled AA tracer. The AA tracer is generally administered intravenously via a flooding dose or a constant infusion, so as to maintain a steady-state labeling of the AA precursor pool for P synthesis during a short measurement period of a few minutes or a few hours, depending on the infusion mode (12, 19, 20, 53), during which the tracer recycling from P breakdown can be neglected. However, these classic tracer methods have some limitations. In particular, their FSR estimates may be biased because of nonphysiological conditions that artificially increase the P turnover when the flooding-dose method is used and because of the large uncertainty regarding the isotopic enrichment of the true precursor pool when the constant-infusion method is used (12, 20). The FSR values reported in the literature, therefore, differ markedly, depending on the tracer method, the particular AA tracer, and the surrogate precursor pool for P synthesis that are used (20, 26, 49, 52).

Precursor-product AA tracer studies have established that the different body P have distinct FSR [e.g., much more rapid in gut and liver than in muscle (10, 52)] that are also differently stimulated by particular nutritional, physiological, and pathophysiological conditions (9, 19, 36, 52). Because of the necessarily limited duration of such AA tracer studies, most FSR modulations have been measured acutely over short time periods and have been reported to differ according to the particular metabolic state of the individual (i.e., fed or fasted), but it is difficult to extrapolate conclusions from such results regarding average FSR values over longer periods of time. Interestingly, the more recent and less familiar method of ²H₂O administration makes it possible to obtain such long-term FSR estimates, because of the rapid equilibration between H labeling in body water and intracellular AA, which can therefore be kept at an isotopic steady state for long durations (21).

These existing precursor-product tracer methods are deliberately limited to the conditions of an isotopic steady state regarding the labeling of the pool that is assumed to be the precursor pool for P synthesis, because they are not designed to examine the degree of metabolic compartmentation of P turnover but share the common objective of relatively simply providing FSR estimates to facilitate their routine use in human studies. As a result, some of these FSR estimates may be biased, because they rely on simplifying assumptions relative to the structure and functioning of P turnover, which might be

Address for reprint requests and other correspondence: H. Fouillet UMR914 PNCA, AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France (e-mail: Helene.Fouillet@agroparistech.fr).

erroneous, particularly in tissues that can involve metabolic or kinetic compartmentation that is more complex than generally assumed (27, 41, 52). As a consequence, despite the vast number of dedicated tracer studies in the literature, no consensus has been reached concerning the “true” FSR values of different P and, more problematically, how they are affected by different nutritional and pathophysiological conditions (19, 20, 41). This warrants the development of a new complementary approach that will enable the analysis of precursor-product relationships structurally (to identify and compare the degree of P turnover compartmentation in tissues) and kinetically (to determine long-term FSR values that integrate the numerous diurnal variations in P kinetics under sustained nutritional or physiological conditions).

For this purpose, we measured the kinetics of nitrogen isotopic enrichments ($\delta^{15}\text{N}$) in the AA and P fractions of various rat tissues over a 2-mo period following a slight increase in the $\delta^{15}\text{N}$ of the diet. By comparing these postshift, rise-to-plateau $\delta^{15}\text{N}$ kinetics in AA and P under non-steady-state isotopic conditions for the precursor and the product, we investigated the compartmental structure of tissue P metabolism. Using a simple precursor-product model as the representation of tissue P metabolism, we developed a numerical method to estimate the averaged tissue P FSR values over the 2-mo experimental period. We also evidenced that some tissues display a P metabolism that is too compartmented to be described using a simple precursor-product model.

MATERIALS AND METHODS

Collection of Experimental Data

Animals and diets. Male Wistar rats ($n = 43$; Harlan, Gannat, France) were housed in a temperature-regulated ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) room under a 12:12-h light-dark cycle (dark period from 0900 to 2100). Experiments were carried out in accordance with the recommendations of the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experiments (COMETHEA) of the Jouy-en-Josas Institut National de la Recherche Agronomique Centre and AgroParisTech (approval no. 11/009).

The rats were first maintained under standard conditions for a 5-wk equilibration period, with free access to a diet composed of 20% milk P, 30% lipids, and 50% carbohydrates and with a $\delta^{15}\text{N}$ of 4.9‰. At the end of this 5-wk equilibration period (referred to as *day 0* of the diet-shift experiment), the rats, weighing 343 ± 13 g, were switched for 2 mo to the same diet that had been slightly ^{15}N -enriched by the addition of ^{15}N -enriched milk P obtained as previously described (22). ^{15}N -enriched milk P accounted for 4.5% of the total quantity of P in the final diet, leading to a slightly ^{15}N -enriched diet with a $\delta^{15}\text{N}$ of 27‰ and the same nutrient composition as the initial diet. Rats were allowed free access to food from 0900 to 1900 (during the dark period) and had free access to water throughout the day. Body weight was measured twice weekly.

Experimental protocol and sampling procedures. Different groups of rats were killed on *day 0* (i.e., before the diet shift) and on *days 1, 2, 4, 8, 17, 31, and 58* following the diet shift, with 5 rats in all groups except in the last group, which consisted of 8 rats. All the rats were euthanized after an overnight fast. The rats were anesthetized by inhalation of isoflurane. While the rats were under deep anesthesia, the abdomen was opened and a ~5-ml blood sample was quickly withdrawn from the vena cava. The animals were then killed by rupture of the aorta. The liver, small intestine, kidneys, and tibialis anterior muscle were rapidly dissected out, rinsed, weighed, and snap-frozen in liquid nitrogen. A sample of skin was also collected, and the skin was dissected out and weighed.

The “stripped” carcass was prepared as follows: other abdominal and thoracic organs were discarded, and the distal parts of the limbs, head, and tail were severed. The stripped carcass was then weighed. All samples were stored at -20°C until analysis.

Sample preparation. In each sampled tissue, the P and non-P (AA) fractions were isolated. Frozen tissues were pulverized with a mortar and pestle cooled in liquid nitrogen and precipitated by addition of 700 μl of 5-sulfosalicylic acid (10%) per 100 mg of tissue. After centrifugation (2,500 g, 4°C , 15 min), the pellet was rinsed twice with 700 μl of 5-sulfosalicylic acid (10%), and the supernatant was extracted and filtered through 3-kDa cut-off filters (Amicon Ultra-4, Ultracel 3k, Millipore, Carrigtwohill, Ireland) to isolate the AA fraction. The soluble fraction (i.e., the non-P fraction containing the free AA) and the insoluble fraction (i.e., the P fraction containing the P-bound AA) were then freeze-dried.

In plasma, the different nitrogen fractions (P, AA, and urea) were also separated. The P fraction was isolated by precipitation with 200 μl of sulfosalicylic acid (1 g/ml). After 1 h of storage at 4°C and centrifugation (2,000 g, 4°C , 20 min), the pellet was rinsed with 1 ml of sulfosalicylic acid (1 g/ml), centrifuged again, and freeze-dried. The supernatant, containing AA and urea, was filtered through 3-kDa cut-off filters (Amicon Ultra-4) to eliminate residual P and large peptides. The filtrate was then buffered at pH 7 and transferred onto 0.2 ml of cation-exchange resin in the Na^+ form (Dowex AG50X8, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) in the presence of 10 μl of urease (Sigma) for 2 h at 30°C to bind the ammonium released from urea hydrolysis. The urea-depleted supernatant was acidified and transferred onto 0.2 ml of cation-exchange resin in the H^+ form (Dowex AG50X8, Bio-Rad) to bind the protonated AA. The resin containing the AA was washed with distilled water and dried in an oven at 50°C .

Elemental analysis and isotopic determinations. In each of the P and AA fractions isolated from tissues and plasma, the stable isotope ratios of nitrogen were determined using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime, VG Instruments, Manchester, UK) coupled to an elemental analyzer (model EA 3000, EuroVector, Milan, Italy). Internal standards (tyrosine) were included in every run to correct for possible variations in the raw values measured by the mass spectrometer. Typical replicate measurement errors for these reference materials were $\pm 0.2\%$. Results were expressed using the delta notation according to the following equation

$$\delta^{15}\text{N} = [\text{R}_{\text{sample}}/\text{R}_{\text{standard}} - 1] \times 1,000$$

where R_{sample} and $\text{R}_{\text{standard}}$ are the nitrogen isotope ratio of the heavier isotope to the lighter isotope ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) for the sample being analyzed and the internationally defined standard (atmospheric N_2 , $\text{R}_{\text{standard}} = 0.0036765$), respectively, and δ is the delta notation in parts per 1,000 (‰) relative to the standard.

The nitrogen percentage in each P and AA fraction of the samples was determined using the elemental analyzer (model EA 3000, EuroVector), with atropine as standard. Tissue samples were weighed before and after they were freeze-dried to estimate the tissue dry matter percentage, and the total nitrogen content (N) of each sampled tissue fraction was calculated using the following equation

$$\text{N}(\text{mmol}) = 1,000 \times (m \times \% \text{DM} / 100 \times \% \text{N} / 100) / 14$$

where %N and %DM are the nitrogen and dry matter percentages measured in the sample, respectively, and m (g) is the total mass of the tissue. Total muscle mass was approximated by the stripped carcass mass. The nitrogen content of plasma P and AA fractions was calculated as the product of the nitrogen concentration in the fraction and the plasma volume, which was estimated as $2.91\% \times \text{BM} + 2.54$, where BM is body mass (5).

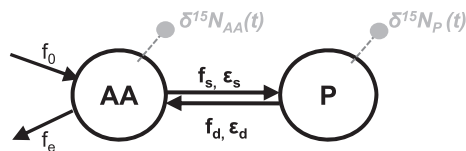
Statistics. At *day 0*, differences in $\delta^{15}\text{N}$ between the P and AA fractions for each tissue were tested using *t*-tests. Differences between tissues were assessed using ANOVA followed by post hoc tests with

Tukey's adjustments for multiple comparisons between tissues. The effect of time on the total nitrogen content of each tissue fraction was determined by ANOVA (Proc GLM, SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC). $P \leq 0.05$ was considered significant.

FSR Estimation Using a Two-Compartment Model of P Turnover in Tissues

We tested the ability to infer the FSR value of a given tissue or plasma from the combined analysis of ¹⁵N enrichments in its P and AA fractions after a shift in the ¹⁵N enrichment of the diet (referred to as "diet shift"). We developed a compartmental, mechanistic model describing the ¹⁵N postshift kinetics in the P and AA fractions of a given tissue in relation to its FSR, together with a method for numerical identification of the FSR based on the model equations. This modeling approach relies on the following assumptions: 1) P turnover in the studied tissue can be adequately described by a two-compartment model, with a precursor-product structure as described below, and 2) the tissue is in an elemental steady state during the entire diet-shift period, i.e., its growth rate is null or negligible compared with its turnover rate. The numerical method for FSR estimation was first validated by verification of its ability to provide reliable FSR estimates when theoretical ¹⁵N postshift kinetics data simulated using known FSR values for a tissue P turnover system fulfilling the above assumptions were analyzed. The method was then applied to the real experimental data measured in each tissue. Fulfillment of the steady-state assumption was verified a priori on the basis of the measured nitrogen contents of tissues, whereas the assumption relative to the system structure was validated a posteriori when the numerical approach succeeded in identifying a FSR value for the tissue.

Model structure and equations. We developed a physiologically based two-compartment model describing the ¹⁵N kinetics in the AA and P nitrogen fractions of a given tissue after a change in the diet ¹⁵N in relation to its FSR. This model (Fig. 1) is made up of a precursor pool, which represents the free AA used for the P synthesis, and a product pool, which represents the tissue P. The nitrogen exchange fluxes between these two compartments depict the nitrogen exchanges that occur during the processes of P synthesis and breakdown. By considering a single P compartment, the FSR represents the weighted average of the different tissue P turnover rates. The assumption of elemental steady state for tissue AA and P fractions implies



$$FSR = f_s / N_p$$

$$= \frac{\delta^{15}N_P(t + \Delta t) - \delta^{15}N_P(t)}{\int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}N_{AA}(t) dt - \int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}N_P(t) dt - (\epsilon_s - \epsilon_d) \cdot \Delta t}$$

Fig. 1. Two-compartment model of tissue protein metabolism. Circles indicate compartments, which represent free amino acids (AA) and proteins (P) in the tissue. Dashed lines with bullets indicate experimental measurements of nitrogen isotopic enrichments ($\delta^{15}N$) in each compartment ($\delta^{15}N_{AA}$ and $\delta^{15}N_P$) at different times. Arrows represent nitrogen transfers between compartments: f_s and f_d are instantaneous fluxes of nitrogen transfer through P synthesis and breakdown, respectively, and f_0 and f_e are instantaneous fluxes of nitrogen transfer into AA from and toward outside the tissue, respectively. ϵ_s and ϵ_d represent isotope effects associated with P synthesis and P breakdown, respectively. Equation defining P fractional synthesis rate (FSR) is derived under the assumption that instantaneous total nitrogen fluxes and amounts of total nitrogen in the 2 compartments remain constant (see APPENDIX for complete derivation of the equation).

that the amounts of total nitrogen in the compartments and the total nitrogen fluxes are constant and that only the specific ¹⁵N abundance in the P and AA pools is modified following the diet shift.

With use of this two-compartment model and in accordance with the mass conservation principle, the evolutions of the nitrogen isotopic enrichments of the P ($\delta^{15}N_P$) and AA ($\delta^{15}N_{AA}$) compartments following the diet shift were described by the following non-steady-state linear differential equations (see details for derivation of the equations in the APPENDIX)

$$d(\delta^{15}N_{AA})/dt = [\delta^{15}N_0(t) - \delta^{15}N_{AA}(t) - \epsilon_e] \times \frac{f_0}{N_{AA}} + [\delta^{15}N_P(t) - \delta^{15}N_{AA}(t) + \epsilon_d - \epsilon_s] \times FSR \times \frac{N_P}{N_{AA}} \quad (1)$$

$$d(\delta^{15}N_P)/dt = FSR \times [\delta^{15}N_{AA}(t) - \delta^{15}N_P(t) + \epsilon_s - \epsilon_d] \quad (2)$$

where FSR is also equal to the P degradation rate under the steady-state assumption for total nitrogen, f_0 represents the flux of total nitrogen from plasma to the AA pool, $\delta^{15}N_0$ is the isotopic enrichment of the f_0 flux, N_{AA} and N_P are the amounts of total nitrogen in the AA and P pools, respectively, and ϵ_s , ϵ_d , and ϵ_e represent the isotope effects associated with P synthesis, P breakdown, and AA exportation from the AA pool to plasma, respectively. These isotopic effects account for the potential isotope fractionation associated with these metabolic reactions and are defined as the difference between the isotopic enrichment of the instantaneous flux and that of the pool from which it arises. It should be noted that the difference between ϵ_s and ϵ_d represents the difference between $\delta^{15}N_P$ and $\delta^{15}N_{AA}$ at isotopic equilibrium.

Numerical approach for FSR estimation and practical implementation. From the $\delta^{15}N_P$ and $\delta^{15}N_{AA}$ data sampled at different time points, FSR values can be calculated using Eq. 2. To numerically identify the FSR values, we adopted the approach described as follows.

By integrating Eq. 2, one can express the change in $\delta^{15}N$ in the P compartment over a time interval Δt as

$$\Delta \delta^{15}N_P(t) = FSR \times \left[\int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}N_{AA}(t) \cdot dt - \int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}N_P(t) \cdot dt \right] + FSR \times \Delta \epsilon \times \Delta t \quad (3)$$

where $\Delta \delta^{15}N_P(t) = \delta^{15}N_P(t + \Delta t) - \delta^{15}N_P(t)$ and $\Delta \epsilon = (\epsilon_s - \epsilon_d)$.

Equation 3 was preferred to Eq. 2, because calculating the derivative of a given curve from discrete and noisy data generally produces a more important relative error than calculating its area under the curve. In addition, to minimize the error on the calculated integrals for $\delta^{15}N_{AA}$ and $\delta^{15}N_P$, we modeled each of the kinetics for $\delta^{15}N_{AA}$ and $\delta^{15}N_P$ by a sum of two exponential functions. The parameters of these functions were identified by fitting the equations to the experimental $\delta^{15}N_{AA}$ and $\delta^{15}N_P$ data using the nonlinear least-squares method of the curve-fitting toolbox (version 1.1.7) in MATLAB (version 7.7, MathWorks, Natick, MA). The fitted equations were subsequently used to calculate $\Delta \delta^{15}N_P$ values and $\delta^{15}N_{AA}$ and $\delta^{15}N_P$ integrals over any chosen Δt interval during the subsequent procedure for the numerical resolution of Eq. 3, which is described below.

The two unknown parameters in Eq. 3, FSR and $\Delta \epsilon$, can be determined by solving a system of n linear equations, composed of Eq. 3 applied to n different time intervals of length Δt , with $n \geq 2$ (so as to have more equations than unknowns). Time intervals Δt were chosen as subintervals of the experimental period. For a set of n intervals, the system of n equations was solved as a nonlinear least-squares minimization problem, by searching for the minimum of function F

$$F = \sum_{i=1}^n (F_i^2)$$

where $F_i = FSR \times [\int_{t_i}^{t_i+\Delta t} \delta^{15}N_{AA}(t) - \int_{t_i}^{t_i+\Delta t} \delta^{15}N_P(t)] + FSR \times \Delta \epsilon \times \Delta t - [\delta P(t_i + \Delta t) - \delta P(t_i)]$. The solution was achieved by using a trust-region algorithm under MATLAB (lsqnonlin function) and yielded one FSR estimate for each set of n intervals.

To test whether numerical FSR estimates depend on the number n and length Δt of the time intervals chosen, we tested different options for n and Δt . By varying n and Δt , we divided the whole 0- to 60-day experimental period into different intervals of equal length, or we randomly selected time intervals of various length within the whole period in such a way that they did not overlap and first completely and then incompletely covered the experimental period. Because all the partitioning methods thus tested produced comparable results, we finally used the simplest approach: we divided the whole period into n intervals of equal length Δt ($\Delta t = 60/n$ days), with Δt being a whole number of days (i.e., with $\Delta t = 30, 20, 15, 12, 10, 6, 5, 4, 3, 2$, or 1 days, when $n = 2, 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 20, 30$, or 60 intervals, respectively). For each partition into n intervals of Δt , solving the system of n equations produced one FSR estimate. Since the different FSR estimates varied very little among the different partitions tested (except those obtained in the 2 extreme cases with $n = 2$ and 60), we retained as the final FSR estimate the average of the different estimates obtained from all tested partitions with $n = 3$ –30 intervals.

Evaluation of the validity of the method. To estimate the reliability of the FSR estimates generated using this method, it was tested on theoretical data for $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ postshift kinetics simulated from known parameter values. Two distinct and adequate sets of parameters (FSR and $\Delta\epsilon$) were chosen and assigned to the two-compartment model to generate two distinct profiles for $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ kinetics: a fast-FSR profile and a slow-FSR profile, which were simulated using FSR values corresponding to the mean FSR values reported in rat studies for liver (70%/day) and muscle (15%/day), respectively. For each profile, the simulated $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ data were generated at each of the eight experimental sampling time points with or without addition of a normally distributed random noise (with a standard deviation of 0.1), intended to mimic the experimental error and interindividual variability as observed in our data set. One hundred different sets of noisy data were generated for each profile, and the FSR parameter was then estimated from the noise-free data and from each set of noisy data using the numerical approach described above (i.e., fitting of the data with sums of exponential functions, partitioning the whole period into various n numbers of intervals of equal length, and estimating the FSR as the average of the estimated values for all possible partitions of the period into n intervals, except with $n = 2$ or 60 intervals). In each case, the FSR estimate was compared with the a priori value used to generate the data sets to evaluate the accuracy and precision of the method.

Sensitivity analysis and test of the method over shorter experimental periods. A sensitivity analysis was performed to study the influence of the FSR parameter on the behavior of the system and, more particularly, to identify the time periods when the FSR value had the strongest impact on the postshift $\delta^{15}\text{N}$ kinetics in the AA and P pools. This was done for the fast- and slow-FSR theoretical profiles by simulating the changes in $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ in response to 10% and 25% increases and decreases in the FSR value.

To determine whether the duration of the experimental period impacted the accuracy and precision of FSR estimates, we tested the method developed when considering experimental periods shorter than our entire 2-mo period. FSR values were reestimated from the set of simulated noisy data (for slow- and fast-FSR profiles) using successively only the first five data points (i.e., corresponding to a restricted duration of ~ 1 wk) and then the first 6 data points (i.e., corresponding to a restricted duration of ~ 2 wk). FSR estimations over these shortened time periods were performed as described above.

Test of Alternative Model Structures for Some Specific Tissues

The developed method was applied to the experimental data sets for $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ measured in each tissue and plasma. In tissues for which we were unable to identify numerical values for FSR, we concluded that the hypothesized precursor-product model was too simple to accurately fit the experimental data, and we tested whether models with

a more complex structure could conversely account for the $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ kinetics observed in these tissues. Models with additional AA or P pools were investigated: $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ were simulated from those models and compared with experimental data, and parameter optimization was performed on different model structures to determine numerical parameter values that would enable the model to generate the closest predictions to the observed $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ kinetics. We used the SimBiology toolbox (version 2.2) of MATLAB to implement the models and their equations and to simulate the evolutions of total nitrogen and isotope abundances in the different pools, while the parameter estimation was implemented under MATLAB.

RESULTS

Experimental Data

The experimental data for $\delta^{15}\text{N}$ postshift kinetics in the different AA and P fractions of tissues are reported in Fig. 2. At the beginning of the diet shift (day 0), $\delta^{15}\text{N}$ values in the different plasma and tissue fractions were generally higher than that of the diet, except in the AA fractions of muscle and plasma, where the $\delta^{15}\text{N}$ values were, respectively, lower than and similar to that of the diet. There were also significant $\delta^{15}\text{N}$ differences among tissues and between the two nitrogen fractions of a given tissue, with higher $\delta^{15}\text{N}$ values in the P fraction than in the AA fraction of all tissues.

After the diet shift, all the sampled AA and P fractions of plasma and tissues incorporated the new $\delta^{15}\text{N}$ of the diet following biexponential rise-to-plateau kinetics (Fig. 2). The incorporation rates differed markedly among tissues (e.g., with faster rates in liver and plasma than in muscle fractions) and also slightly between fractions within a given tissue (with slightly faster rates in the AA fraction than in the P fraction). The $\delta^{15}\text{N}$ postshift evolutions remained, however, virtually parallel between the AA and P fractions in all sampled tissues, except in skin, where the $\delta^{15}\text{N}$ evolution was markedly faster in the AA fraction than in the P fraction.

Contrary to the $\delta^{15}\text{N}$ values, the total nitrogen contents in the AA and P fractions of most of the sampled tissues did not change over time, except for an increase in the muscle P fraction and plasma AA and P fractions and a decrease in the small intestine AA and P fractions. However, these changes were moderate, with, for instance, an average increase of 0.4%/day in the nitrogen contents of the muscle and plasma P fractions over the experimental period, which is negligible compared with the reported FSR values for these tissues.

FSR Estimation Using the Two-Compartment Model

Sensitivity analysis of the system behavior and theoretical validity of the method of FSR estimation. The simulated $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ kinetics for the fast- and slow-FSR profiles (Fig. 3), which were used to conduct the sensitivity analysis and test the validity of our method of FSR estimation, satisfactorily resembled the evolutions of $\delta^{15}\text{N}_A$ and $\delta^{15}\text{N}_P$ measured in liver and muscle, respectively (Fig. 2, A and B). The sensitivity analysis indicated that a change in the FSR value exerted a different effect on $\delta^{15}\text{N}$ kinetics, depending on the FSR profile. With the fast-FSR profile, the impact of an FSR variation was significant at the early time points, and particularly during the first 2 wk after the diet shift, but was transient (Fig. 4, A and B), whereas this impact was slightly delayed but more sustained over the entire postshift period with the slow-FSR profile and, more

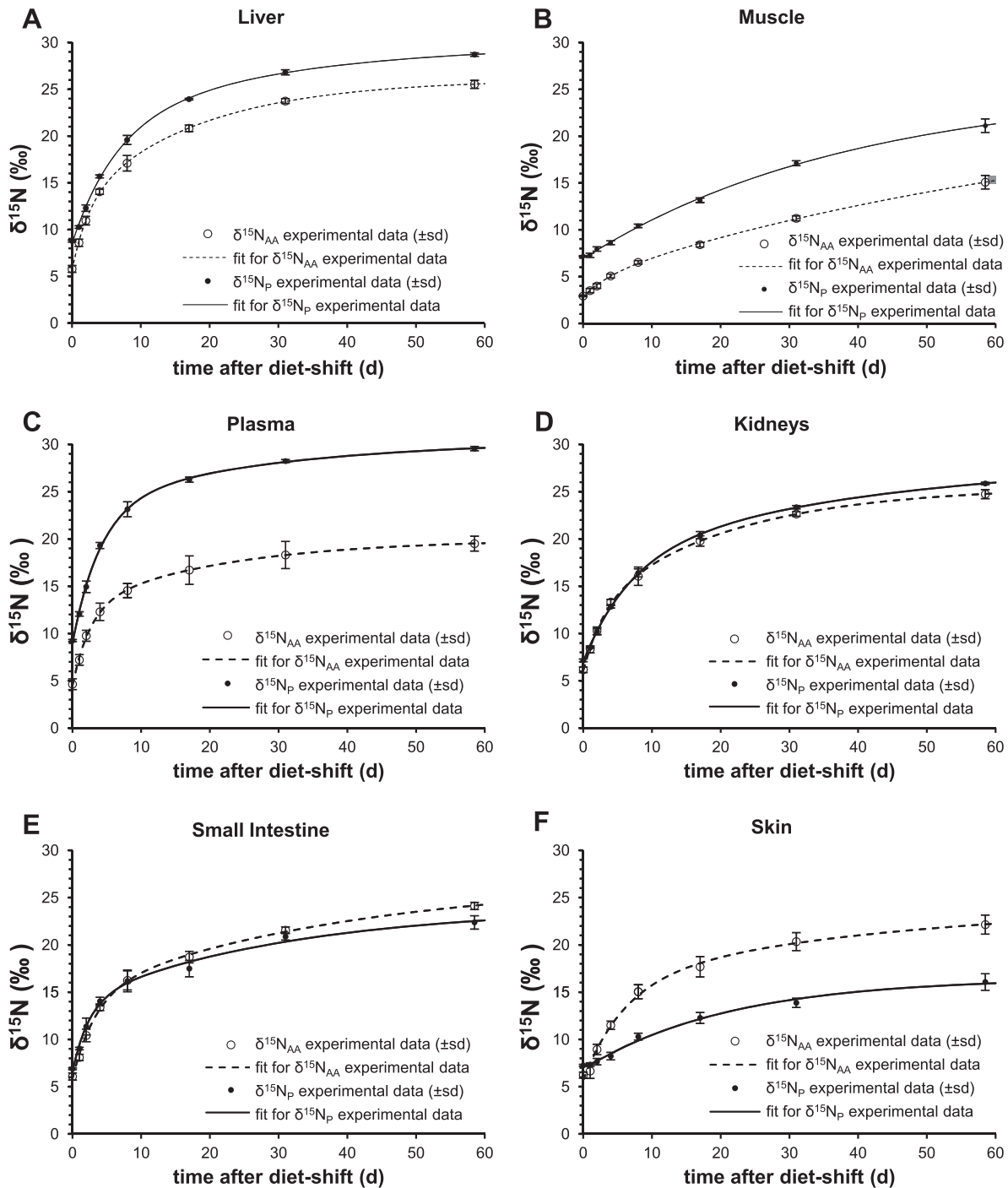


Fig. 2. Experimental $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ kinetics measured in tissues after diet shift. Experimental data (\circ and \bullet) are means \pm SD of $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$, respectively ($n = 5$ for sampling times 1–7 and $n = 8$ for sampling time 8) of liver (A), muscle (B), plasma (C), kidney (D), small intestine (E), and skin (F). Experimental $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ data were fit to sums of 2 exponential functions (dashed and solid lines, respectively).

particularly, in the P fraction (Fig. 4, D and E). In addition, an increase (decrease) in the FSR value exerted a different impact on the $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ kinetics, by increasing (lowering) $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ values while lowering (increasing) $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ values. Consequently, the difference between $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$, which is a major determinant for FSR estimation (see Eq. 3), was positively sensitive to variations in FSR. This effect was more marked but also more transient with the fast-FSR profile, with an impact that was significant only during the first 2 wk, by

comparison with the slow-FSR profile, where the effect was smaller but persisted for the entire 2-mo postshift period (Fig. 4, C and F). These results indicate that the early postshift period is the most informative with respect to FSR estimates in rapidly turning-over tissues, contrary to slowly turning-over tissues, where longer-term $\delta^{15}\text{N}$ kinetics remain informative regarding FSR values.

To test the validity of the method, we attempted to reestimate, from the noise-free and the noisy simulated data sets, the FSR

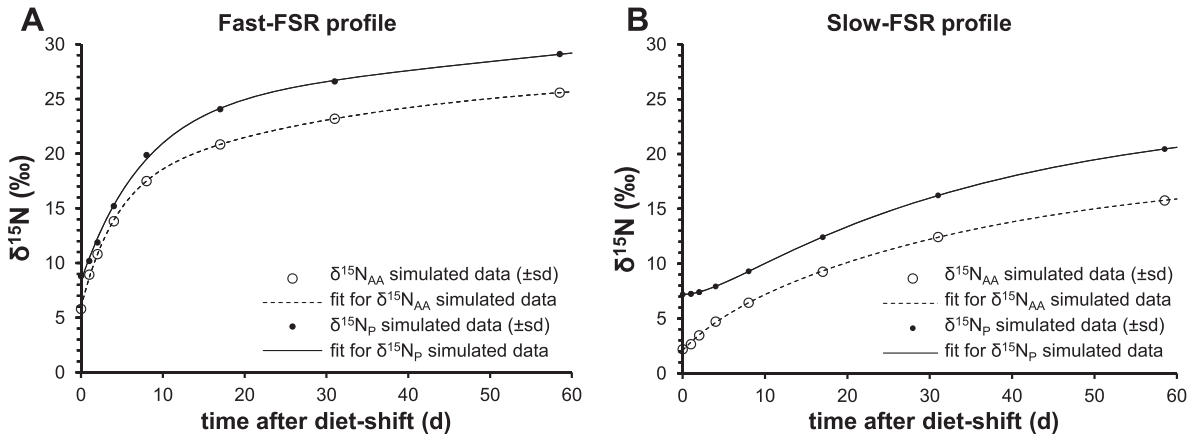


Fig. 3. $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ postshift kinetics simulated from a 2-compartment model for tissues with fast or slow FSR. Theoretical $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ kinetics with a fast-FSR profile (A) and a slow-FSR profile (B) were simulated at each sampling time using the 2-compartment model, with FSR values of 15 and 70%/day, respectively. Simulated data were fit to sums of 2 exponential functions (dashed and solid lines, respectively).

value used to generate those data. The FSR estimates and comparisons with the known true values are reported in Table 1. FSR values were estimated with a very good accuracy from the noise-free and noisy simulated data sets for both profiles, with a percent difference from known values (i.e., %error) of $\sim 4\%$ for the fast-FSR profile and 6% for the slow-FSR profile. The method also estimated FSR values with a very good precision (as shown by the small coefficients of variation of 7.5% and 12.5% for the fast- and slow-FSR profiles, respectively, when tested using the noisy simulated data sets).

Having identified the first 2 wk after the diet shift as the time period when $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ kinetics were most markedly impacted by the FSR value, we reestimated the FSR over experimental time periods < 2 mo (Fig. 5). For both profiles, the accuracy of FSR estimates was slightly improved when the sampling scheme was restricted to the first 2 wk [with an error of 2% (instead of 4%) and 4% (instead of 6%) for the fast- and slow-FSR profiles, respectively], while it was slightly impaired when the sampling scheme was limited to only 1 wk (with errors of 10% and 7% for the fast- and slow-FSR profiles, respectively). The precision of the FSR estimates was significantly impaired when the time period was shortened from 2 mo to 2 wk and 1 wk, with coefficients of variation that progressively rose from 7.5% to 10.6% and 21.7% for the fast-FSR profile and from 12.4% to 29.0% and 34.5% for the slow-FSR profile. These results show that, from a theoretical standpoint, the FSR in rapidly turning-over tissues can still be estimated with very good accuracy and precision when the experimental duration is limited to 2 wk, while for slowly turning-over tissues, this restriction does not affect the accuracy but impairs the precision of the estimates.

Numerical estimation of FSR in tissues from experimental data. Using the method thus developed, we were able to identify numerically FSR values from the experimental data obtained in liver, muscle, kidney, and plasma (Table 2). When taking into account the data measured over the whole 2-mo experimental period, we estimated FSR values of 103%/day in kidney, 101%/day in liver, 58%/day in plasma, and 11%/day in muscle. When this numerical estimation was performed using the data obtained only during the first 2 wk, we obtained new FSR estimates that were very close to those found previously for kidney (97%/day) and plasma (55%/day) but lower for liver (71%/day) and higher for muscle (18%/day).

Identification of the Degree of Compartmentation of P Metabolism for the Different Tissues

The fact that we were able to identify FSR values in liver, muscle, kidney, and plasma using the developed method indicates that the long-term processes of P breakdown and synthesis in such tissues are adequately described by the simple and standard precursor-product structure and dynamics assumed in our two-compartment model. By contrast, in the two other sampled tissues (small intestine and skin), our method generated null or negative values for FSR estimates or produced estimates that differed greatly, depending on the intervals chosen for the numerical resolution. As a result, we could not identify the model parameters from the experimental data sets obtained in these tissues, although our method was proven to be theoretically able to provide reliable FSR estimates from data sets simulated for a wide range of FSR values using our simple, precursor-product, two-compartment model. We concluded that this model is too simple to account for the variations in $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ in these tissues, likely because of the more complex compartmentation of the AA and P metabolism in such tissues.

To further investigate this point, we compared the ability of different models of increasing order to reproduce the $\delta^{15}\text{N}$ kinetic profiles observed in the AA and P fractions of skin and small intestine. In particular, we identified that the simplest models that adequately reproduced skin $\delta^{15}\text{N}$ kinetics were two different three-compartment models where the P fraction is represented by two distinct compartments, in a catenary or mammillary structure, with a nitrogen disappearance flux toward outside the system from one of them (Fig. 6). Using the SimBiology toolbox and a parameter optimization strategy under MATLAB for each of these three-compartment models, we found several distinct numerical parameterizations (i.e., values of transfer rates and discrimination coefficients) that produced satisfactory and similar fits between the model predictions and the $\delta^{15}\text{N}_{\text{A}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ kinetics observed in skin (Fig. 6C). More specifically, for both models, various parameterizations, including FSR values between 15 and 25%/day, enabled very good and similar fits, but this FSR estimation was not reliable because of numerical identifiability problems. For such three-compartment models, we were also unable to

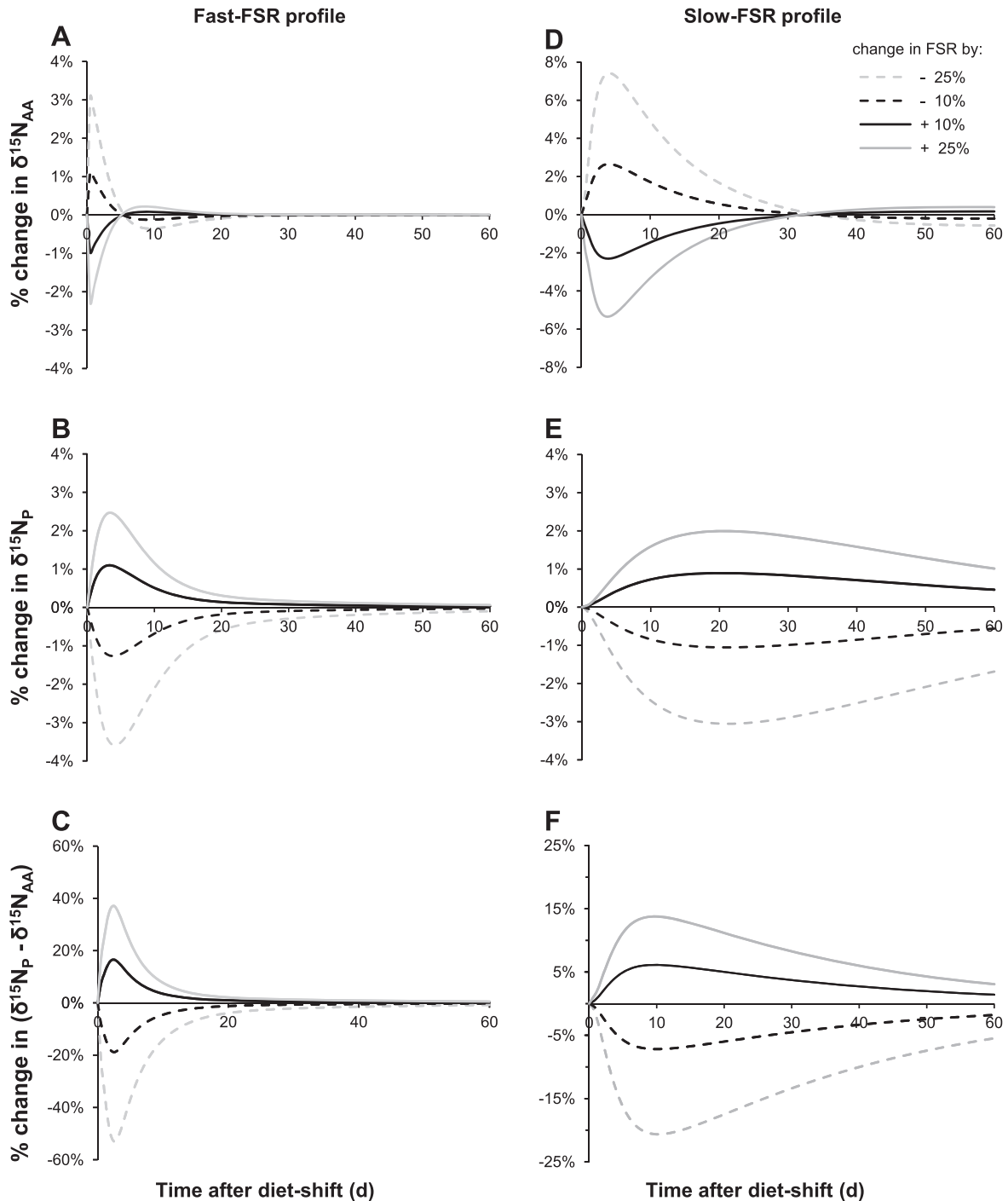


Fig. 4. Sensitivity of $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ kinetics to variations in FSR. Curves are percent changes in simulated $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ (A and D) and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ (B and E) compartments and effect on the $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ variable (C and F) when FSR was decreased or increased by 10% or 25% for the fast-FSR (left) and slow-FSR (right) simulated profiles (i.e., with FSR varying from 70 to 52.5, 63.0, 77.0, and 87.5%/day for the fast-FSR profile and from 15 to 11.3, 13.5, 16.5, and 18.8%/day for the slow-FSR profile).

implement an analytical method for FSR identification similar to that developed for the two-compartment model because of the greater complexity of the differential equation describing evolution of $\delta^{15}\text{N}$ in the total P fraction.

DISCUSSION

We have developed a new method for the investigation of P turnover in rat tissues over long periods of time that produces

global, integrated FSR values under sustained nutritional and physiological conditions. We demonstrated that a simple precursor-product model was sufficient to adequately describe P turnover under these averaged conditions in some tissues, such as liver and muscle, but was too simple and insufficient to reliably account for the complexity of P metabolism in other more compartmented tissues, such as small intestine and skin.

Table 1. FSR estimates from simulated data and comparison with true known values

Profile Type	True values	FSR, %/day			
		Estimates obtained from simulated data		With noise	
		Without noise	Value	CV, %	95% CI
Fast-FSR	70	67.1	67.2	7.5	57.3–77.0
Slow-FSR	15	14.1	14.1	12.4	10.7–17.5

Estimates are mean values obtained by averaging estimated fractional synthesis rate (FSR) from partitions of the whole time period into 3, 4, 5, 6, 10, 12, 15, 20, and 30 intervals. CV, coefficient of variation; CI, confidence interval.

Developed Method for FSR Estimation: Theoretical Validation and Application to Experimental Data

The method we developed relies on measurement of $\delta^{15}\text{N}$ kinetics in the AA and P fractions of tissues over a 2-mo period following a slight increase in the $\delta^{15}\text{N}$ of the diet and their numerical analysis using a simple two-compartment, precu-

Table 2. FSR estimates from experimental data

Tissue	FSR, %/day				
	Estimates from experimental data		Data from the literature		
	2-mo period	2-wk period	Mean \pm SD	n	Range
Kidney	103	97	67 \pm 21	16	29–93
Liver	101	71	83 \pm 19	43	48–131
Plasma	58	55	47 \pm 22	7	18–75
Muscle	11	18	9 \pm 3	52	4–20

FSR estimates from experimental data over the entire 2-mo experimental period were obtained from the data at 8 sampling times: 0, 1, 2, 4, 8, 17, 31, and 58 days. FSR estimates from the experimental data over 2 wk were obtained from the data at the first 6 sampling times (0, 1, 2, 4, 8, and 17 days). FSR values from the literature were obtained from studies performed in adult rats using classic tracer methods (Refs. 2, 3, 7–11, 13–18, 23–25, 29, 32–34, 37, 39, 40, 42–44, 50).

sor-product model for tissue P metabolism (Fig. 1). We validated this method theoretically by demonstrating its ability to provide FSR estimates with a good accuracy (<6% error) and precision (coefficient of variation <13%) from simulated $\delta^{15}\text{N}_\text{P}$ and $\delta^{15}\text{N}_\text{AA}$ kinetics (Table 1).

When applied to real experimental data sets, the method yielded reliable FSR estimates in liver, muscle, kidney, and plasma. These FSR estimates were within the ranges of those previously reported in the literature using different classic AA tracer methods (i.e., AA flooding dose or continuous infusion) in well-fed, healthy rats of similar age for all tissues except kidney, where our estimates were slightly above the range of the values in the literature (Table 2). However, FSR values in the literature varied considerably, depending on the studies, by up to five- or threefold for muscle or kidney, respectively. Given the singularity of our approach compared with classic AA tracer studies and the fact that FSR estimations in such studies appear to be strongly dependent on the particular method and specific experimental conditions (20, 26, 49, 52), comparisons between our results and the literature should remain qualitative only and cannot be used as an external validation of our approach. However, the ranking of tissues according to their FSR values was globally the same when comparing the results of the present method and mean data in the literature (Table 2). By contrast, our FSR estimate for kidney was as high as that for liver, while it is, on average, lower in the literature. Nevertheless, the separate studies that have concomitantly examined FSR values in kidney and liver have reported contrasting results, with FSR values lower than (7, 10, 13, 23, 34), similar to (7, 10, 14, 15), or even higher than (32) those in kidney than liver.

Specificity of the Developed Method and Practical Adaptability to Other Experimental Conditions

The formula that we used for FSR estimation (Fig. 1) is actually closely related to the FSR formula that was used in classic AA tracer studies (51); the difference was that two supplemental terms are subtracted from the denominator in our formula. Inclusion of these two terms is necessary to avoid the two usual simplifications that are false in our context and refers to the specificity of our approach.

The first added term (i.e., the area under the curve of $\delta^{15}\text{N}_\text{P}$) accounts for the fact that, during the time period under consideration, part of the ^{15}N -enriched AA (i.e., arising from the

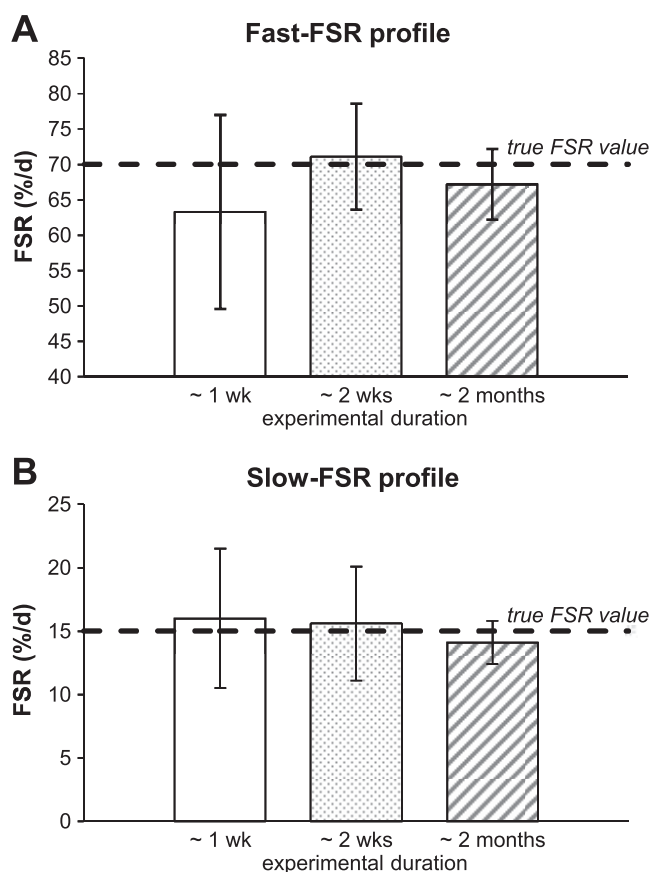
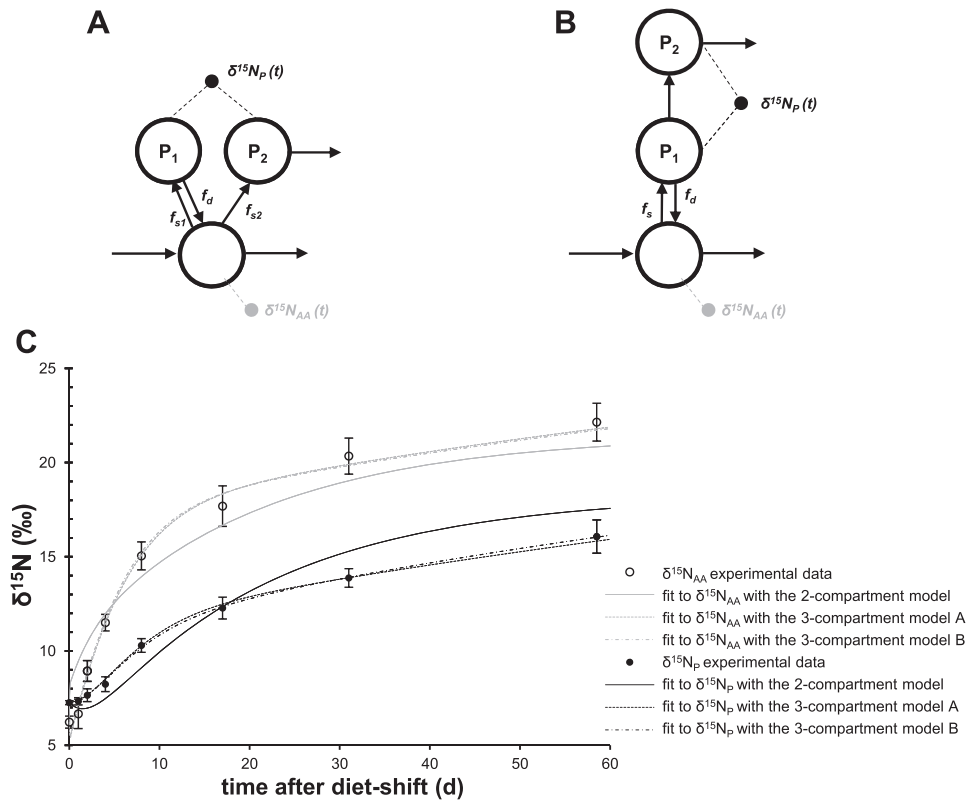


Fig. 5. FSR estimates obtained from noisy simulated data for fast-FSR (A) and slow-FSR (B) profiles, depending on duration of experimental period. Values are means \pm SD of FSR estimates from 100 noisy data sets simulated for each FSR profile, with estimations performed over experimental durations of ~1 wk, ~2 wk, and ~2 mo [i.e., with all the sampling times ($t = 0, 1, 2, 4, 8, 17, 31,$ and 58 days) for the ~2-mo duration, only the first 6 sampling times (corresponding to the 0- to 17-day period) for the ~2-wk duration, and the first 5 sampling times (corresponding to the 0- to 8-day period) for the ~1-wk duration].

Fig. 6. Ability of different models to fit $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ data in skin. Two 3-compartment candidate models [composed of 2 P compartments (P_1 and P_2) and 1 AA compartment (AA) in a mammillary (A) or a catenary (B) structure (A and B)] tested for their ability to better fit skin data than the 2-compartment model of Fig. 1. Dashed lines with bullets indicate experimental measurements of $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$, the nitrogen isotopic enrichments of the AA and P fractions of skin, respectively, with the P fraction being the sum of the P_1 and P_2 compartments. In C, solid, dashed, and dashed-dotted lines are model predictions obtained using the 2-compartment model, the 3-compartment model shown in A, and the 3-compartment model shown in B, respectively, that best fit the $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ experimental data. $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ (\circ) and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ (\bullet) experimental data are means \pm SD.



^{15}N -enriched diet) that is incorporated into P is then lost from P by proteolysis, returning to the free AA compartment. This term related to tracer recycling is usually neglected in the short-term AA tracer studies, because the loss of labeling from the P compartment through proteolysis is quantitatively small during a short experimental duration of a few minutes to a few hours. This postulate becomes, however, more questionable in studies investigating the FSR of rapidly turning-over P and/or in studies involving a longer AA infusion (47, 53). In this regard, the almost parallel evolution of $\delta^{15}\text{N}$ in the AA and P fractions (as evidenced in the data obtained over our 2-mo investigation) shows that the continuous AA reutilization is considerable and not negligible in our context. Because the approach we developed accounts for recycling, it enables estimates over long time periods.

The second added term relates to the overall isotopic effect associated with P turnover (i.e., $\epsilon_s - \epsilon_d$; see the APPENDIX for definitions) and accounts for the natural difference in $\delta^{15}\text{N}$ between the P and AA fractions at the isotopic steady state. On day 0 of the diet shift, we observed higher $\delta^{15}\text{N}$ values in the P fraction than in the AA fraction of all tissues, with absolute differences ranging from $\sim 1\%$ to 6%. This is consistent with our previous report that, at natural abundance levels, $\delta^{15}\text{N}$ values are higher in the P fraction than in the AA fraction in most rat tissues (38). This difference in $\delta^{15}\text{N}$ between the P and AA fractions is linked to the existence of isotopic effects throughout one or several of the metabolic pathways within tissues, with a preferential utilization of AA containing the lighter (^{14}N), rather than the heavier (^{15}N), nitrogen isotope during metabolic interconversions of AA (30), P synthesis (45), and/or P breakdown (46). Inclusion of fractionation factors (i.e., ϵ_s and ϵ_d) in our mathematical representation

appropriately accounts for these isotopic effects and their impact on the difference between $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ at the isotopic equilibrium. In AA tracer studies, isotopic effects are neglected, because in this context the levels of AA enrichments are much higher than natural levels. By contrast, in our case, the term relative to the net isotopic effect (i.e., $\Delta\epsilon = \epsilon\epsilon_s - \epsilon_d$) was required and was not negligible compared with the other denominator terms, because our postshift diet was only slightly ^{15}N -enriched, so that postshift $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ values remained of the same order of magnitude as $\Delta\epsilon$.

Another specificity of our method is that it uses nitrogen, and not a specific AA, as the tracer, so that it provides mean FSR estimates for all individual AA in the precursor pool, whereas other methods produce FSR values that may vary according to the AA chosen as the tracer.

Our approach can be applied in the case of nongrowing tissues (i.e., elemental steady state) or in the presence of a significant P accretion and fractional rate of growth (FGR), by using the simplified Eq. 3 or the nonsimplified Eq. 4, respectively, for FSR estimation (with Eq. 4 including a supplemental positive term proportional to the FGR, i.e., $\text{FGR} \times \epsilon_d \times \Delta t$; see the APPENDIX). In this study, the rats were in their late phase of growth during the 2-mo experimental period, and we used the simplified Eq. 3, because the nitrogen sizes of the plasma and tissue AA and P fractions were constant or displayed only a moderate increase, with a null or negligible FGR value relative to the FSR value in each tissue. Only plasma and muscle had nonnull FGR values, which were $\sim 0.4\%$ /day and, thus, negligible by comparison with their estimated FSR of 58 and 11%/day, respectively (the term $\text{FGR} \times \epsilon_d \times \Delta t$ was 10–50 times smaller than the other terms of the equation for plasma and muscle, and we verified that it could be disregarded with

no effect on FSR estimates). However, by using the nonsimplified Eq. 4, our method could usefully be applied to any condition in which P synthesis differs from P degradation, such as the anabolic or catabolic conditions of net P accretion or loss, respectively (e.g., growth, exercise, malnutrition, sarcopenia, and diabetes). In such contexts, our method could be used to concomitantly estimate the FSR and fractional degradation rate (FDR) when measuring the FGR (since $FDR = FSR - FGR$). This would be particularly useful in nutrition and health studies investigating the ability of a given diet or treatment to modulate the balance between P synthesis and degradation.

Furthermore, under our long-term approach, the question of using a time window that is truly informative regarding FSR values was of particular importance. As detected from the sensitivity analysis performed on our simulated data, late $\delta^{15}\text{N}$ kinetics were less informative than early $\delta^{15}\text{N}$ kinetics with respect to FSR values, particularly in rapidly turning-over tissues. For the fast-FSR profile, the time point from which $\delta^{15}\text{N}$ kinetics were no longer informative regarding the FSR value (~ 2 wk; Fig. 4C) was nevertheless delayed compared with the time necessary to reach complete elemental turnover (~ 2 days, given the FSR value of 70%/day). This was because $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ levels rose slowly and gradually after the diet shift, so that FSR durably impacted the coupled $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ kinetics (and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$, which is a major determinant for FSR estimation; see Eq. 3), despite a rapid transfer to $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ of $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ variations. Indeed, the dietary AA inflow that induced the $\delta^{15}\text{N}$ shift in tissues was small compared with the endogenous AA fluxes between and within tissues, which slowed the $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ rise to plateau by continuously reintroducing ^{15}N enrichment levels lower than that of the diet, for as long as each body pool (even those with a slow turnover) had not reached its new isotopic steady state (as reflected by the fact that none of the body pools had reached its isotopic steady state after 2 mo; Fig. 2). From these results, a practical adaptation of our versatile approach could consist in assessing FSR over periods shorter than the 2-mo period used in this study. As shown using noisy simulated data, restricting the experimental duration to 2 wk did not affect the accuracy of FSR estimates but impaired their precision, and more markedly for the slowly than for the rapidly turning-over tissues. This impaired precision may have resulted from numerical considerations, because fitting $\delta^{15}\text{N}$ postshift kinetics to sums of two exponential functions is more subject to error when the number of data points is decreased, particularly for tissues with a slow FSR, for which there is a greater uncertainty concerning the plateau values. Accordingly, when our approach is applied to the experimental data, the 2-mo and 2-wk FSR estimates differed more in muscle than in other tissues (Table 2), probably because the 2-wk FSR estimate was less accurate in such a slowly turning-over tissue, because of a greater impact of the experimental noise. To enable its application to shorter-term studies, it would be useful to adapt the experimental scheme to better characterize early postshift kinetics and reduce uncertainty in the fits. This could be achieved by increasing the number of sampling times and/or animals per sampling time over the shortened experimental duration. Finally, even if the truly informative time window is shorter if the FSR is high, longer-term values would remain useful on numerical grounds, since they do not deteriorate accuracy but ameliorate the precision of FSR estimations (by reducing the uncertainty of plateau $\delta^{15}\text{N}$ values). Con-

sequently, whatever the FSR profile, it will always be useful to integrate long-term periods in the time window used for FSR estimation, whereas for a fast-FSR profile, omitting the truly informative, short-term period has a marked effect on the FSR estimation.

Cognitive Insights Into the P Metabolism of Tissues

We showed that although it is based on simplifying hypotheses, the representation of P turnover by a two-compartment model with a precursor-product structure is sufficient to account for the processes of P synthesis and breakdown in tissues such as liver, muscle, and kidney. By contrast, this precursor-product structure is too simple to adequately represent P turnover in skin and small intestine, which would require a model with more compartments and/or transfer pathways. Indeed, it is very likely that, in those tissues, the P or the AA compartment or both are not homogeneous and cannot be approximated by a single compartment. Consequently, a higher degree of compartmentation may be required for the AA pool, if the AA used as precursors for P synthesis and the AA derived from P breakdown do not mix, and/or for the P pool, if the tissue is composed of different P having distinct turnover rates.

In skin, the shape of the $\delta^{15}\text{N}$ kinetic curves was quite atypical, with $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ kinetic curves that were less parallel than in other tissues, as $\delta^{15}\text{N}$ evolved particularly slowly in the P fraction. These kinetics could not be adequately fitted with our simple two-compartment model but were closely reproduced using a three-compartment structure that distinguished between two P compartments and included a flux of P disappearance from one of the compartments toward outside the system (Fig. 6). This more complex structure is actually consistent with the anatomy and physiology of skin, which is composed of two main layers, the dermis and the epidermis, which consist of different P (mostly collagen and keratin, respectively) with distinct turnover rates (55), and undergoes a direct loss of P by desquamation of the superficial epidermis. Interestingly, our results show that P turnover in skin involves a compartmentation of the P pool that probably results from its kinetic and spatial heterogeneity.

By contrast, concerning the small intestine, which we also identified as having a more compartmented P metabolism, the same three-compartment model accounting for P heterogeneity and desquamation did not enable a fit to its observed $\delta^{15}\text{N}$ kinetics. In this tissue, the compartmentation issue thus certainly also or rather involves the AA pool and, considering just one single and homogeneous AA compartment, probably constitutes an inadequate oversimplification. Indeed, the AA pool of the small intestine is probably highly heterogeneous, because AA arise from various sources (i.e., dietary and endogenous AA absorbed from the lumen, endogenous AA supplied via the artery, and AA derived from constitutive P breakdown) and are probably not uniformly mixed and indistinctly used for P synthesis. Extracellular AA (e.g., AA from plasma and/or the intestinal lumen) may be preferentially and directly supplied to P synthesis in this tissue through channeling without mixing with the intracellular pool (28, 52). As a result, the AA used for P synthesis and the AA derived from P breakdown would not completely mix and would have distinct $\delta^{15}\text{N}$ values. This specific compartmentation cannot be accounted for by a simple

model in which all AA are indiscriminately represented by one single AA compartment but would, instead, require a model that distinguishes two AA compartments, corresponding, respectively, to the AA precursors of P synthesis and those arising from P breakdown, as in some previously proposed theoretical representations (1, 35). Compartmentation of the AA pool is further supported by the differences in the isotopic enrichments of aminoacyl-tRNA (the true precursor for P synthesis) and intracellular AA in several tracer studies (1, 48, 52). In our study, the evolutions of the $\delta^{15}\text{N}$ were very similar in the sampled AA and P fractions of the small intestine (Fig. 2E), which is consistent with the hypothesis that the tissue free AA pool mainly represents AA arising from proteolysis in this tissue.

It should be noted that in plasma, where the P pool assembles P of different natures and origins, the precursors of protein synthesis are diverse (liver and, to a lesser extent, intestinal AA) and distinct from the products of proteolysis, since plasma P breakdown probably occurs in different tissues throughout the body (52). Consistent with this notion, we failed to estimate a plasma FSR value from our two-compartment model when using liver or intestinal data as $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ values but succeeded when using plasma data. Although plasma AA were neither the true precursors nor the true products of plasma P synthesis and degradation, respectively, they were a valuable isotopic proxy for both, inasmuch as they provided a reasonable FSR estimate. This shows that it sometimes remains possible to find a way to estimate FSR by minimal modeling using a simple precursor-product structure, although the compartmentation is actually more complex.

Conclusions

We have demonstrated that the long-term evolutions of the $\delta^{15}\text{N}$ in the AA and P fractions of a tissue, following a change in the $\delta^{15}\text{N}$ of the diet, provide valuable cognitive and practical insights into its P metabolism. We evidenced that, for some tissues, such as liver, kidney, and muscle, a simple precursor-product model is well suited to describing the dynamics of P turnover, meaning that the AA and P pools are kinetically homogeneous enough to be each considered a single compartment. In these cases, we developed a numerical method that enables the determination of accurate and precise tissue FSR estimates from the $\delta^{15}\text{N}$ kinetics in the tissue P and AA fractions. Such FSR estimates represent integrated and averaged synthesis rates for all tissue P, on the condition that the time window is sufficiently broad to integrate rapidly and slowly turning-over P, and for all individual AA considered as a whole as precursors of P synthesis, over long periods of time and under real, nonartificially disturbed physiological conditions. On the basis of the $\delta^{15}\text{N}$ profiles, we also highlighted the fact that P turnover in skin and small intestine is too complex to be adequately described using a simple two-compartment model because of a higher degree of compartmentation in P and/or AA, which is consistent with the fact that the nutritional regulation of P turnover seems to be more atypical and complex in epithelia than in other tissues (4, 6, 54).

Perspectives and Significance

Our approach provides long-term FSR estimates that integrate the many diurnal variations in P kinetics that occur under

sustained nutritional and physiological conditions; this feature is of particular interest to evaluating the global, integrated response of P turnover to a specific diet or treatment in nutrition and health. Furthermore, our approach provides new and important information regarding the structure and functioning of P turnover. Of the tissues sampled, only the intestine was identified as having a compartmentalized AA pool, probably because of the direct channeling of dietary and/or plasma AA for P synthesis. In the case of a substantial channeling of dietary AA, intestinal P synthesis would, to a great extent, be dependent on dietary AA input, which may explain why intestinal P synthesis is particularly sensitive to the route of nutrient supply, with parenteral (vs. enteral) nutrition leading to impaired protein synthesis and tissue atrophy (4). Interestingly, such a compartmentalized metabolism of precursor AA could be regarded as the organization that enables the intestine to fulfill the role imposed by its peculiar location: as the first organ to receive the nutrient influx, the intestine is expected to deal differentially with luminal and arterial AA, with specific utilization of dietary AA in the fed state to ensure maintenance of the intestinal P pool (because of its functional role in the absorptive capacity of the organism) and to moderate the postprandial rise in systemic AA concentrations (because the intestine ensures the homeodynamic control of nutrient transfer to plasma and tissues). Our approach may therefore constitute a promising tool to unravel the structural and functional characteristics of P metabolism in tissues.

APPENDIX

Here, we describe in detail the mathematical representation of the model presented in Fig. 1 and the derivation of the model equations Eqs. 1 and 2.

We used a simple two-compartment precursor-product structure, where the precursor compartment represents the free AA used for P synthesis and the product compartment represents the tissue P, to model AA and P metabolism in a given tissue. In this simple mathematical representation of the system, each of the two compartments is defined by two state variables: its total nitrogen content (N_{AA} and N_{P} , respectively) and its nitrogen isotopic enrichment ($\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ and $\delta^{15}\text{N}_{\text{P}}$, respectively).

The fluxes of total nitrogen ($N = {}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N}$) and heavy nitrogen isotope (${}^{15}\text{N}$) between the model compartments were assumed to follow the mass action law and were modeled using the following equations

$$f_s(t) = k_s \times N_{\text{AA}}(t) \text{ and } {}^{15}f_s(t) = {}^{15}k_s \times {}^{15}N_{\text{AA}}(t)$$

$$f_d(t) = k_d \times N_{\text{P}}(t) \text{ and } {}^{15}f_d(t) = {}^{15}k_d \times {}^{15}N_{\text{P}}(t)$$

$$f_e(t) = k_e \times N_{\text{AA}}(t) \text{ and } {}^{15}f_e(t) = {}^{15}k_e \times {}^{15}N_{\text{AA}}(t)$$

where N_{AA} (${}^{15}N_{\text{AA}}$) and N_{P} (${}^{15}N_{\text{P}}$) represent the amount of total (heavy) nitrogen isotope in compartments AA and P, respectively, f_s (${}^{15}f_s$), f_d (${}^{15}f_d$), and f_e (${}^{15}f_e$) represent the instantaneous fluxes of total (heavy) nitrogen transfer from AA to P through P synthesis, from P to AA through P breakdown, and from AA to the outside of the system through AA export toward the plasma, respectively, and k_s (${}^{15}k_s$), k_d (${}^{15}k_d$), and k_e (${}^{15}k_e$) are the corresponding exchange rate constants for total (heavy) nitrogen. Because the biochemical processes involved in the metabolic reactions are sensitive to the isotope masses, the lighter nitrogen isotope (${}^{14}\text{N}$) tends to react faster than the heavier nitrogen isotope (${}^{15}\text{N}$), and isotope fractionation occurs during some metabolic reactions (30, 45, 46). To account for this potential isotope fraction-

ation, we assumed that the exchange rate constants would be different for total nitrogen and ¹⁵N.

According to the mass conservation principle, the evolutions of total (heavy) nitrogen isotope in the AA and P compartments are described by the following equations

$$\frac{dN_P}{dt} = f_s - f_d, \tag{A1}$$

with $\frac{dN_P}{dt} = 0$ by hypothesis, so that $f_s = f_d$

$$\frac{dN_{AA}}{dt} = f_0 - f_e + f_d - f_s, \tag{A2}$$

with $\frac{dN_{AA}}{dt} = 0$ by hypothesis, so that $f_0 = f_e$

$$\frac{d^{15}N_{AA}(t)}{dt} = {}^{15}f_0(t) - {}^{15}f_e(t) + {}^{15}f_d(t) - {}^{15}f_s(t) \tag{A3}$$

$$\frac{d^{15}N_P(t)}{dt} = {}^{15}f_s(t) - {}^{15}f_d(t) \tag{A4}$$

where f_0 (¹⁵ f_0) represents the instantaneous flux of total (heavy) nitrogen transfer into AA from outside the system, i.e., from plasma. The simplifications in *Eqs. A1* and *A2* derived from the assumption that tissues have reached an elemental steady state at the time of the diet shift, i.e., that the amounts of total nitrogen in the compartments and the total nitrogen fluxes are constant.

By introducing the nitrogen fractional abundance F , defined as $F = {}^{15}N/N$, the amounts of ¹⁵N in the AA and P pools can be expressed as

$${}^{15}N_{AA}(t) = N_{AA} \times F_{AA}(t)$$

$${}^{15}N_P(t) = N_P \times F_P(t)$$

where F_{AA} and F_P are the fractional abundances in the AA and P pools, respectively.

Similarly, one can express the amounts of ¹⁵N that are instantaneously exchanged between the model pools as

$${}^{15}f_s(t) = f_s \times F_s(t)$$

$${}^{15}f_d(t) = f_d \times F_d(t)$$

$${}^{15}f_e(t) = f_e \times F_e(t)$$

$${}^{15}f_0(t) = f_0 \times F_0(t)$$

where F_s , F_d , F_e , and F_0 are the fractional abundances in the corresponding instantaneous N fluxes f_s , f_d , f_e , and f_0 .

Using the F notations and applying the Leibniz rule to calculate the derivatives of $(N_P \times F_P)$ and $(N_{AA} \times F_{AA})$, we can rewrite *Eqs. A3* and *A4* as follows

$$N_{AA} \times \frac{d[F_{AA}(t)]}{dt} + F_{AA}(t) \times \frac{d(N_{AA})}{dt} = f_0 \times F_0(t) - f_e \times F_e(t) + f_d \times F_d(t) - f_s \times F_s(t) \tag{A5}$$

$$N_P \times \frac{d[F_P(t)]}{dt} + F_P(t) \times \frac{d(N_P)}{dt} = f_s \times F_s(t) - f_d \times F_d(t) \tag{A6}$$

which, under the steady-state assumptions for N_{AA} and N_P and combined with *Eqs. A1* and *A2*, simplify to

$$\frac{d[F_{AA}(t)]}{dt} = \frac{f_0}{N_{AA}} \times [F_0(t) - F_e(t)] + \frac{f_s}{N_{AA}} \times [F_d(t) - F_s(t)] \tag{A7}$$

$$\frac{d[F_P(t)]}{dt} = \frac{f_s}{N_P} \times [F_s(t) - F_d(t)] \tag{A8}$$

To express the model equations (*Eqs. A7* and *A8*) using the delta notations ($\delta^{15}N$), we approximated the fractional abundance F (¹⁵ N/N) by the isotope ratio R (¹⁵ $N/^{14}N$) so that

$$F \approx R = R_{\text{standard}} \times \left(\frac{\delta}{1,000} + 1 \right)$$

where R_{standard} is the nitrogen isotope ratio for the internationally defined standard (atmospheric N_2 , $R_{\text{standard}} = 0.0036765$).

Equations for the evolutions of the nitrogen isotopic enrichments in the AA ($\delta^{15}N_{AA}$) and P ($\delta^{15}N_P$) compartments can thus be derived from *Eqs. A7* and *A8* as follows

$$\frac{d[\delta^{15}N_{AA}(t)]}{dt} = \frac{f_0}{N_{AA}} \times [\delta^{15}N_0(t) - \delta^{15}N_e(t)] + \frac{f_s}{N_{AA}} \times [\delta^{15}N_d(t) - \delta^{15}N_s(t)] \tag{A9}$$

$$\frac{d[\delta^{15}N_P(t)]}{dt} = \frac{f_s}{N_P} \times [\delta^{15}N_s(t) - \delta^{15}N_d(t)] \tag{A10}$$

where $\delta^{15}N_s$, $\delta^{15}N_d$, $\delta^{15}N_e$, and $\delta^{15}N_0$ are the isotopic enrichments of the f_s , f_d , f_e , and f_0 instantaneous fluxes, respectively.

We defined ϵ_s , ϵ_d , and ϵ_e , the constant isotope effects associated with P synthesis, P breakdown, and AA export, as the difference between the isotopic enrichment of the instantaneous flux and that of its precursor pool, which yields the following equations

$$\epsilon_s = \delta^{15}N_s(t) - \delta^{15}N_{AA}(t)$$

$$\epsilon_d = \delta^{15}N_d(t) - \delta^{15}N_P(t)$$

$$\epsilon_e = \delta^{15}N_e(t) - \delta^{15}N_P(t)$$

These relationships are usual approximations derived from the exact relationship $\epsilon_{P/R} = (\alpha_{P/R} - 1) \times 1,000$, where the isotope fractionation factor $\alpha_{P/R}$ associated with a reaction linking R and P is defined as $\alpha_{P/R} = R_{P_i}/R_R \approx F_{P_i}/F_R = {}^{15}k_{P/R}/k_{P/R}$, where R_{P_i} and R_R are the isotope ratios in the instantaneous product (Pi) and reactant (R), respectively, and F_{P_i} and F_R are their fractional abundances (31).

We also defined the P FSR as the amount of P that is synthesized per day, relative to the size of the P pool

$$\text{FSR} = f_s/N_P$$

Using the ϵ and FSR notations, we can rewrite *Eqs. A9* and *A10* to yield the final equations describing the evolutions of the nitrogen isotopic enrichments in the AA and P compartments (see *Eqs. 1* and *2*, respectively)

$$\frac{d[\delta^{15}N_{AA}(t)]}{dt} = \frac{f_0}{N_{AA}} \times [\delta^{15}N_0(t) - \delta^{15}N_{AA}(t) - \epsilon_e] + \text{FSR} \times \frac{N_P}{N_{AA}} \times [\delta^{15}N_P(t) - \delta^{15}N_{AA}(t) + \epsilon_d - \epsilon_s] \tag{A11}$$

$$\frac{d[\delta^{15}N_P(t)]}{dt} = \text{FSR} \times [\delta^{15}N_{AA}(t) - \delta^{15}N_P(t) + \epsilon_s - \epsilon_d] \tag{A12}$$

At isotopic equilibrium, i.e., when $d[\delta^{15}N_P(t)]/dt = 0$, then $\Delta\epsilon = \epsilon_s - \epsilon_d = \delta^{15}N_P - \delta^{15}N_{AA}$.

By integrating *Eq. A12*, the change in $\delta^{15}N$ in the P compartment over a time interval Δt can be expressed as

$$\delta^{15}N_P(t) = \text{FSR} \times \left[\int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}N_A(t) \cdot dt - \int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}N_P(t) \cdot dt \right] + \text{FSR} \times \Delta\epsilon \times \Delta t \tag{A13}$$

where $\Delta\delta^{15}N_P(t) = \delta^{15}N_P(t + \Delta t) - \delta^{15}N_P(t)$ and $\Delta\epsilon = (\epsilon_s - \epsilon_d)$.

When N_{AA} and N_P are not assumed to be in steady state, *Eq. A13* is modified as follows

$$\Delta\delta^{15}\text{N}_P(t) = \text{FSR} \times \left[\int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}\text{N}_A(t) \cdot dt - \int_t^{t+\Delta t} \delta^{15}\text{N}_P(t) \cdot dt \right] + \text{FSR} \times \Delta\varepsilon \times \Delta t + \text{FGR} \times \varepsilon_d \times \Delta t \quad (A14)$$

where FGR is the fractional growth rate of the P compartment, defined as $\text{FGR} = 1/\text{N}_P \times d\text{N}_P/dt$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Sebilo and his research team BIOEMCO (UMR 7618, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) for supplying the internal standard for isotopic measurements and the three anonymous reviewers for useful comments on the earlier version of the manuscript.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

N.P. and H.F. are responsible for conception and design of the research; N.P., J.-F.H., F.M., C.B., and H.F. performed the experiments; N.P. and H.F. analyzed the data; N.P., J.-F.H., F.M., and H.F. interpreted the results of the experiments; N.P. prepared the figures; N.P. and H.F. drafted the manuscript; N.P., J.-F.H., F.M., D.T., and H.F. edited and revised the manuscript; N.P., J.-F.H., F.M., D.T., and H.F. approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Airhart J, Vidrich A, Khairallah EA. Compartmentation of free amino acids for protein synthesis in rat liver. *Biochem J* 140: 539–545, 1974.
- Baillie AG, Garlick PJ. Attenuated responses of muscle protein synthesis to fasting and insulin in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 262: E1–E5, 1992.
- Baillie AG, Garlick PJ. Protein synthesis in adult skeletal muscle after tenotomy: responses to fasting and insulin infusion. *J Appl Physiol* 71: 1020–1024, 1991.
- Baracos VE, Samuels SE, Adegoke OA. Anabolic and catabolic mediators of intestinal protein turnover: a new experimental approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3: 183–189, 2000.
- Bijsterbosch MK, Duursma AM, Bouma JMW, Gruber M. The plasma-volume of the Wistar rat in relation to the body-weight. *Experientia* 37: 381–382, 1981.
- Biolo G, Gastaldelli A, Zhang XJ, Wolfe RR. Protein synthesis and breakdown in skin and muscle: a leg model of amino acid kinetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 267: E467–E474, 1994.
- Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, Blachier F, Tome D, Bos C. Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab* 8: 52, 2011.
- Cherel Y, Attaix D, Rosolowska-Huszcz D, Belkhou R, Robin JP, Arnal M, Le Maho Y. Whole-body and tissue protein synthesis during brief and prolonged fasting in the rat. *Clin Sci (Lond)* 81: 611–619, 1991.
- Chevalier L, Bos C, Azzout-Marniche D, Dardevet D, Tome D, Gaudichon C. Dietary protein regulates hepatic constitutive protein anabolism in rats in a dose-dependent manner and independently of energy nutrient composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R1720–R1730, 2010.
- Chevalier L, Bos C, Gryson C, Luengo C, Walrand S, Tome D, Boirie Y, Gaudichon C. High-protein diets differentially modulate protein content and protein synthesis in visceral and peripheral tissues in rats. *Nutrition* 25: 932–939, 2009.
- Danicke S, Nieto R, Lobley GE, Fuller MF, Brown DS, Milne E, Calder AG, Chen S, Grant I, Bottcher W. Responses in the absorptive phase in muscle and liver protein synthesis rates of growing rats. *Arch Tierernahr* 52: 41–52, 1999.
- Davis TA, Reeds PJ. Of flux and flooding: the advantages and problems of different isotopic methods for quantifying protein turnover in vivo. II. Methods based on the incorporation of a tracer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4: 51–56, 2001.
- El Yousfi M, Breuille D, Papet I, Blum S, Andre M, Mosoni L, Denis P, Buffiere C, Obled C. Increased tissue protein synthesis during spontaneous inflammatory bowel disease in HLA-B27 rats. *Clin Sci (Lond)* 105: 437–446, 2003.
- Estornell E, Barber T, Cabo J. Protein synthesis in vivo in rats fed on lipid-rich liquid diets. *Br J Nutr* 72: 509–517, 1994.
- Estornell E, Cabo J, Barber T. Protein synthesis is stimulated in nutritionally obese rats. *J Nutr* 125: 1309–1315, 1995.
- Faure M, Chone F, Mettraux C, Godin JP, Bechereau F, Vuichoud J, Papet I, Breuille D, Obled C. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. *J Nutr* 137: 1802–1807, 2007.
- Faure M, Moënoz D, Montigon F, Fay LB, Breuille D, Finot PA, Ballevre O, Boza J. Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Anal Biochem* 307: 244–251, 2002.
- Faure M, Moënoz D, Montigon F, Mettraux C, Breuille D, Ballèvre O. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *J Nutr* 135: 486–491, 2005.
- Fouillet H, Bos C, Gaudichon C, Tome D. Approaches to quantifying protein metabolism in response to nutrient ingestion. *J Nutr* 132: 3208S–3218S, 2002.
- Garlick PJ, McNurlan MA, Essen P, Wernerman J. Measurement of tissue protein synthesis rates in vivo: a critical analysis of contrasting methods. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 266: E287–E297, 1994.
- Gasier HG, Riechman SE, Wiggs MP, Previs SF, Fluckey JD. A comparison of ²H₂O and phenylalanine flooding dose to investigate muscle protein synthesis with acute exercise in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E252–E259, 2009.
- Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Dare S, Tome D, Metges CC. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology* 123: 50–59, 2002.
- Goldspink DF, Kelly FJ. Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from the foetus to senility. *Biochem J* 217: 507–516, 1984.
- Jeejeebhoy KN, Bruce-Robertson A, Ho J, Soddke U. The effect of cortisol on the synthesis of rat plasma albumin, fibrinogen and transferrin. *Biochem J* 130: 533–538, 1972.
- Jepson MM, Bates PC, Millward DJ. The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *Br J Nutr* 59: 397–415, 1988.
- Johnson HA, Baldwin RL, France J, Calvert CC. A model of whole-body protein turnover based on leucine kinetics in rodents. *J Nutr* 129: 728–739, 1999.
- Johnson HA, Baldwin RL, France J, Calvert CC. Recycling, channeling and heterogeneous protein turnover estimation using a model of whole-body protein turnover based on leucine kinetics in rodents. *J Nutr* 129: 740–750, 1999.
- Johnson HA, Baldwin RL, Klasing KC, Calvert CC. Impact of separating amino acids between plasma, extracellular and intracellular compartments on estimating protein synthesis in rodents. *Amino Acids* 20: 389–400, 2001.
- Laurent BC, Moldawer LL, Young VR, Bistran BR, Blackburn GL. Whole-body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 246: E444–E451, 1984.
- Macko SA, Estep MLF, Engel MH, Hare PE. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino-acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 50: 2143–2146, 1986.
- Mariotti F, Mariotti F, Champigny ML, Amarger N, Moysse A. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of NO₃⁻ by pearl-millet. *Plant Physiol* 69: 880–884, 1982.
- Masanés RM, Fernández-López JA, Alemany M, Remesar X, Rafecas I. Effect of dietary protein content on tissue protein synthesis rates in Zucker lean rats. *Nutr Res* 19: 1017–1010, 1999.
- McNurlan MA, Fern EB, Garlick PJ. Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo. *Biochem J* 204: 831–838, 1982.
- Mercier S, Breuille D, Mosoni L, Obled C, Patureau Mirand P. Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J Nutr* 132: 1921–1928, 2002.
- Mortimore GE, Woodside KH, Henry JE. Compartmentation of free valine and its relation to protein turnover in perfused rat liver. *J Biol Chem* 247: 2776–2784, 1972.
- Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY, Mirand PP. Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268: E328–E335, 1995.
- Papet I, Dardevet D, Sornet C, Bechereau F, Prugnaud J, Pouyet C, Obled C. Acute phase protein levels and thymus, spleen and plasma protein synthesis rates differ in adult and old rats. *J Nutr* 133: 215–219, 2003.

38. **Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau JF, Tome D, Fouillet H.** The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet N discrimination factors in laboratory rats. *PLoS One* 6: e28046, 2011.
39. **Preedy VR, Garlick PJ.** Protein synthesis in skeletal muscle of the perfused rat hemicorpus compared with rates in the intact animal. *Biochem J* 214: 433–442, 1983.
40. **Preedy VR, McNurlan MA, Garlick PJ.** Protein synthesis in skin and bone of the young rat. *Br J Nutr* 49: 517–523, 1983.
41. **Reeds PJ, Davis TA.** Of flux and flooding: the advantages and problems of different isotopic methods for quantifying protein turnover in vivo. I. Methods based on the dilution of a tracer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2: 23–28, 1999.
42. **Ruot B, Bechereau F, Bayle G, Breuille D, Obled C.** The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process. *Clin Sci (Lond)* 102: 107–114, 2002.
43. **Ruot B, Breuille D, Rambourdin F, Bayle G, Capitan P, Obled C.** Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E244–E251, 2000.
44. **Samuels SE, Taillandier D, Arousseau E, Cherel Y, Le Maho Y, Arnal M, Attaix D.** Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 271: E232–E238, 1996.
45. **Seila AC, Okuda K, Nunez S, Seila AF, Strobel SA.** Kinetic isotope effect analysis of the ribosomal peptidyl transferase reaction. *Biochemistry* 44: 4018–4027, 2005.
46. **Silfer JA, Engel MH, Macko SA.** Kinetic fractionation of stable carbon and nitrogen isotopes during peptide-bond hydrolysis—experimental-evidence and geochemical implications. *Chem Geol* 101: 211–221, 1992.
47. **Slevin K, Waterlow J.** Theoretical analysis of the importance of recycling in measurements of protein turnover by constant infusion of a labelled amino acid. *J Theor Biol* 253: 215–219, 2008.
48. **Smith CB, Sun Y.** Influence of valine flooding on channeling of valine into tissue pools and on protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268: E735–E744, 1995.
49. **Smith GI, Villareal DT, Mittendorfer B.** Measurement of human mixed muscle protein fractional synthesis rate depends on the choice of amino acid tracer. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E666–E671, 2007.
50. **Taillandier D, Guezennec CY, Patureau-Mirand P, Bigard X, Arnal M, Attaix D.** A high protein diet does not improve protein synthesis in the non-weight-bearing rat tibialis anterior muscle. *J Nutr* 126: 266–272, 1996.
51. **Toffolo G, Foster DM, Cobelli C.** Estimation of protein fractional synthetic rate from tracer data. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 264: E128–E135, 1993.
52. **Waterlow JC.** *Protein Turnover*. Wallingford, UK: CABI, 2006, p. 301.
53. **Wolfe RR, Chinkes DL.** *Isotope Tracers in Metabolic Research: Principles and Practice of Kinetic Analysis*. New York: Wiley-Liss, 2005, p. 474.
54. **Zhang XJ, Chinkes DL, Doyle D Jr, Wolfe RR.** Metabolism of skin and muscle protein is regulated differently in response to nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274: E484–E492, 1998.
55. **Zhang XJ, Chinkes DL, Wolfe RR.** Measurement of protein metabolism in epidermis and dermis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E1191–E1201, 2003.



D. ÉTUDE 4 :

MODÉLISATION MULTI-COMPARTMENTALE DES VARIATIONS INTRA- ET INTER-INDIVIDUELLES DES ABONDANCES ISOTOPIQUES NATURELLES EN AZOTE ($\delta^{15}\text{N}$) POUR L'ÉTUDE DES FLUX AZOTÉS DE L'ORGANISME ET DE LEURS MODULATIONS

Contexte et objectifs :

Des données de plus en plus nombreuses, dont celles que nous avons acquises dans nos études précédentes 1 à 3, suggèrent que des variations des abondances isotopiques naturelles dans certains pools azotés peuvent traduire des modulations spécifiques du métabolisme azoté. Cependant, l'interprétation des $\delta^{15}\text{N}$ est limitée par le fait que les mécanismes responsables de leurs variations inter- et intra-individuelles sont encore mal identifiés et compris. Dans cette étude, nous avons développé un modèle multi-compartmental mécaniste du métabolisme azoté chez le rat, qui explique le système complexe des $\delta^{15}\text{N}$ dans les différents pools de l'organisme en le liant aux différents flux d'azote inter- et intra-organes. Ce modèle doit nous permettre de mieux comprendre les mécanismes métaboliques qui génèrent du fractionnement isotopique, et d'analyser les variations de $\delta^{15}\text{N}$ que nous avons expérimentalement observées afin d'en déduire des informations sur les modulations des flux azotés que signent ces modulations de $\delta^{15}\text{N}$.

Méthodes :

La structure du modèle, c.-à-d. le nombre de compartiments et de voies d'échange entre ces compartiments, a été choisie afin de rendre compte des principaux pools et processus impliqués dans le métabolisme azoté. Chaque compartiment est caractérisé par 2 variables d'état (sa teneur en azote total et son $\delta^{15}\text{N}$) et chacune des voies d'échange est définie par un coefficient de transfert k (traduisant la vitesse avec laquelle l'azote transite le long de cette voie) et un facteur de fractionnement isotopique ϵ (traduisant l'affinité relative de cette voie pour le ^{15}N par rapport au ^{14}N). Les paramètres k et ϵ du modèle ont été estimés à partir de données de flux d'azote issues de la littérature ou des résultats d'estimation de l'ÉTUDE 3, et à partir de données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$ obtenues en conditions normales dans l'ÉTUDE 2. Le modèle ainsi calibré a été ensuite utilisé pour simuler différents scénarios de modulations des flux métaboliques azotés, correspondant à des conditions nutritionnelles (variations quantitatives ou qualitatives de l'apport protéique) ou physiopathologiques (jeûne, syndrome métabolique) particulières, et étudier les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les différents compartiments en réponse à ces modulations de flux d'azote. Les prédictions du modèle ont été confrontées aux variations de $\delta^{15}\text{N}$ mises en évidence expérimentalement dans nos études 1 (modification de la source P) et 2 (initiation précoce d'un syndrome métabolique) afin d'identifier ou de formuler des hypothèses quant aux flux azotés potentiellement affectés dans les conditions de ces études.

Résultats & discussion :

Le modèle multi-compartimental du métabolisme azoté que nous avons développé est constitué de 21 compartiments et de 49 voies d'échanges et distingue différents tissus splanchniques (foie et intestin) et périphériques (muscles, rein, peau, cœur et cellules sanguines). Il distingue également, au sein de chaque tissu, les AA libres des P, ce qui permet de considérer les différents flux d'N à la fois inter-organes (échanges d'AA entre tissu et plasma) et intra-organes (échanges entre AA et P tissulaires via les synthèses et dégradations protéiques). Le modèle confirme l'existence d'effets isotopiques associés à certaines voies métaboliques (notamment les voies d'oxydation des AA et de synthèse et/ou dégradation protéiques), qui induisent et expliquent les différences de $\delta^{15}\text{N}$ inter-tissulaires que nous avons observées expérimentalement. Les prédictions du modèle ont permis de mieux comprendre quels $\delta^{15}\text{N}$ étaient susceptibles de varier, et comment, en réponse à des modulations de certains flux. Ainsi, nous avons montré que les $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires étaient particulièrement modulés par des variations des flux d'oxydation des AA, avec des amplitudes et sens variables selon les tissus. Les $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires sont également sensibles à des modulations des flux inter-organes d'AA alors que leurs valeurs à l'équilibre isotopique ne sont pas affectées par des modulations des flux intra-organes de synthèse et dégradation protéiques. Enfin, les prédictions du modèle suggèrent que l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les fractions protéiques tissulaires observées lors de la modification de la source protéique (soja vs. lait, étude 1) pourrait résulter d'une augmentation du catabolisme oxydatif dans les tissus splanchniques. Les variations des $\delta^{15}\text{N}$ des protéines hépatiques, intestinales et musculaires observées lors de l'initiation d'un syndrome métabolique (étude 2) résulteraient en revanche plutôt d'une diminution des flux inter-organes d'AA. La cohérence des prédictions du modèle avec les données de la littérature permet d'attester de sa validité et de sa capacité à rendre compte et expliquer les variations de $\delta^{15}\text{N}$.

Conclusions :

Le modèle global du métabolisme azoté développé dans cette étude offre une vision systémique de l'ensemble des flux azotés dont les données éparses de la littérature ne donnaient auparavant qu'une vision parcellaire et fragmentée. Il fournit également une représentation intégrée de l'ensemble des phénomènes de fractionnements isotopiques qui concourent conjointement à l'établissement des $\delta^{15}\text{N}$ observés dans les pools azotés. Cette étude montre l'intérêt d'une approche de modélisation compartimentale pour analyser les variations de $\delta^{15}\text{N}$ et interpréter les informations sous-jacentes qu'elles contiennent quant aux modulations des flux azotés qui les ont générées.

D. ÉTUDE 4 :

Un corpus conséquent de données, essentiellement obtenues en écologie et plus rarement et récemment en nutrition, montrent que les abondances isotopiques naturelles de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) varient de manière intra-individuelle (entre les pools métaboliques au sein d'un individu) et inter-individuelle (entre les individus au sein d'une population) et suggèrent que ces variations traduisent des modulations spécifiques du métabolisme azoté, du fait de l'existence d'effets isotopiques associés à certaines voies métaboliques. Cependant, en raison de la complexité et de l'intrication des voies métaboliques dont elles résultent, les variations des $\delta^{15}\text{N}$ sont difficiles à interpréter directement. Ainsi, les mécanismes par lesquels les tissus s'enrichissent différemment en ^{15}N et la façon dont les $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires sont modulés lors de perturbations du métabolisme azoté, sont encore largement méconnus. Dans cette étude, nous avons développé un modèle multi-compartimental mécaniste du métabolisme azoté à l'échelle corporelle, sur la base de données expérimentales de quantités d'azote et de $\delta^{15}\text{N}$, obtenues chez le rat dans différents pools azotés, et de données bibliographiques de flux azotés. Le modèle développé doit permettre (i) de rendre compte du fonctionnement global du métabolisme azoté, (ii) d'identifier et comprendre quels processus ou quelles modulations des flux contribuent à la variabilité intra et inter-individuelle des $\delta^{15}\text{N}$, (iii) d'interpréter, en termes de modulation des flux azotés, les différences de $\delta^{15}\text{N}$ mises en évidence expérimentalement dans les études précédentes. Cette étude comporte deux étapes principales : la première étape a été consacrée au développement mathématique du modèle (choix de la structure et des paramètres, formalisation des équations ...) et à son paramétrage à partir de données expérimentales et bibliographiques ; le modèle ainsi défini et calibré a été utilisé dans une deuxième étape pour étudier les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les différents compartiments en réponse à des modulations des flux azotés.

I. Développement, calibration et fonctionnement général du modèle

Le modèle développé doit permettre de reproduire de manière cohérente le fonctionnement global du métabolisme azoté par rapport aux connaissances et données générales disponibles, en intégrant les principaux flux métaboliques (absorption, synthèses, dégradations, oxydations, excrétion...), et en rendant compte des principales caractéristiques structurales et dynamiques du système étudié (compartimentation métabolique, vitesses de renouvellement protéique variables selon les tissus...). D'autre part, le modèle doit être capable de reproduire les valeurs d'abondances isotopiques naturelles de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) observées expérimentalement, afin de comprendre l'information qu'elles contiennent en termes de flux métaboliques, et finalement d'analyser et interpréter les variations de $\delta^{15}\text{N}$ en réponse à des modulations de ces flux. Le modèle développé intègre donc à la fois des données expérimentales et des données de la littérature.

I.1. Représentation mathématique du système : formalisme et structure du modèle

La représentation par modélisation compartimentale du métabolisme azoté et des flux d'échanges entre ses différents pools nécessite de réduire ce système complexe en un nombre fini de compartiments et de voies d'échanges pour ne retenir que les processus majeurs, nécessaires et suffisants pour expliquer les données de $\delta^{15}\text{N}$ (selon l'approche réductionniste). Dans le modèle, chaque compartiment représente une quantité d'azote sous une forme particulière (P, AA, urée ou NH_4) ayant une cinétique uniforme et discernable de transport ou de transformation biochimique. Les compartiments sont reliés entre eux par des voies d'échanges qui représentent des processus de transport (par ex., transit intestinal, transferts inter-organes d'AA), des transformations biochimiques (par ex., oxydation des AA conduisant à la formation d'urée, protéosynthèse), ou une combinaison des deux (par ex., catabolisme et transfert vers l'urine de l'urée produite).

I.1.i. Choix des variables d'état et des compartiments du modèle

Formalisme du modèle : variables d'état et paramètres

Le modèle développé est composé de 21 compartiments et 49 voies d'échange (Figure 62). Chaque compartiment est caractérisé par 2 variables d'état : sa teneur en azote total ($N = {}^{14}\text{N} + {}^{15}\text{N}$) et son abondance isotopique azotée naturelle (exprimée par l'abondance fractionnaire F ou l'enrichissement isotopique $\delta^{15}\text{N}$). Ces deux types de variables d'état (N et $\delta^{15}\text{N}$) correspondent aux deux types de données mesurées expérimentalement et dont nous disposons pour tous les compartiments représentés dans le modèle. En raison de ces deux types de variables d'état, le modèle intègre deux types de paramètres, qui sont associés à chaque voie métabolique : les constantes d'échanges d'azote (k, traduisant la vitesse avec laquelle l'azote transite le long de chaque voie) et les facteurs de fractionnement isotopique (α ou ϵ , traduisant l'affinité relative de chaque voie pour le ${}^{15}\text{N}$ par rapport au ${}^{14}\text{N}$).

Structure du modèle

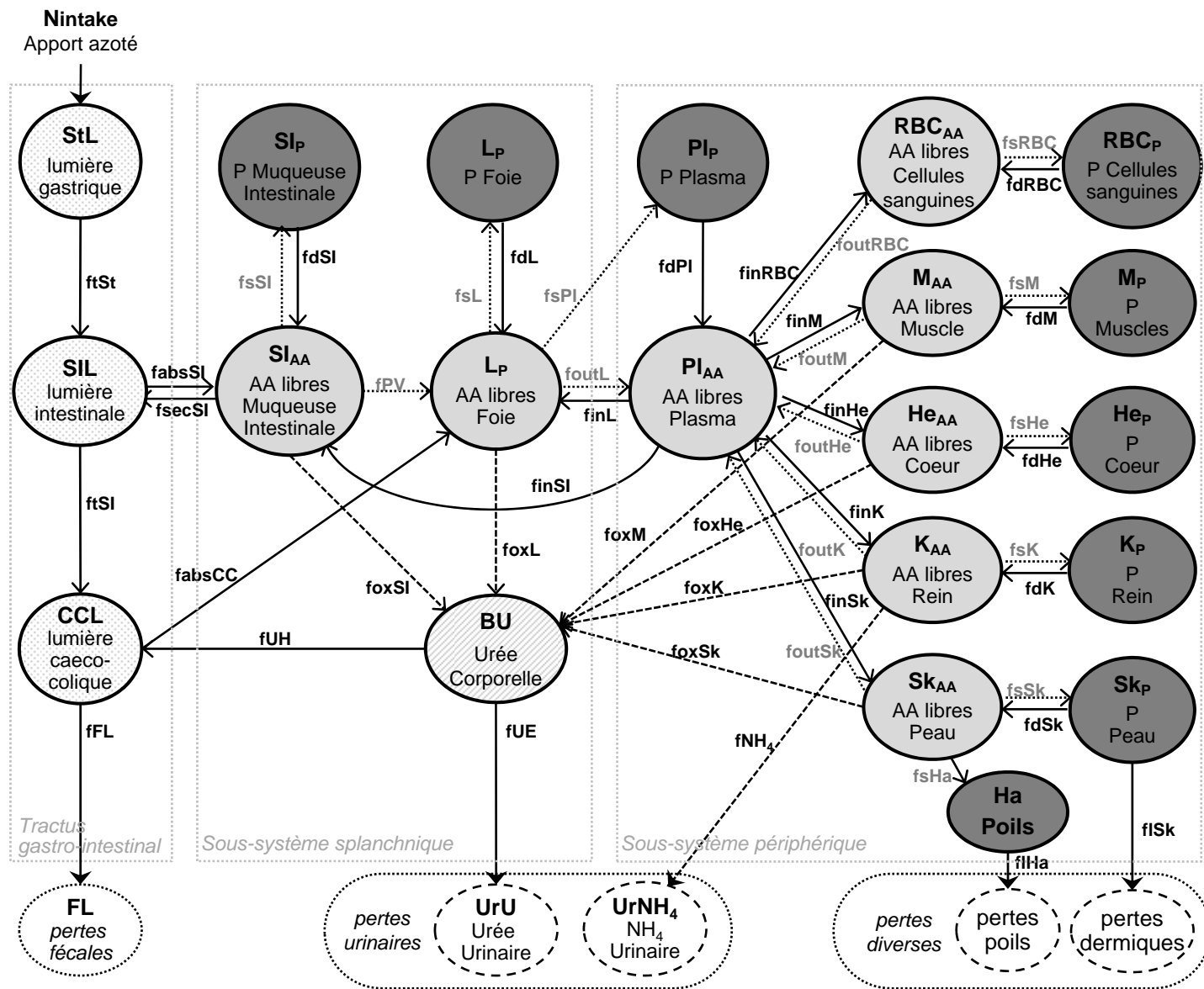
La structure et le nombre des voies d'échanges ont été sélectionnés afin de rendre compte des principaux pools et processus impliqués dans le métabolisme azoté, tout en appliquant le principe de parcimonie qui consiste à retenir le modèle le plus simple permettant de rendre compte des données expérimentales et du fonctionnement du système étudié. Le modèle complexe retenu inclut ainsi des compartiments représentant différentes formes d'azote : les P, les AA libres, l'urée, l'ammoniaque. La distinction de ces différentes formes permet de rendre compte de la diversité des pools et des processus métaboliques impliqués (absorption, transferts, synthèses et dégradations protéiques, catabolisme des AA...). Le modèle global peut être divisé en 4 sous-systèmes interconnectés : le sous-système absorptif, le sous-système splanchnique, le sous-système périphérique et le sous-système d'élimination.

Le sous-système absorptif (tractus gastro-intestinal) est représenté par une chaîne de 3 compartiments (c.-à-d., une structure caténaire) qui correspondent aux contenus azotés totaux de la lumière gastrique, de la lumière intestinale et des lumières caecale et colique (sans distinction des différentes formes de l'azote, car les données expérimentales collectées concernent l'azote total).

Figure 62 : Modèle multi-compartimental décrivant les flux azotés corporels et les signatures isotopiques naturelles de l'azote chez le rat.

Les cercles représentent les compartiments du modèle et les flèches représentent les voies d'échanges.

P, protéines ; AA, acides aminés libres.



Flux de transfert de l'azote :

- ftSt : vidange gastrique
- ftSI : transit intestinal
- fabsSI : absorption intestinale
- fsecSI : sécrétion intestinale de protéines endogènes
- fabsCC : absorption colique
- fUH : recyclage de l'urée (fraction de l'urée produite non excrétée via fUE)
- fUE : excrétion urinaire d'urée
- fFL : excrétion fécale
- fiHa : pertes azotées par perte de poils
- fISk : pertes azotées par desquamation

- fsT : synthèse protéique dans le tissu T
- fdT : dégradation des protéines du tissu T
- foxT : oxydation/désamination des AA du tissu T
- finT : transport d'AA du plasma vers le pool d'AA libres du tissu T
- foutT : transport d'AA libres du tissu T vers le plasma
- pour T = muqueuse intestinale (SI), foie (L), plasma (PI), cellules sanguines (RBC), muscle (M), cœur (He), rein (K), peau (Sk)
- fPV : transfert d'AA de l'intestin vers le foie via la veine porte
- fNH₄ : production et excrétion urinaire d'ammoniaque

L'alimentation est représentée par un apport d'azote exogène dans le compartiment gastrique. L'absorption intestinale à partir de la lumière intestinale permet l'entrée de composés azotés (principalement sous forme d'AA) dans le reste de l'organisme, par l'intermédiaire du sous-système splanchnique.

Le sous-système splanchnique est constitué de 2 tissus, le foie et la muqueuse intestinale, et du pool d'urée corporelle BU. Chacun de ces tissus splanchniques est représenté par un compartiment d'AA et un compartiment protéique qui échangent par l'intermédiaire de flux de protéosynthèse (f_s) et de protéolyse (f_d). Un flux d'oxydation (f_{ox}) pointant vers BU depuis chacun des compartiments d'AA représente leur catabolisme. Pour le foie spécifiquement, deux compartiments protéiques sont distingués: les P hépatiques constitutives (L_p) et les P hépatiques exportées (Pl_p , c'est-à-dire les P plasmatiques). Contrairement à ceux des tissus périphériques, les compartiments d'AA splanchniques ont une double alimentation : ils sont alimentés d'une part par la circulation systémique (flux f_{in} d'AA depuis le pool d'AA plasmatiques libres) et d'autre part, soit par la lumière intestinale dans le cas de l'intestin (f_{absSI}), soit par la veine porte dans le cas du foie (f_{PV}). Le recyclage entéro-hépatique de l'urée est représenté par un flux de transfert de l'urée vers la lumière caeco-colique (f_{UH}), où l'urée ainsi transférée est hydrolysée par les bactéries et partiellement réabsorbée sous forme d'ammoniaque. Le flux d'absorption d'azote depuis la lumière caeco-colique, f_{absCC} , agrège l'absorption d'AA alimentaires et endogènes, issus de l'hydrolyse des P ingérées et des sécrétions endogènes, et l'absorption de produits issus de l'hydrolyse de l'urée (soit directement sous forme d'ammoniaque, soit sous forme d'AA produits par la flore bactérienne à partir de l'ammoniaque). f_{absCC} est dirigé vers le pool d'AA hépatiques.

Le sous-système périphérique distingue 5 tissus : le rein, la peau, le muscle, le cœur et les cellules sanguines. Ces tissus sont caractérisés par leur situation anatomique périphérique et leur alimentation uniquement systémique, à partir des AA plasmatiques. Chaque tissu est représenté par 2 compartiments : un compartiment d'AA libres et un compartiment protéique, les flux d'azote entre ces 2 compartiments représentant les flux de synthèse (f_s) et de dégradation (f_d) protéiques. Les pools d'AA intra-tissulaires échangent de manière bidirectionnelle par transfert d'AA avec le pool d'AA libres plasmatiques (flux f_{in} et f_{out}). Le catabolisme des AA au niveau tissulaire est représenté par des flux d'oxydation (f_{ox}) à partir de chaque compartiment d'AA intra-tissulaires vers le compartiment d'urée corporelle (BU). Ces flux représentent de façon agrégée le transfert des AA des tissus périphériques vers le foie où ils sont ensuite orientés vers la production d'urée par désamination. La représentation du catabolisme des AA par des flux d'oxydation tissulaires distincts au lieu d'un flux unique de production d'urée depuis le compartiment d'AA hépatiques libres permet de simuler des taux relatifs d'oxydation différents selon les tissus, ce qui s'avère particulièrement intéressant pour rendre compte de situations physiopathologiques particulières. Dans cette représentation, le compartiment d'urée corporelle est alimenté à partir de l'ensemble des pools d'AA tissulaires par les flux d'oxydation et la production totale d'urée correspond à la somme des flux d'oxydation tissulaires. Par ailleurs, la représentation de plusieurs pools tissulaires permet de rendre compte des différences de renouvellement protéique (FSR) entre les tissus

périphériques, et la distinction des compartiments d'AA et de P pour chaque tissu permet de représenter à la fois les flux d'alimentation tissulaires depuis le plasma, les flux de synthèse et de dégradation protéiques tissulaires et les flux d'oxydation.

Enfin, le modèle considère plusieurs voies de pertes azotées : les pertes fécales qui ont pour origine la lumière colique (f_{FL}), les pertes urinaires dans lesquelles sont distinguées l'excrétion d'urée (f_{UE}) et la production d'ammoniaque au niveau rénal (f_{NH4}), et deux types de pertes incompressibles : les pertes par desquamation (f_{ISK}) et les pertes de poils (f_{IHa}).

1.1.ii. Fonctionnement et équations du modèle

Le modèle développé est un modèle linéaire, caractérisé par 2 jeux d'équations différentielles ordinaires décrivant l'évolution dynamique de chacune des 2 types de variables d'état du modèle. Le détail de l'obtention des équations est donné dans la fiche technique n°2.

Le 1^{er} jeu d'équations différentielles décrit l'évolution des quantités d'azote total (N_i) dans chaque compartiment i du modèle et fait intervenir les paramètres $k_{j,i}$, qui sont les coefficients de transfert d'azote (ou constantes d'échanges) des compartiments i vers j . Ces équations traduisent le principe de conservation de la masse appliqué à chaque compartiment et qui consiste à considérer que pendant un court intervalle de temps (dt), la variation élémentaire de N_i (dN_i) est égale à la différence entre la somme des flux entrants et la somme des flux sortants. On considère également que les flux d'échanges entre compartiments sont régis par des lois d'action de masse, c'est-à-dire que le flux d'azote du compartiment i vers le compartiment j ($f_{j,i}$) est directement proportionnel à la taille du compartiment i (N_i) et est égal au produit de $k_{j,i}$ et N_i ($f_{j,i} = k_{j,i} \times N_i$, voir fiche technique n°2).

Le 2^{ème} jeu d'équations différentielles décrit l'évolution de la composition isotopique de chaque compartiment du modèle et fait intervenir les paramètres de fractionnement isotopique (c.-à-d., les effets isotopiques $\alpha_{j,i}$ ou les facteurs de fractionnement isotopique $\varepsilon_{j,i}$). Ces équations sont obtenues en appliquant le principe de conservation de la masse à l'isotope lourd de l'azote (^{15}N) et en considérant, de la même manière que pour l'azote total, que les flux de transfert d'azote lourd sont régis par des lois d'action de masse. Pour des raisons numériques, les compositions isotopiques ont d'abord été exprimées sous la forme d'abondance fractionnaire ($F = ^{15}\text{N} / (^{15}\text{N} + ^{14}\text{N})$) dans les équations différentielles utilisées pour les simulations et la calibration, ce qui implique d'exprimer les paramètres de fractionnement avec la notation α (sans unité). Cependant, pour des raisons de praticité, les équations finales sont présentées avec les compositions isotopiques exprimées sous la forme de $\delta^{15}\text{N}$ (‰), et les paramètres de fractionnement sont alors exprimés par le paramètre homogène ε (‰). Les relations entre les grandeurs F et δ et les paramètres α et ε sont explicitées dans l'Annexe 8. Finalement, le $\delta^{15}\text{N}$ du flux instantané d'azote du compartiment i vers j ($\delta f_{j,i}$) dépend du $\delta^{15}\text{N}$ du compartiment i (δN_i) et de $\varepsilon_{j,i}$ le facteur de fractionnement associé à ce flux ($\delta f_{j,i} = \delta N_i + \varepsilon_{j,i}$, voir fiche technique n°2). Une valeur négative de ε traduit donc une affinité supérieure de la voie d'échange pour l'isotope léger par rapport à l'isotope lourd (c.-à-d., un transfert privilégié de ^{14}N le long de cette voie), alors qu'une valeur positive traduit un passage préférentiel d'isotope lourd.

Ce double système d'équations différentielles pour les variables d'état N_i et $\delta^{15}N_i$ est utilisé pour simuler les évolutions des quantités d'azote et des enrichissements isotopiques dans l'ensemble des compartiments représentés et pour définir les valeurs des tailles des compartiments et des $\delta^{15}N$ à l'état stationnaire et l'équilibre isotopique (Figure 63). Ces équations ont été implémentées à l'aide de la boîte à outils "SimBiology" du logiciel MatLab (version 7.7; Mathworks, Natick, MA), qui permet de résoudre ces systèmes d'équations différentielles grâce à plusieurs méthodes d'intégration numérique. Nous avons choisi d'utiliser l'algorithme d'intégration numérique "ODE 15s" qui est particulièrement bien adapté pour résoudre des équations différentielles ordinaires dans un système rigide tel que le nôtre, c.-à-d. avec des variables (N_i et F_i) dont les valeurs varient avec des ordres de grandeur différents.

I.2. Paramétrage du modèle et vraisemblance physiologique de ses prédictions

Les paramètres k du modèle ont été déterminés soit à partir de valeurs de flux issues de données de la littérature, soit par ajustement pour rendre compte des données expérimentales de contenu en N des différents compartiments. Les paramètres ε de fractionnement isotopique ont été ajustés dans un 2^{ème} temps, afin de reproduire au mieux les $\delta^{15}N$ mesurés dans les différents compartiments.

I.2.i. Données expérimentales utilisées

Les données expérimentales utilisées pour le paramétrage du modèle sont des mesures de N_i et $\delta^{15}N_i$ obtenues lors de l'ÉTUDE 2, au cours de laquelle des rats ont été soumis pendant 10 semaines à un régime hypercalorique gras et sucré dont 20% de l'énergie étaient fournis sous forme de protéines de lait. Les données retenues pour le développement du modèle sont celles obtenues chez les rats témoins, c'est à dire non obèses ni insulino-résistants à l'issue des 10 semaines d'adaptation. Nous avons choisi d'utiliser ces données car elles ont l'avantage d'être très complètes (nombreux tissus et fractions) et ont été obtenues chez des rats sains recevant un régime mixte avec une source protéique de très bonne qualité. Des données complémentaires, obtenues sur des rats en conditions similaires au cours de l'ÉTUDE 3, ont été utilisées pour les valeurs des N_i et $\delta^{15}N_i$ des contenus des lumières gastrique et intestinale et de la concentration en urée plasmatique (qui sont des mesures qui n'ont pas été effectuées dans l'ÉTUDE 2).

Le protocole d'obtention des données est détaillé dans les parties des résultats correspondantes (ÉTUDES 2 et 3). En résumé, les fractions P et AA ont été séparées dans tous les échantillons de tissus (intestin grêle, foie, muscles, reins, peau, cœur et cellules sanguines), tandis que les fractions AA, P et urée ont été isolées dans le plasma, et les fractions NH_4 et urée ont été séparées dans l'urine. Les teneurs en N (%N) et les enrichissements isotopiques ($\delta^{15}N$) ont été mesurés en EA-IRMS dans ces différentes fractions ainsi que dans les contenus des lumières gastrique, intestinale, colique et caecale.

Les quantités d'azote (N) dans ces différents pools ont été calculées de la manière suivante :

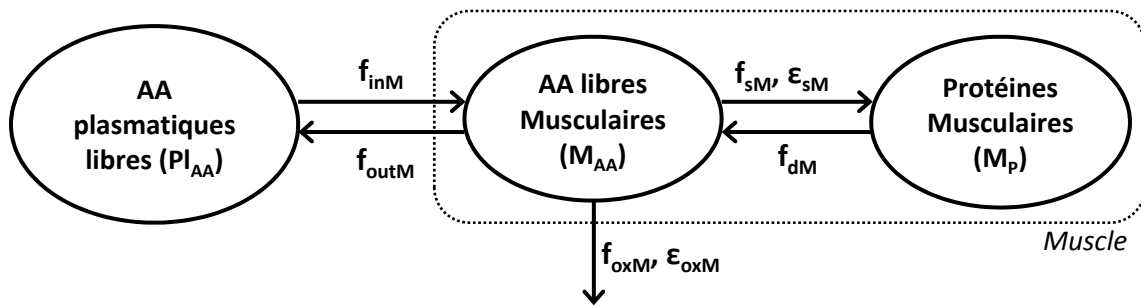
$$N(g) = N_t \times m_{\text{tissu}} \text{ avec } N_t(gN/g \text{ de tissu}) = (\%N/100) \times (m_{ES}/m_E),$$

où %N est la teneur en N du pool (%), m_{ES} la masse de l'échantillon sec après lyophilisation (g), m_E la masse de l'échantillon avant lyophilisation (g), m_{tissu} la masse du tissu considéré qui est pesée post-mortem (g), et t le temps depuis le début de l'expérimentation (jours).

Figure 63 : système d'équations différentielles décrivant les évolutions des variables d'état du modèle multi-compartimental : exemple des compartiments musculaires.

Pour chaque compartiment, les équations différentielles implémentées dans le modèle multi-compartimental décrivent les évolutions de chacune des variables d'état, c'est-à-dire la quantité d'azote total et l'enrichissement isotopique.

Dans le muscle, on note M_{AA} et M_p les quantités d'azote total dans les compartiments d'acides aminés libres et de protéines, respectivement, et δM_{AA} et δM_p les enrichissements isotopiques de chacun de ces compartiments. Les effets isotopiques associés aux transferts des AA depuis et vers le plasma (f_{inM} et f_{outM}) et à la dégradation protéique (f_{dM}) ont été supposés nuls.



EQUATIONS DANS LE CAS GÉNÉRAL :

$$\begin{cases} \frac{dM_{AA}(t)}{dt} = f_{inM}(t) - f_{outM}(t) - f_{oxM}(t) + f_{dM}(t) - f_{sM}(t) \\ \frac{d\delta M_{AA}(t)}{dt} = \frac{f_{inM}(t)}{M_{AA}(t)} \times (\delta PI_{AA}(t) - \delta M_{AA}(t)) - \frac{f_{oxM}(t)}{M_{AA}(t)} \times \epsilon_{oxM} - \frac{f_{sM}(t)}{M_{AA}(t)} \times \epsilon_{sM} + \frac{f_{dM}(t)}{M_{AA}(t)} \times (\delta M_p(t) - \delta M_{AA}(t)) \\ \frac{dM_p(t)}{dt} = f_{sM}(t) - f_{dM}(t) \\ \frac{d\delta M_p(t)}{dt} = \frac{f_{sM}(t)}{M_p(t)} \times (\delta M_{AA}(t) - \delta M_p(t) + \epsilon_{sM}) \end{cases}$$

SOUS L'HYPOTHÈSE D'ÉTAT STATIONNAIRE :

$$\begin{cases} f_{inM} = f_{outM} + f_{oxM} \\ \frac{d\delta M_{AA}(t)}{dt} = \frac{f_{inM}}{M_{AA}} \times (\delta PI_{AA}(t) - \delta M_{AA}(t)) - \frac{f_{sM}}{M_{AA}} \times (\delta M_p(t) - \delta M_{AA}(t) - \epsilon_{sM}) - \frac{f_{oxM}}{M_{AA}} \times \epsilon_{oxM} \\ f_{sM} = f_{dM} \\ \frac{d\delta M_p(t)}{dt} = \frac{f_{sM}}{M_p} \times (\delta M_{AA}(t) - \delta M_p(t) + \epsilon_{sM}) \end{cases}$$

À L'ÉQUILIBRE ISOTOPIQUE :

$$\begin{aligned} \delta M_{AAeq} &= \delta PI_{AAeq} - \frac{f_{oxM}}{f_{inM}} \times \epsilon_{oxM} \\ \delta M_{Peq} &= \delta M_{AAeq} + \epsilon_{sM} \end{aligned}$$

Afin d'adapter les données expérimentales à la représentation compartimentale, les hypothèses suivantes ont été faites :

- la masse musculaire corporelle totale a été estimée à partir de la masse de la carcasse, en considérant que la masse squelettique représente 5% de cette masse (Lacroix, 2004) :

$$m_{\text{Muscle}} (g) = m_{\text{Carcasse}} (g) \times 0,95;$$

- pour le plasma : le volume plasmatique total (V_{plasma}) a été estimé en fonction de la masse corporelle totale (PC, en g) selon la relation :

$$V_{\text{plasma}} (ml) = 0,0291 \times PC(g) + 2,54 \text{ (Bijsterbosch, 1981).}$$

La concentration en AA plasmatiques a été estimée à partir de valeurs d'aminocidémie obtenues par notre groupe dans des conditions similaires (3,1 mmol/L, soit 4,4 mmolN/L ou 62 mg/L).

Les quantités d'N dans les compartiments d'AA (PI_{AA}) et de P (PI_P) plasmatiques ont été calculées selon les relations suivantes :

$$PI_{AA} (g) = C_{AAPI} \times V_{\text{plasma}} / 1000 \text{ et } PI_P (g) = (\%N/100 \times m_{ES}/V_{PIE}) \times V_{\text{plasma}},$$

où C_{AAPI} est la concentration en AA dans la plasma (g/L), V_{plasma} le volume plasmatique total (ml), V_{PIE} , le volume de l'échantillon de plasma (ml), %N, la teneur en azote dans la fraction protéique de l'échantillon musculaire dosé, et m_{ES} , la masse de la fraction protéique plasmatique sèche (g) après lyophilisation.

- la quantité d'azote dans le compartiment d'urée corporelle (BU, mmol N) a été calculée à partir de la concentration en urée plasmatique (C_{urea} , mmol N/ml plasma), son volume de distribution (c.-à-d., le volume d'eau corporelle total, estimé comme 62.3% de la masse corporelle) et un facteur de correction de 92% qui représente la teneur en eau du plasma :

$$BU (mmol N) = C_{urea} (mmolN/ml) \times 0,623 \times PC (g) / 0,92.$$

Dans le modèle, les quantités d'azote dans les différentes fractions des tissus sont exprimées en mmol N pour 100g de poids corporel :

$$N (mmol/100g PC) = 1000 \times (N (g) / 14) / PC (g) \times 100.$$

Pour plus de praticité, les valeurs expérimentales d'enrichissement isotopique $\delta^{15}N$ ont été recalculées pour un régime ayant un enrichissement isotopique de 5‰, soit pour chaque pool échantillonné :

$$\delta^{15}N_{\text{pool}} = \Delta^{15}N_{\text{pool expé}} + 5,$$

où $\Delta^{15}N_{\text{pool expé}}$ est la différence entre l'enrichissement isotopique de chaque pool corporel ($\delta^{15}N_{\text{pool expé}}$) et l'enrichissement isotopique du régime ($\delta^{15}N_{\text{régime expé}}$) mesurés expérimentalement ($\Delta^{15}N_{\text{pool expé}} = \delta^{15}N_{\text{pool expé}} - \delta^{15}N_{\text{régime expé}}$).

Des mesures expérimentales de N_i et $\delta^{15}N_i$ sont ainsi disponibles pour tous les compartiments du modèle, et sont récapitulées dans le Tableau 18.

1.2.ii. Paramétrage des flux d'N : hypothèses et données utilisées

Le paramétrage du modèle a été effectué en tenant compte des variations nycthémerales normales des tailles des compartiments et des flux d'échanges, liées à l'alternance des phases postabsorptives et postprandiales. En effet, les mesures expérimentales de N_i ayant été réalisées après une nuit de jeûne, elles correspondent aux valeurs de la phase postabsorptive, et il est nécessaire de

Tableau 18 : données expérimentales utilisées pour la calibration du modèle

pools corporels	Compartiments du modèle	Données expérimentales	
		N (mmol/100g PC)	$\Delta^{15}\text{N}$ (‰)
contenu stomacal	StL	0,2 *	$\approx 0^+$
contenu intestinal	SIL	0,2 *	+1,03*
contenus caecal et colique	CCL	0,3	+1,01
Muqueuse Intestinale			
fraction AA	SI _{AA}	0,060	+1,36
fraction P	SI _p	0,85	+2,59
Foie			
fraction AA	L _{AA}	0,22	+1,91
fraction P	L _p	5,2	+4,45
Muscle			
fraction AA	M _{AA}	5,90	-1,46
fraction P	M _p	88,9	+3,36
Peau			
fraction AA	Sk _{AA}	0,40	+1,11
fraction P	Sk _p	20,2	+2,70
Rein			
fraction AA	K _{AA}	0,040	+2,41
fraction P	K _p	0,90	+3,05
Cœur			
fraction AA	He _{AA}	0,022	+0,58
fraction P	He _p	0,35	+4,70
Cellules Sanguines			
fraction AA	RBC _{AA}	0,072	+0,25 ⁺
fraction P	RBC _p	8,0	+2,68
Poils	Ha	38,9	+2,30
Plasma			
fraction AA	PI _{AA}	0,015	+0,25
fraction P	PI _p	1,85	+5,06
Urée	BU	0,9 *	-1,05
Urée urinaire	UrU	x	-0,10
NH ₄ ⁺ urinaire	UrNH4	x	+1,87

Valeurs des variables d'états du modèle mesurées expérimentalement et utilisées pour déterminer les paramètres de transfert k et de fractionnement isotopique α du modèle multi-compartimental. Les données expérimentales ont été obtenues sur des rats ayant été soumis à une régime gras-sucré contenant 20% de protéines de lait pendant 10 semaines. Les données sélectionnées pour le modèle sont issues uniquement du groupe de rats maigres et non-insulino-résistants. Le protocole expérimental est détaillé dans l'ÉTUDE 2.

$\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{pool}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{régime}}$; N, quantité d'azote total ($^{14}\text{N}+^{15}\text{N}$), et $\delta^{15}\text{N}$, enrichissement en ^{15}N , mesurés dans les différents tissus et fractions tissulaires par un couplage analyseur élémentaire - spectromètre de masse à ratio isotopique; AA, acides aminés libres; P, protéines; *données obtenues dans l'expérimentation décrite dans l'étude 3 (à la différence des autres données qui ont été obtenues dans l'étude 2); ⁺valeurs non mesurées mais posées par hypothèse; x, valeurs non utilisées pour le paramétrage du modèle.

considérer un apport alimentaire discontinu pour rendre compte de ces données. Le paramétrage a donc été réalisé en considérant deux phases distinctes pour la prise alimentaire sur une période de 24h : une 1^{ère} phase de 12h, correspondant à la phase nourrie (période nocturne chez le rat) où l'apport alimentaire est simulé constant, suivie d'une 2^{ème} phase de 12h, correspondant à la phase postabsorptive (période diurne chez le rat), pendant laquelle l'apport alimentaire est nul.

Les flux du modèle ont été calibrés afin de reproduire, à partir des évolutions des tailles simulées par les équations différentielles, les données expérimentales observées à la fin d'un cycle de 24h, c'est-à-dire après 12h de jeûne. Étant donné le nombre très important de transferts azotés représentés dans le modèle et la réversibilité de la plupart des échanges, plusieurs combinaisons de flux permettaient de reproduire les données expérimentales. Par conséquent, la valeur de certains flux a été fixée a priori d'après des données bibliographiques ou des données expérimentalement antérieures pour résoudre ce problème d'identifiabilité. Les paramètres k du modèle ont ensuite été calculés à partir des valeurs de flux et de tailles selon la relation définie par la loi d'action de masse : $k_{j,i} = f_{j,i}/N_i$. L'unité de temps des simulations est la journée, les flux sont exprimés en mmol N /100g PC /j et les paramètres de transfert k en j^{-1} . Le Tableau 19 présente l'ensemble des valeurs des flux du modèle, les paramètres de transferts associés et les notations utilisées, en spécifiant quels flux ont été estimés par ajustement à nos données expérimentales ou posés par hypothèse en fonction de la littérature. Les données et hypothèses utilisées pour calibrer les flux non déterminés uniquement à partir des données expérimentales sont détaillées ci-dessous.

Calibration des apports et pertes azotées :

La consommation journalière moyenne pour un régime contenant 20% de protéines est d'environ 10 mmol N /100g PC, d'après des mesures de la consommation alimentaire que nous avons réalisées en cages individuelles chez des rats de même âge et dans des conditions similaires. L'apport alimentaire dans le modèle (Nintake) a donc été simulé par une fonction périodique de période 1 jour, avec un flux d'apport constant de 20 mmol N /100g PC sur la 1^{ère} moitié de la période et un flux constant nul sur la 2^{ème} moitié :

$$\text{Nintake}(t) = 20 \text{ mmol N /100g PC, pour } t \in [0 ; 1/2]j$$

$$\text{Nintake}(t) = 0 \text{ mmol N /100g PC, pour } t \in [1/2 ; 1]j, \text{ pour chaque période de } 1j.$$

Ainsi, la quantité moyenne d'N ingérée simulée est bien de 10 mmol N/100g PC /j.

Les pertes azotées totales ont été calculées en considérant que le système est à l'état stationnaire sur 24h, c'est-à-dire que le bilan azoté global est nul : la somme des pertes azotées cumulées sur 24h est donc égale à l'apport azoté total sur 24h, soit 10 mmol N /100g PC. Les pertes azotées ont été réparties de la manière suivante :

- les pertes azotées diverses (peau et poils) sont estimées à 3% des pertes totales (Rand, 2003), dont environ 20% de pertes par desquamation (soit $f_{\text{ISK}} = 0,05$ mmol N/100g PC /j et $f_{\text{IHa}}=0,25$ mmol N /100g PC /j);

Tableau 19 : valeurs des flux et paramètres k et ε du modèle

notation	Flux de transfert du modèle			paramètre k	paramètre ε
	valeur estimée moyenne ¹ (mmol N /100g PC /j)		hypothèses spécifiques posées ou relations à l'état stationnaire	valeur estimée (j ⁻¹)	valeur estimée (%)
flux d'apport et pertes azotés :					
Nintake	10	(C) [†]			∅
fFL	1,0	(C & SS _{WB})	10% [†] x (fUE + fNH4 + fFL)	2,00	∅
fUE	8,2	(C & SS _{WB})	95% [†] x (fUE + fNH4)	7,52	+1,45
fNH4	0,5	(C & SS _{WB})	5% [†] x (fUE + fNH4)	10,40	-0,49
fIHa	0,25	(C & SS _{WB})		0,006	∅
fISk	0,05	(C & SS _{WB})	fIHa+fISk = 3% ^{††} pertes azotées totales	0,002	∅
flux dans le tractus Gastro-intestinal					
ftSt	10	(C) ^{††}		14,29	∅
fabsSI	12,7	(C) ^{††}		31,75	∅
fsecSI	4,2	(C) ^{††}		30,00	+0,83
ftSI	1,5	(SS _{SI})	ftSI = Nintake + fsecSI - fabsSI	3,75	∅
fabsCC	2,3	(SS _{CCL})	fabsCC = Nintake + fsecSI + fUH - fabsSI - fFL	4,60	-1,71
fUH	1,8	(SS _{BU})	fUH = ∑ _T foX _T - fUE, avec ∑ _T foX _T = fUP = 100% [†] x Nintake	1,70	∅
flux intra-tissulaires de synthèse et dégradation protéiques					
fsSI	1,52	(C)	fsSI = FSR _{SI} x SI _{pr} , avec FSR _{SI} =150% ^{††}	10,82	+1,68
fsL	5,58	(C)	fsL = FSR _L x L _{pr} , avec FSR _L =100%*	15,33	+3,12
fsPI	1,12	(C)	fsPI = FSR _{PI} x PI _{pr} , avec FSR _{PI} =58%*	3,08	+3,76
fsSk	5,08	(C)	fsSk = FSR _{Sk} x Sk _{pr} , avec FSR _{Sk} =25% ^{††}	11,03	+1,88
fsM	9,80	(C)	fsM = FSR _M x M _{pr} , avec FSR _M =11%*	1,51	+4,77
fsK	0,96	(C)	fsK = FSR _K x K _{pr} , avec FSR _K =103%*	19,96	+0,99
fsHe	0,06	(C)	fsHe = FSR _{He} x He _{pr} , avec FSR _{He} =16% ^{††}	2,24	+4,31
fsRBC	0,24	(C)	fsRBC = FSR _{RBC} x RBC _{pr} , avec FSR _{RBC} =3% ^{††}	2,89	+2,71
fsHa	0,25	(SS _{Ha})	fsHa = fIHa	0,54	+1,49
fdSI	1,52	(SS _{SIP})	fdSI = fsSI	1,50	∅
fdL	5,60	(SS _{LP})	fdL = fsL	1,00	∅
fdPI	1,12	(SS _{SIP})	fdPI = fsPI	0,58	∅
fdSk	5,03	(SS _{PIP})	fdSk = fsSk - fISk	0,25	∅
fdM	9,80	(SS _{MP})	fdM = fsM	0,11	∅
fdK	0,96	(SS _{KP})	fdK = fsK	1,03	∅
fdHe	0,06	(SS _{HeP})	fdHe = fsHe	0,16	∅
fdRBC	0,24	(SS _{RBCP})	fdRBC = fsRBC	0,03	∅

C, valeur fixée à priori d'après les données de la littérature ou expérimentales; SS_x, valeur estimée par ajustement afin de satisfaire l'état stationnaire sur le compartiment X ou sur le corps entier WB (i.e. Nintake = fFL + fUE + fNH4 + fIHa + fISk);

†valeur issue de données expérimentales; †† valeur issue de données de la littérature; * valeur issue de résultats de modélisation (article2); ∅, effet isotopique supposé nul; ¹ valeurs moyennes sur un intervalle de temps de 1j; ² pOx est supposé identique pour tous les tissus et calculé tel que fUP = ∑_T foX_T, soit pOx = fUP / ∑_T (fs_T); fUL, pertes urinaires totales = fUE + fNH4; pOx, proportion d'AA tissulaires oxydés vs. utilisés pour les synthèses protéiques; fUP, production totale d'urée corporelle résultant du catabolisme oxydatif des AA tissulaires.

Tableau 19 (suite) : valeurs des flux et paramètres k et ε du modèle

notation	Flux de transfert du modèle			paramètre k	paramètre ε
	valeur estimée moyenne ¹ (mmol N /100g PC /j)		hypothèses spécifiques posées ou relations à l'état stationnaire	valeur estimée (j ⁻¹)	valeur estimée (%)
flux d'oxydation des AA tissulaires					
foxSI	0,63	(C)	$foxSI = fsSI \times pOx$, avec $pOx = 43\%^2$	4,49	-5,77
foxL	2,78	(C)	$foxL = fsL \times pOx$, avec $pOx = 43\%^2$	7,64	-5,77
foxSk	2,11	(C)	$foxSk = fsSk \times pOx$, avec $pOx = 43\%^2$	4,58	-1,82
foxM	4,07	(C)	$foxM = fsM \times pOx$, avec $pOx = 43\%^2$	0,63	+5,08
foxK	0,40	(C)	$foxK = fsK \times pOx$, avec $pOx = 43\%^2$	8,28	-6,66
foxHe	0,02	(C)	$foxHe = fsHe \times pOx$, avec $pOx = 43\%^2$	0,93	-1,38
flux de transferts des AA tissulaires depuis et vers le plasma					
finSI	8,57	(C)	$finSI = fsSI \times TI$, avec $TI = 1,5^{++}$	408,21	∅
finL	10,05	(C)	$finL = fsL \times TI$, avec $TI = 1,5^{++}$	478,53	∅
finSk	4,06	(C)	$finSk = fsSk \times TI$, avec $TI = 0,8^{++}$	193,33	∅
finM	14,70	(C)	$finM = fsM \times TI$, avec $TI = 1,5^{++}$	700,07	∅
finK	1,44	(C)	$finK = fsK \times TI$, avec $TI = 1,5^{++}$	68,42	∅
finHe	0,08	(C)	$finHe = fsHe \times TI$, avec $TI = 1,5^{++}$	4,00	∅
finRBC	0,36	(C)	$finRBC = fsRBC \times TI$, avec $TI = 1,5^{++}$	17,14	∅
foutL	24,89	(SS _{LAA})	$foutL = finL - foxL$	68,39	∅
foutSk	1,66	(SS _{SKAA})	$foutSk = finSk - foxSk$	3,60	∅
foutM	10,64	(SS _{MAA})	$foutM = finM - foxM$	1,64	∅
foutK	0,54	(SS _{KAA})	$foutK = finK - foxK$	11,24	∅
foutHe	0,06	(SS _{HeAA})	$foutHe = finHe - foxHe$	2,43	∅
foutRBC	0,36	(SS _{RBCAA})	$foutRBC = finRBC$	4,34	∅
fPV	16,44	(SS _{SIAA})	$fPV = fabsSI + finSI - fsecSI - foxSI$	117,46	∅

C, valeur fixée à priori d'après les données de la littérature ou expérimentales; SS_x, valeur estimée par ajustement afin de satisfaire l'état stationnaire sur le compartiment X ou sur le corps entier WB (i.e. Nintake = fFL + fUE + fNH4 + fIHa + fISk);
[†]valeur issue de données expérimentales; ^{††} valeur issue de données de la littérature; * valeur issue de résultats de modélisation (article2); ∅, effet isotopique supposé nul; ¹valeurs moyennes sur un intervalle de temps de 1j; ² pOx est supposé identique pour tous les tissus et calculé tel que $fUP = \sum_T fox_T$, soit $pOx = fUP / \sum_T (fs_T)$; fUL, pertes urinaires totales = fUE + fNH4; pOx, proportion d'AA tissulaires oxydés vs. utilisés pour les synthèses protéiques; fUP, production totale d'urée corporelle résultant du catabolisme oxydatif des AA tissulaires.

- on estime que les pertes fécales représentent 10% de l'ensemble des pertes urinaires et fécales (soit $f_{FL} = 1 \text{ mmol N /100g PC /j}$) : cette répartition des pertes urinaires et fécales a été mesurée dans une expérimentation précédente, en parallèle de la mesure de la consommation alimentaire, sur des rats soumis à un régime alimentaire contenant 20% de protéines de lait et dans des conditions similaires;
- la proportion d'ammoniaque et d'urée dans les pertes urinaires est estimée à partir des teneurs en urée et ammoniaque quantifiées dans les échantillons d'urine prélevés dans la vessie des rats, soit environ 95% de l'azote urinaire sous forme d'urée (soit $f_{UE} = 8,2 \text{ mmol N /100g PC /j}$) et 5% sous forme d'ammoniaque (soit $f_{NH4} = 0,5 \text{ mmol N /100g PC /j}$). L'excrétion de créatinine urinaire est négligée dans le modèle en l'absence de donnée expérimentale sur ce flux.

Calibration des flux gastro-intestinaux :

Le paramètre de vidange gastrique k_{tst} est fixé de manière à ce que 95% de la quantité d'azote présente dans l'estomac soit vidangée en 5h (soit un temps de demi-vidange d'environ 1,2h), selon des données obtenues au laboratoire sur des rats dans des conditions similaires (Boutry *et al.* 2011; Morens *et al.* 2000).

Le flux d'absorption intestinale correspond à l'absorption depuis la lumière intestinale d'N alimentaire et d'N endogène. D'après les données de la littérature (Souffrant *et al.* 1993; Krawielitzki *et al.* 1990), il est estimé représenter environ 130% de l'apport alimentaire moyen sur 24h (soit $f_{absSI} = 12,7 \text{ mmol N /100g PC /j}$).

Le flux d'N depuis le compartiment d'AA libres de la muqueuse intestinale vers la lumière intestinale (f_{secSI}) représente le flux de sécrétions endogènes, constituées majoritairement d'enzymes pancréatiques et de P issues de la desquamation de la muqueuse intestinale mais également de sécrétions gastriques, biliaires, de P du mucus et d'urée. La valeur de ce flux est estimée à 42% de l'apport alimentaire, sur la base de données de la littérature et du laboratoire obtenues chez le porc et le rat (Souffrant *et al.* 1993; Krawielitzki *et al.* 1990; Deglaire *et al.* 2008).

Les flux de transfert entre les différents compartiments gastro-intestinaux et le flux d'absorption depuis la lumière colique ont été ajustés par rapport aux données expérimentales.

Calibration des flux tissulaires :

Les définitions et notations adoptées pour les flux tissulaires sont explicitées dans la Figure 64.

L'hypothèse d'état stationnaire sur les compartiments protéiques implique l'égalité des flux de synthèse et de dégradation protéiques journaliers moyens pour chaque tissu. Les flux de synthèse protéiques sont estimés à partir des taux de renouvellement protéiques tissulaires selon la formule :

$$f_{sT} = FSR_T * T_p,$$

où f_{sT} représente le flux de synthèse protéique du tissu T (mmol N /100g PC/j), FSR_T , son taux de renouvellement ($\%/j$) et T_p , la taille de sa fraction protéique (mmol N /100g PC).

Les valeurs de FSR utilisées sont celles estimées dans l'ÉTUDE 3, pour les tissus dont nous avons pu estimer le FSR moyen, ou, pour les autres tissus, la moyenne des valeurs de FSR de la littérature obtenues en conditions nutritionnelles variées (voir Tableau 3, chapitre 1).

Les flux d'alimentation des pools d'AA tissulaires depuis le pool d'AA plasmatiques (f_{inT}) sont supposés proportionnels aux flux de synthèse selon la relation

$$f_{inT} = f_{sT} * TI_T,$$

où TI représente l'indice de transport du tissu T tel que défini dans les méthodes de bilan artérioveineux (c.-à-d., le rapport des flux d'AA entrant dans le tissu et des flux utilisés pour les synthèses protéiques, Waterlow, 2006).

Sur la base de données bibliographiques, nous avons fait l'hypothèse que cet indice était identique pour tous les tissus et égal à 1,5 (Biolo *et al.* 1995b; Biolo *et al.* 1997; Biolo *et al.* 1995c; Tessari *et al.* 1996a; Waterlow 2006; Banos *et al.* 1973) sauf pour la peau dont le TI a été fixé à une valeur inférieure, soit 0,8 (Zhang *et al.* 2003) (voir Tableau 4, chapitre 1). Il est à noter que pour le foie et l'IG, f_{inL} et f_{inSI} sont présumés proportionnels à la somme des flux de synthèses de P constitutives (f_{sL} pour le foie et f_{sSI} pour l'IG) et exportées (c.-à-d. f_{sPI} , le flux de synthèses des P plasmatiques, dans le cas du foie, et f_{secSI} , le flux de P intestinales sécrétées dans la lumière intestinale, dans le cas de l'IG), soit :

$$f_{inL} = TI * (f_{sL} + f_{sPI}) \text{ et } f_{inSI} = TI * (f_{sSI} + f_{secSI}).$$

Les flux d'oxydation tissulaires sont également supposés proportionnels aux flux de synthèse de chaque tissu, selon la relation :

$$f_{oxT} = pOx_T \times f_{sT},$$

où f_{oxT} représente le flux d'oxydation du tissu T et pOx_T , la proportion relative d'AA tissulaires utilisés pour le catabolisme oxydatif vs pour les synthèses protéiques.

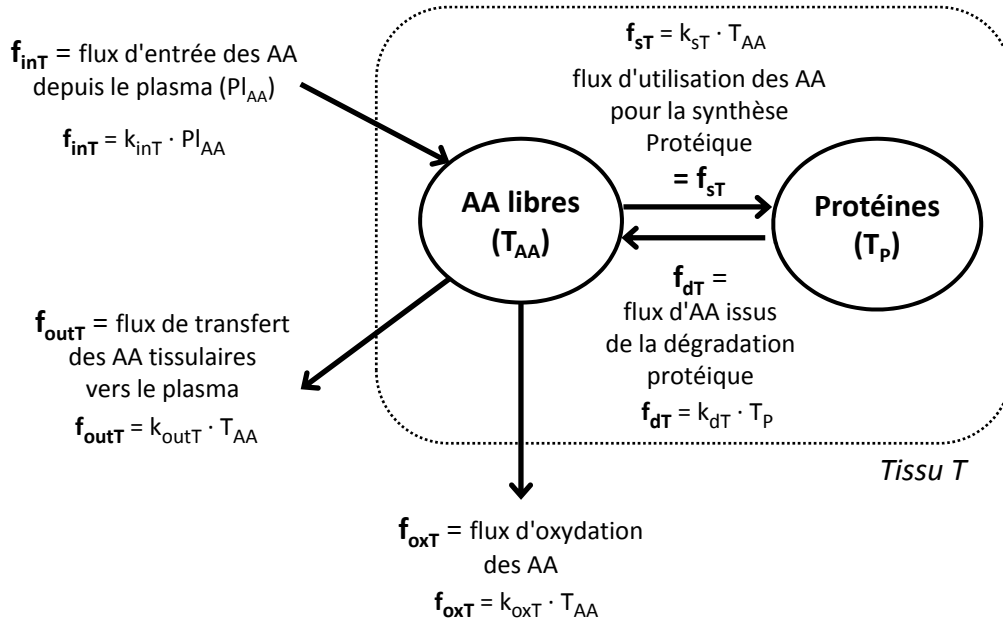
Du fait de l'absence de données sur les flux oxydatifs tissulaires spécifiques, nous avons fait l'hypothèse parcimonieuse que la proportion pOx_T était identique pour tous les tissus. Cette proportion a été calculée de manière à ce que le flux total journalier moyen de production d'urée (f_{UP}) soit égal à l'apport azoté journalier moyen, en accord avec les données de la littérature (voir Tableau 2, chapitre 1), soit $f_{UP} = \sum_T f_{oxT} = 10 \text{ mmol N} / 100\text{g PC} / \text{j}$. La valeur de pOx ainsi estimée est de 43%.

Les flux d'export d'AA libres tissulaires vers les AA plasmatiques (f_{outT}) ainsi que le flux de transfert d'AA de l'intestin vers le foie (f_{PV}) ont été ajustés pour rendre compte des données expérimentales de tailles des compartiments d'AA tissulaires et maintenir l'état stationnaire sur l'ensemble des compartiments tissulaires.

I.2.iii. Paramétrage des facteurs de fractionnement : hypothèses et données utilisées

L'observation de différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre les différents tissus et fractions (par ex., P, AA, urée) indique l'existence d'effets isotopiques associés à certains transferts d'N dans le système, c'est-à-dire un passage préférentiel de l'un ou l'autre des isotopes de l'N le long de certaines voies d'échanges ou de transformation. Ces effets isotopiques sont formalisés mathématiquement par des facteurs de

Figure 64 : Définitions des principaux flux d'échanges pour un tissu T



- k_{xT} représente le taux de transfert (ou coefficient de transfert) associé au flux f_{xT}

- **Taux de synthèse protéique fractionnelle** ou **taux de renouvellement protéique (FSR_T)** = quantité de protéines synthétisées relativement à la taille du pool protéique. $\rightarrow FSR_T = \frac{f_{sT}}{T_P}$

- **Indice de transport intratissulaire (TI_T)** = rapport entre le flux entrant d'AA depuis le plasma et le flux d'AA utilisés pour les synthèses protéiques. $\rightarrow TI_T = \frac{f_{inT}}{f_{sT}}$

- **Proportion d'oxydation (pOx_T)** = proportion d'AA intra-tissulaires libres oxydés vs. utilisés pour les synthèses protéiques. $\rightarrow pOx_T = \frac{f_{oxT}}{f_{sT}}$

De nombreuses données sont disponibles dans la littérature pour FSR (Tableau 3), quelques unes pour TI (Tableau 4) mais très peu pour pOx (Tableau 4).

fractionnement ϵ , dont les valeurs ont été ajustées de manière à rendre compte des différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre compartiments. Ce paramétrage des ϵ a été mené secondairement au paramétrage des flux d'N et à partir des valeurs des paramètres k définis précédemment. Les $\delta^{15}\text{N}$ ayant été mesurés, avec les quantités d'N, après une période de jeûne de 12h, le paramétrage des ϵ a également été réalisé en tenant compte de l'impact de l'alternance des phases postprandiale et postabsorptive sur les $\delta^{15}\text{N}$, c'est-à-dire en considérant un apport alimentaire discontinu sur 24h, tel que décrit précédemment.

Comme le nombre élevé de voies d'échanges par rapport aux mesures de $\delta^{15}\text{N}$ ne permet pas de déterminer un ϵ unique pour chacune des voies, il a fallu recourir à certaines hypothèses simplificatrices pour contourner ce problème d'identifiabilité. Le choix d'associer ou non un effet isotopique à un flux donné a été guidé d'une part par les données expérimentales et d'autre part par les quelques données bibliographiques disponibles concernant les processus biochimiques susceptibles d'engendrer un fractionnement isotopique (Tableau 19 ; Tableau 12, chapitre 1). Globalement, nous avons fait l'hypothèse qu'il n'y avait pas d'effet isotopique associé aux voies de transfert simple d'azote sans transformation biochimique. Les transferts concernés sont les flux d'échanges entre le compartiment d'AA plasmatiques et chaque compartiment d'AA tissulaires ($\epsilon_{\text{inT}} = 0$ et $\epsilon_{\text{outT}} = 0$ pour $T = \text{Muscle, Reins, Peau, Cœur et RBC}$), les flux de transfert le long du tractus gastro-intestinal ($\epsilon_{\text{tSt}} = \epsilon_{\text{tSI}} = 0$), les flux de pertes azotées fécales, dermiques et pilaires ($\epsilon_{\text{FL}} = \epsilon_{\text{HaL}} = \epsilon_{\text{SKL}} = 0$) et le flux de transfert d'urée vers la lumière colique ($\epsilon_{\text{UH}} = 0$). Les ϵ associés aux autres voies et potentiellement non nuls ont été calibrés afin de rendre compte des données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$, de la manière suivante :

- La différence de $\delta^{15}\text{N}$ entre les pools d'AA et de P dans chaque tissu implique l'existence d'un effet isotopique associé soit au flux de protéosynthèse, soit au flux de protéolyse, soit aux deux flux (puisque à l'équilibre isotopique la différence de $\delta^{15}\text{N}$ entre fractions P et AA est non nulle et égale à la différence d' ϵ sur les voies de protéosynthèse et protéolyse (voir fiche technique n°1, chapitre 1). Par souci de parcimonie, nous avons choisi de ne considérer que l'effet isotopique sur une seule de ces deux voies (la protéosynthèse) et de ne pas considérer d'effet isotopique associé aux voies de dégradation (soit $\epsilon_{\text{dT}} = 0$, pour tous les tissus). Pour chaque tissu, le paramètre ϵ_{sT} correspond ainsi à l'effet isotopique « net » associé aux voies couplées de protéosynthèse et protéolyse et a été ajusté pour rendre compte des enrichissements isotopiques dans les compartiments AA et P tissulaires.
- Au niveau périphérique, la prise en compte d'un effet isotopique associé aux flux d'oxydation dans chaque tissu est nécessaire et suffisante pour rendre compte des différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre les différents compartiments d'AA tissulaires, d'AA plasmatiques et d'urée corporelle.
- Les données de $\delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement dans les compartiments lumaux du tractus gastro-intestinal présentent une variabilité plus importante que celles obtenues dans les autres compartiments. Ceci provient du fait que ces compartiments, qui mélangent des composés azotés alimentaires et endogènes ayant des $\delta^{15}\text{N}$ distincts, ont des valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ qui dépendent beaucoup du temps écoulé depuis la dernière prise alimentaire (c.-à-d. de la proportion d'N alimentaire encore présente) et qui varient donc aussi beaucoup entre rats. Sur la base de nos données moyennes, nous

avons considéré que le $\delta^{15}\text{N}$ du contenu stomacal était égal à celui du régime en phase postprandiale. De plus, des ϵ non nuls ont été considérés sur les flux de sécrétion vers la lumière intestinale (f_{secSI}) et d'absorption depuis la lumière caeco-cecale (f_{absCC}), afin de rendre compte de la différence de $\delta^{15}\text{N}$ entre la lumière intestinale et les AA intestinaux et de permettre une variation des $\delta^{15}\text{N}$ le long du tractus gastro-intestinal.

- Au niveau splanchnique, des ϵ non nuls sont nécessaires sur les voies d'oxydation des AA intestinaux (ϵ_{oxSI}) et hépatiques (ϵ_{oxL}) et sur la voie de transfert d'AA de l'intestin vers le foie (ϵ_{PV}) pour rendre compte des différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre compartiments. Plusieurs combinaisons de valeurs étant possibles pour le couple de paramètres (ϵ_{oxSI} ; ϵ_{oxL}), nous avons posé $\epsilon_{\text{oxSI}} = \epsilon_{\text{oxL}}$.
- Enfin, un ϵ non nul est requis sur le flux d'excrétion de l'urée urinaire (ϵ_{UE}) afin de permettre l'équilibre isotopique global du système, et sa valeur a été estimée suivant l'équation correspondante, soit :

$$N_{\text{intake}} * \delta N_{\text{intake}} = f_{\text{FL}} * \delta_{\text{CCL}} + f_{\text{UE}} * (\delta_{\text{BU}} + \epsilon_{\text{UE}}) + f_{\text{NH}_4} * \delta_{\text{UrNH}_4} + f_{\text{ISK}} * \delta_{\text{SKP}} + f_{\text{IHa}} * \delta_{\text{Ha}}$$

I.2.iv. Fonctionnement global du système : simulations et vraisemblance physiologique

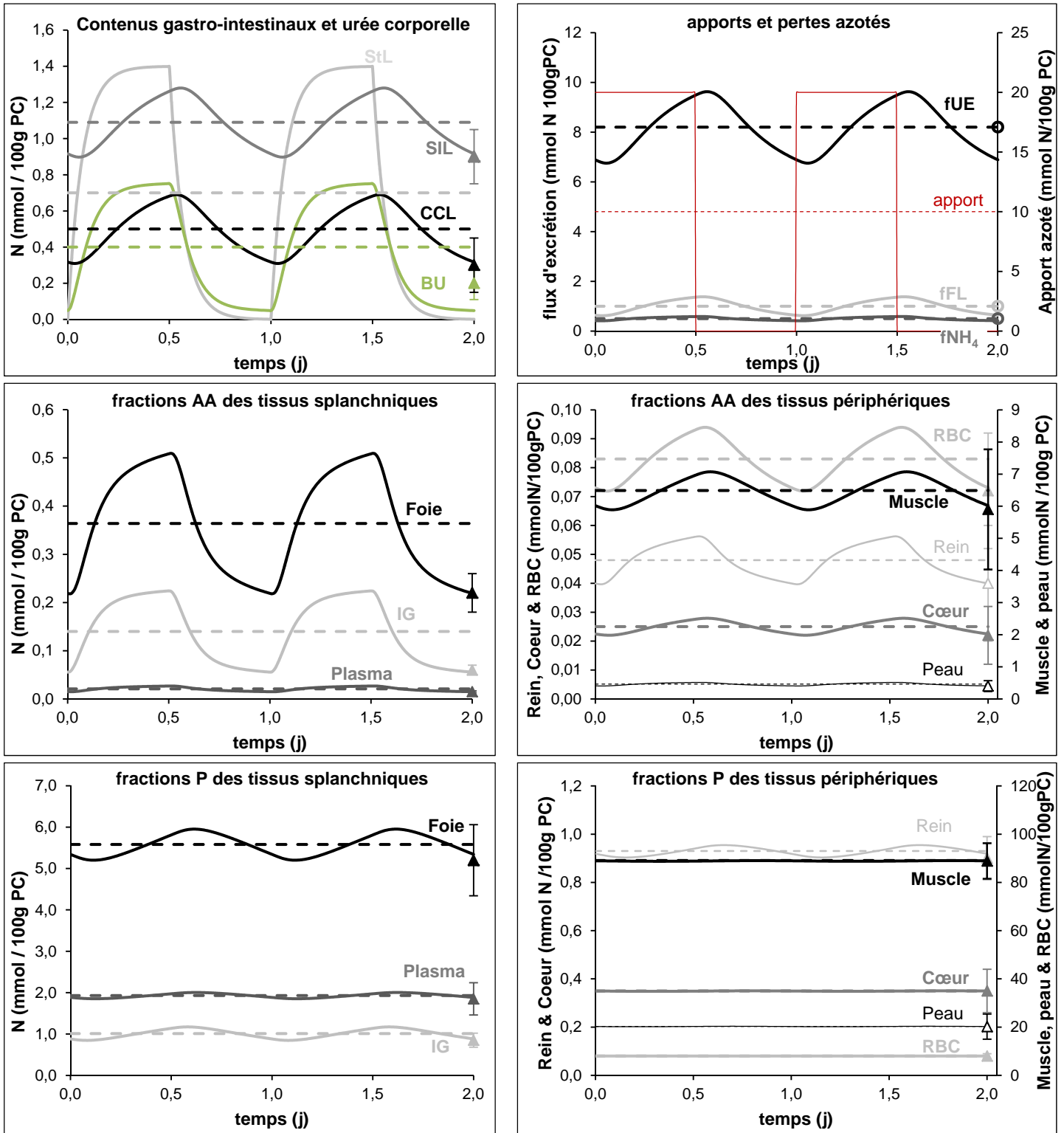
Le modèle ainsi paramétré permet de reproduire, par simulation, les données expérimentales de quantités d'azote et de composition isotopique mesurées dans chacun des compartiments du modèle après une période de jeûne de 12 heures (**Figures 65 & 66**), lorsque l'on considère un apport alimentaire discontinu tel que décrit précédemment.

Vraisemblance et interprétation des flux et tailles d'N simulés par le modèle

La simulation du modèle avec un apport azoté constant moyen (10 mmol N /j) permet de prédire les flux d'azote journaliers moyens dans l'ensemble du système. Parmi les flux non fixés *a priori* à partir de données de la littérature, on peut faire les observations suivantes :

- Le flux d'absorption caeco-colique correspond à la réabsorption d'N issu de l'hydrolyse de l'urée, sous forme d'ammoniaque ou d'AA, ainsi qu'à l'absorption d'N endogène ou alimentaire provenant de la lumière de l'intestin grêle (et non absorbé à ce niveau). La valeur de ce flux, prédite par le modèle, correspond à 23% de l'apport moyen sur 24h, ce qui représente 15% de l'absorption totale sur l'ensemble du tractus gastro-intestinal. Cette valeur est cohérente avec les données de Krawielitzki *et al.*, qui ont mesuré une absorption colique représentant environ 18% de l'absorption totale (Krawielitzki *et al.* 1990), mais un peu supérieure aux données de Souffrant *et al.* (Souffrant *et al.* 1993) et Fuller & Reeds (Fuller & Reeds 1998), qui estiment que le flux d'absorption colique représente seulement 4 à 11% de l'apport alimentaire.
- Le flux d'absorption intestinale a été fixé à environ 130% de l'apport alimentaire moyen sur 24h. Si l'on considère qu'environ 25% de ce flux correspond à une absorption d'azote endogène (Fuller & Reeds 1998; Souffrant *et al.* 1993) la digestibilité protéique iléale prédite par le modèle est de 95%, ce qui est cohérent avec les données publiées chez le rat pour des protéines de lait (Boutry *et al.* 2011).
- La valeur du flux de transfert d'urée vers le colon (f_{UH}) prédite par le modèle est de 1,8 mmol N /100g PC/j. Ce flux représente, dans notre modèle, la première étape du recyclage entéro-hépatique de l'urée,

Figure 65 : Ajustements des prédictions du modèle aux données expérimentales pour les tailles en N de chaque compartiment.

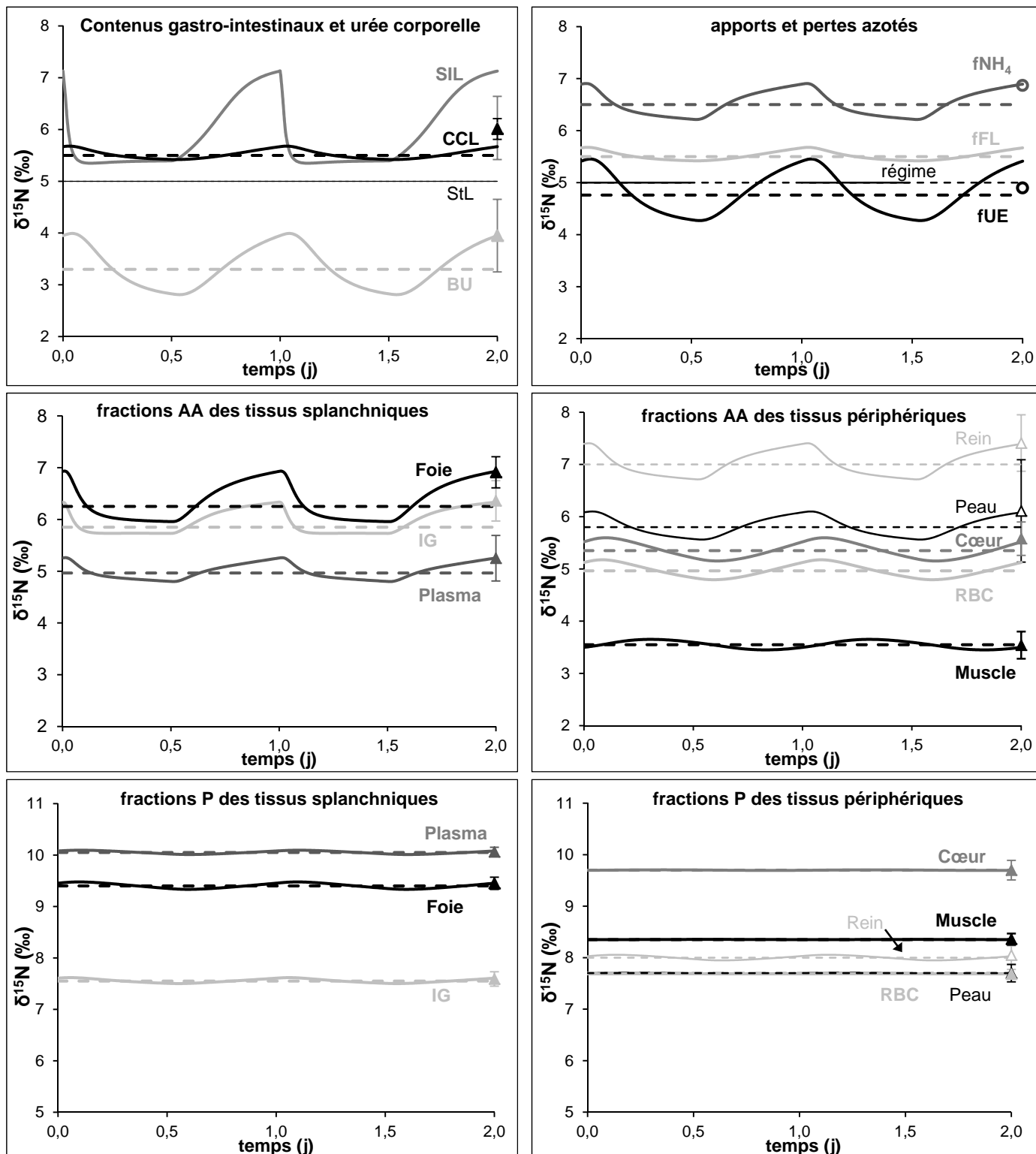


- simulations du modèle avec un apport alimentaire discontinu
- - - simulations du modèle avec un apport constant
- ▲ données expérimentales (valeurs obtenues après 12h de jeûne)
- données expérimentales (valeurs moyennes sur 24h)

Les quantités d'azote dans les compartiments ont été simulées avec un apport alimentaire constant (simulations présentées en pointillés) ou discontinu avec une phase nourrie et une phase de jeûne de 12h chacune (simulations présentées en traits pleins). Les données expérimentales ont été obtenues après une période de jeûne de 12h (triangles), sauf certaines données d'excrétion qui correspondent à des valeurs moyennes sur 24h (ronds vides).

StL, lumière gastrique; SIL, lumière intestinale; CCL, lumière caeco-colique; BU, urée corporelle; IG, muqueuse intestinale; P, protéines; AA, acides aminés libres; RBC, cellules sanguines; fUE, flux d'excrétion urinaire d'urée; fNH₄, flux d'excrétion urinaire d'ammonium; fFL, flux d'excrétion fécale.

Figure 66 : Ajustements des prédictions du modèle aux données expérimentales pour les $\delta^{15}\text{N}$ de chaque compartiment.



- simulations du modèle avec un apport alimentaire discontinu
- - - simulations du modèle avec un apport constant
- ▲ données expérimentales (valeurs obtenues après 12h de jeûne)
- données expérimentales (valeurs moyennes sur 24h)

Les enrichissements isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) dans les compartiments ont été simulés avec un apport alimentaire constant (simulations en pointillés) ou discontinu avec une phase nourrie et une phase de jeûne de 12h chacune (simulations en traits pleins). Les données expérimentales ont été obtenues après une période de jeûne de 12h (triangles), sauf certaines données d'excrétion qui correspondent à des valeurs moyennes sur 24h (ronds vides).

IG, muqueuse intestinale; P, protéines; AA, acides aminés libres; RBC, cellules sanguines; fUE, flux d'excrétion urinaire d'urée; fNH₄, flux d'excrétion urinaire d'ammonium; fFL, flux d'excrétion fécale.

c'est-à-dire la quantité d'urée corporelle qui échappe à l'excrétion urinaire et est hydrolysée au niveau du colon par la flore bactérienne. Le modèle prédit donc que 18% de la quantité d'urée produite par jour n'est pas excrétée mais hydrolysée. Cette valeur est comparable aux valeurs rapportées dans plusieurs études réalisées chez l'homme (voir Tableau 2, chapitre 1) mais supérieure aux valeurs rapportées chez le rat (Younes *et al.* 1996; Younes *et al.* 1995). Notre modèle ne permet pas de distinguer quelle proportion de l'urée ainsi recyclée est effectivement épargnée (c'est-à-dire finalement réincorporée dans les pools d'AA et de P) ou participe au cycle futile de l'urée (c'est-à-dire de nouveau orientée vers le pool d'urée corporelle et in fine excrétée dans les urines).

- Les flux de synthèses simulés par le modèle montrent que la zone périphérique contribue à plus de 65% à la synthèse protéique globale (en termes de flux de synthèses absolus ou ASR), malgré des taux de FSR protéiques supérieurs dans la zone splanchnique. Cette prédiction est, une fois encore, cohérente avec les données bibliographiques et nos connaissances générales sur le fonctionnement du métabolisme protéique (Tableau 20).

La représentation de la prise alimentaire par un apport discontinu sur 24h (avec une période d'alimentation pendant laquelle l'apport azoté est considéré constant, suivie d'une période de jeûne) permet de mimer de façon schématique les phases post-absorptives et postprandiales. Les évolutions des tailles des compartiments ainsi obtenues présentent des oscillations périodiques, avec globalement une augmentation des quantités d'N dans les compartiments pendant la phase nourrie et une diminution pendant la phase de jeûne. Ainsi, les données expérimentales mesurées à la fin la période de jeûne correspondent aux valeurs minimales simulées, dans tous les tissus sauf dans le muscle, pour lequel les oscillations sont légèrement décalées, ce qui rend bien compte du délai nécessaire à la captation musculaire de l'azote alimentaire. L'amplitude des oscillations est plus importante dans les compartiments des tissus splanchniques, et notamment dans les AA splanchniques où les quantités d'azote varient de 80 à 120% par rapport à leur valeur moyenne, ce qui est cohérent avec le fait que les tissus splanchniques sont directement alimentés par les AA alimentaires et donc davantage affectés par des variations de l'apport alimentaire que les tissus périphériques. L'amplitude des oscillations des quantités d'N est globalement plus faible dans les compartiments de P que d'AA du fait de la différence de taille de ces compartiments, qui induit une plus faible contribution relative de l'N alimentaire au contenu en N dans les P que les AA. En particulier, les oscillations dans les compartiments de P périphériques sont très faibles (entre 0 et 5% de la valeur moyenne).

Afin de comparer les prédictions du modèle aux valeurs de flux estimées par les méthodes de bilans d'organes (**Tableau 21**), il est possible de calculer les bilans apparents d'AA dans les tissus splanchniques de la manière suivante :

$$B_{SI} = f_{inSI} - f_{PV} \text{ et } B_L = (f_{inL} + f_{PV}) - f_{outL}$$

où B_{SI} représente le bilan net d'AA à travers la muqueuse intestinale et B_L , le bilan net d'AA à travers le foie. Un bilan net négatif indique une libération nette d'AA alors qu'un bilan net positif indique un prélèvement net d'AA. D'après les simulations du modèle, le bilan net moyen d'AA dans l'intestin est négatif (≈ -8 mmol N /100g PC /j) : il est diminué pendant la phase nourrie (≈ -12 mmol N /100g PC /j) mais

plus élevé pendant la phase de jeûne. Cela signifie que l'intestin libère globalement des AA vers le reste de l'organisme, cette libération ayant lieu très majoritairement à l'état nourri. Le bilan net simulé pour le foie est à l'inverse positif pendant la phase nourrie ($\approx 4 \text{ mmol N /100g PC /j}$) mais devient légèrement négatif pendant la phase de jeûne, ce qui correspond à un prélèvement global net d'AA par le foie sur 24h avec une faible libération nette pendant la phase postabsorptive. Bien que ces valeurs ne soient pas quantitativement directement comparables aux données issues des méthodes de bilans d'organes, elles semblent cohérentes par rapport à l'ensemble des données de la littérature qui mettent en évidence une libération nette d'AA par l'intestin à l'état nourri et, à l'inverse, un prélèvement hépatique net des AA (Barrett *et al.* 1986; Bloomgarden *et al.* 1981).

Signification physiologique des facteurs de fractionnement ϵ estimés et vraisemblance des $\delta^{15}\text{N}$ simulés

Les données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$ utilisées pour calibrer le modèle montrent des variations importantes entre tissus et entre fractions azotées. Les différents tissus et fractions échantillonnés sont enrichis en ^{15}N par rapport au régime alimentaire, à l'exception des AA musculaires et de l'urée plasmatique, avec des valeurs de discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N} = \delta^{15}\text{N}_{\text{fraction ou tissu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{régime}}$) variant de -1,5 à 5‰ (Tableau 18). Ces valeurs se situent parfaitement dans la gamme des valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ rapportées dans la littérature chez diverses espèces ($\Delta^{15}\text{N} = 0,5$ à 5‰, (Post 2002); $\Delta^{15}\text{N} = -0,7$ à 9,2‰, (Vander Zanden & Rasmussen 2001)) et plus spécifiquement chez le rat ($\Delta^{15}\text{N} = -1,5$ à 4,6‰, (Yoneyama *et al.* 1983; Caut *et al.* 2008); voir Tableau 15, chapitre 1). Notre modèle confirme l'existence d'effets isotopiques associés à certaines voies métaboliques, qui induisent et expliquent les différences de $\delta^{15}\text{N}$ inter et intra-tissulaires observées, et fournit un moyen d'estimer les facteurs de fractionnement ϵ (Tableau 19). Il existe encore très peu de données quantitatives concernant les facteurs de fractionnement associés aux réactions métaboliques permettant d'évaluer la plausibilité des valeurs prédites par le modèle.

- Il est intéressant de noter que, pour tous les tissus échantillonnés, les fractions protéiques tissulaires sont enrichies en ^{15}N par rapport aux fractions non protéiques, avec des variations importantes de cette discrimination isotopique en fonction des tissus : la différence de $\delta^{15}\text{N}$ entre les fractions P et AA est très importante dans le muscle (4,8‰) et dans le cœur (4,1‰), mais presque nulle dans le rein (0,6‰). À l'équilibre isotopique, cette différence est égale à l'effet isotopique net associé aux flux de synthèse et dégradation protéiques : $\delta^{15}\text{N}_{\text{Peq}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{AAeq}} = \epsilon_s$ (Figure 63). Du fait de l'enrichissement systématiquement supérieur en ^{15}N des P par rapport aux AA libres, les facteurs de fractionnement ϵ associés aux flux de synthèse protéique prédits par le modèle sont positifs pour tous les tissus. Ces paramètres traduisent une utilisation sélective des AA enrichis en ^{15}N pour les synthèses protéiques et/ou une libération sélective d'AA appauvris en ^{15}N par les dégradations protéiques, en accord avec les rares données de la littérature portant sur les effets isotopiques de ces processus *in vitro* (Silfer *et al.* 1992). Ils peuvent également traduire indirectement une orientation préférentielle des AA portant l'isotope léger vers les autres voies métaboliques intracellulaires comme les transaminations (Macko *et al.* 1986). Finalement,

Tableau 20 : comparaison des prédictions du modèle et des données de la littérature concernant la contribution relative des différents tissus à la synthèse protéique corporelle totale.

	Contribution à la masse protéique corporelle totale		Contribution à la synthèse protéique corporelle totale ¹	
	prédictions du modèle ²	données de la littérature ³	prédictions du modèle ²	données de la littérature ³
Muqueuse intestinale	0,6%	1,3%	6,2%	6%
Foie	3,4%	7%	22,7%	25%
Plasma	1,2%		4,6%	
Région splanchnique	5,1%		33,4%	
Peau	12,2%		20,6%	
Muscle	53,6%	39%	39,8%	23%
Rein	0,6%	0,8%	3,9%	1%
Coeur	0,2%	0,6%	0,2%	0,4%
Cellules sanguines	4,8%		1,0%	
Poils	23,4%		1,0%	
Région périphérique	94,9%		66,6%	

¹ calculée comme le rapport entre le flux de synthèse protéique du tissu et le flux protéique corporel global : $f_{sT} / \sum_T(f_{sT})$;

²valeurs moyennes prédites par le modèle sur 24h, pour des rats adultes (18 semaines); ³données de Goldspink 1984, Lewis 1984 & Goldspink 1984 obtenues sur des rats d'environ 15 semaines (210g)

Tableau 21 : comparaison des prédictions du modèle et des données de la littérature concernant le bilan net d'AA totaux à travers les zones splanchnique et périphérique.

	Bilan Net d'AA* (mmolN /100gPC /j)					
	prédictions du modèle			données de la littérature ¹		
	phase PP	phase PA	μ sur 24h	phase PP ²	phase PA ³	μ sur 24h ⁴
Région splanchnique	-8,2	-4,4	-6,3	<i>[-6,1 ; +1,8]</i>	<i>[+0,6 ; +10]</i>	<i>[+0,5 ; +1,2]</i>
Muqueuse intestinale	-11,8	-3,9	-7,9	<i>[-8,3 ; -0,7]</i>	<i>[-0,3 ; +4,1]</i>	<i>[-0,5 ; -2,6]</i>
Foie	3,7	-0,5	1,6	<i>[0,7 ; 8,8]</i>	<i>[-1,3 ; +5,9]</i>	<i>[+1 ; +3,8]</i>
Région périphérique	2,8	-1,2	0,8			

* calculé comme la différence entre le flux entrant d'AA du plasma (artère ou veine porte) vers le tissu et le flux sortant d'AA du tissu vers le plasma : $finT - foutT - foxT$. Un bilan négatif indique une libération nette d'AA par le tissu. Pour le foie, le bilan net est égal à $finL + fPV - foutL$, pour la muqueuse intestinale, le bilan net est égal à $finSI - fPV$. PP, Post-prandiale; PA, Postabsorptive; μ , valeur moyenne. ¹ données obtenues sur différentes espèces (chien, porc, rat, homme). ² données issues de : Bloomgarden, 1981; Hartman, 1992; Van de Poll, 2004. ³ données issues de Bloomgarden, 1981; Hartman, 1992; Remesy, 1997; Bos, 2004; Stoll, 1998. ⁴ données issues de Bloomgarden, 1981; Hartman, 1992.

l' ϵ net associé aux voies d'échanges entre AA et P représente les effets isotopiques agrégés des processus de protéosynthèse, protéolyse et transaminations.

- Au niveau du tractus gastro-intestinal, le modèle prédit une légère augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les contenus intestinaux et caeco-coliques par rapport au régime alimentaire, conduisant à des pertes fécales enrichies en ^{15}N d'environ 1‰ par rapport au régime. Ces observations sont cohérentes avec les données de la littérature qui rapportent également un enrichissement en ^{15}N des fèces par rapport à l'alimentation (Hwang *et al.* 2007; Sutoh *et al.* 1987; Sutoh *et al.* 1993; Barboza & Parker 2006; Steele & Daniel 1978; Kuhnle *et al.* 2012; Sponheimer *et al.* 2003); voir Tableau 13, chapitre 1), mais cet enrichissement rapporté, qui vaut 1 à 3‰ selon les études, est plus important (environ) que celui que nous observons et simulons. Cependant les données de littérature concernent majoritairement des mesures réalisées chez des ruminants dont le métabolisme particulier au niveau du rumen est susceptible de modifier les $\delta^{15}\text{N}$ des fèces. Globalement, l'enrichissement en ^{15}N des pertes fécales s'explique par la présence dans les fèces de P endogènes, principalement issues de la desquamation de la muqueuse colique, et de composés azotés bactériens (Sponheimer *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2011). Une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ le long du tractus gastro-intestinal a également été mise en évidence chez des petits rongeurs (Hwang *et al.* 2007) et chez la chèvre (Sutoh *et al.* 1987), avec des valeurs supérieures dans le colon par rapport aux autres compartiments luminaux. L'enrichissement relatif dans le colon est expliqué par l'activité bactérienne et par l'absorption d'ammoniaque et d'AA potentiellement appauvris en ^{15}N issus en partie du métabolisme bactérien. Dans notre modèle, le flux d'absorption colique f_{absCC} représente la réabsorption d'azote issu de l'hydrolyse de l'urée (sous forme d' NH_4^+ ou d'AA produits par les bactéries) et l'absorption d'azote endogène ou alimentaire. Considérant que le flux de transfert d'urée corporelle vers la lumière caeco-colique représente un phénomène de diffusion passive (l'urée diffusant librement dans tous les compartiments liquidiens de l'organisme), nous avons fait l'hypothèse qu'il n'y avait pas d'effet isotopique associé à ce flux. Par conséquent, l' ϵ négatif associé à f_{absCC} , qui est prédit par le modèle, représente de manière intégrée les effets isotopiques associés à la fois à l'hydrolyse de l'urée par les bactéries coliques et à la réabsorption de composés azotés issus du métabolisme bactérien, dont le $\delta^{15}\text{N}$ diffère probablement de celui des composés azotés endogènes.

- Le modèle prédit un ϵ positif associé au flux de sécrétions endogènes vers la lumière intestinale f_{secSI} , ce qui signifie que le $\delta^{15}\text{N}$ de l'ensemble de ces sécrétions est supérieur à celui des AA intestinaux. Ceci est cohérent avec le fait que les composés sécrétés sont majoritairement des P (pancréatiques, intestinales ...), et que les P ont un $\delta^{15}\text{N}$ généralement supérieur à celui des AA libres. Cet ϵ peut également agréger un effet isotopique inverse sur la voie en sens opposé (f_{absSI} , dont l' ϵ est fixé à zéro pour des raisons d'identifiabilité), c'est-à-dire refléter une digestion et/ou absorption préférentielle de composés appauvris en ^{15}N depuis la lumière intestinale, tel que cela a été proposé dans certaines études (Hwang *et al.* 2007).

- D'après le modèle, les ϵ associés aux flux d'oxydation des AA tissulaires sont négatifs pour tous les tissus à l'exception du muscle. Ces ϵ représentent les effets isotopiques agrégés associés d'une part aux processus de désamination des AA pour la production d'urée et d'autre part au métabolisme

intratissulaire des AA et notamment aux réactions de transaminations et d'interconversions d'AA. Le fait que nous trouvions des ϵ négatifs dans la plupart des tissus est cohérent avec le fait que désaminations et transaminations utiliseraient préférentiellement des AA légers portant le ^{14}N (Macko *et al.* 1986; Handley & Raven 1992). L'effet isotopique opposé sur le flux d'oxydation musculaire (c.-à-d., son ϵ positif) provient du fait que les AA musculaires sont appauvris par rapport à l'urée corporelle, contrairement aux AA des autres tissus. Cet ϵ_{ox} musculaire positif est cohérent avec le fait que le muscle libère en grande quantité de la glutamine, qui est un des AA les plus enrichis en ^{15}N (Gaebler *et al.* 1966; Petzke & Lemke 2009), et sert largement de précurseur pour alimenter la production d'urée. La variabilité de l'amplitude et du signe des effets isotopiques associés aux flux oxydatifs selon les tissus suggère que les AA orientés vers la production d'urée sont de nature différente selon les tissus et/ou subissent des transaminations et interconversions métaboliques plus ou moins nombreuses selon les tissus, ce qui paraît cohérent avec le fait que les différents tissus ne synthétisent pas les mêmes P et n'ont donc pas les mêmes besoins métaboliques en AA.

- L' ϵ positif associé au flux d'excrétion urinaire d'urée rend compte de l'enrichissement en ^{15}N de l'urée urinaire par rapport à l'urée corporelle observé expérimentalement ($\epsilon_{\text{UE}} = \delta_{\text{UE}} - \delta_{\text{BU}}$). Cet enrichissement relatif peut s'expliquer par l'existence d'un effet isotopique associé aux phénomènes d'absorption et de réabsorption partielle de l'urée au niveau des tubules rénaux : une réabsorption tubulaire préférentielle d'urée appauvrie en ^{15}N conduirait à l'excrétion d'urée enrichie en ^{15}N par rapport à l'urée corporelle filtrée. Le $\delta^{15}\text{N}$ moyen de l'urée urinaire simulé par le modèle (4,7‰) est proche du $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée urinaire mesuré expérimentalement (4,9‰). Il est, par ailleurs, inférieur à celui du régime alimentaire, ce qui permet d'assurer l'équilibre isotopique global sur le système (les autres pertes azotées ayant des $\delta^{15}\text{N}$ supérieurs à celui au régime). Ceci est en accord avec les nombreuses données de la littérature qui rapportent que l'urine totale serait appauvrie en ^{15}N par rapport au régime alimentaire (voir Tableau 13, chapitre 1). L'appauvrissement en ^{15}N de l'azote excrété dans les urines est généralement expliqué par l'existence d'un fractionnement isotopique associé aux réactions de désaminations et conduisant à la formation d'urée appauvrie en ^{15}N . Si notre modèle prédit bien que le fractionnement isotopique associé aux flux d'oxydation des AA participe à l'appauvrissement de l'urée corporelle et donc *in fine* à l'appauvrissement de l'urée urinaire, il montre également que le $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée urinaire dépend aussi de manière complexe de la proportion d'urée recyclée et potentiellement de la réabsorption tubulaire rénale.

De la même manière que pour les quantités d'N, on observe des oscillations périodiques des $\delta^{15}\text{N}$ dans les compartiments lorsque la prise alimentaire est simulée par un apport discontinu sur 24h tel que décrit précédemment. Ces oscillations sont d'amplitude variable selon les compartiments et sont notamment quasiment inexistantes dans les compartiments de P périphériques. Dans les compartiments présentant des oscillations, si les quantités d'N augmentent au cours de la phase nourrie suite à l'arrivée de l'N alimentaire, les $\delta^{15}\text{N}$ à l'inverse diminuent pendant cette phase, car l'N alimentaire est appauvri en ^{15}N par rapport à l'N endogène, et ré-augmentent ensuite pendant la phase de jeûne. Les données de $\delta^{15}\text{N}$ mesurées expérimentalement après une nuit de jeûne correspondent donc aux valeurs maximales

de $\delta^{15}\text{N}$ simulées. L'amplitude des oscillations simulées par le modèle est non négligeable dans les compartiments d'AA, en particulier splanchniques (où les variations simulées sont de l'ordre de 10 à 15% de la valeur moyenne), ainsi que dans le compartiment d'urée corporelle (avec des variations simulées de l'ordre de 30% de la valeur moyenne). Les variations simulées des $\delta^{15}\text{N}$ des AA tissulaires et de l'urée corporelle en fonction de l'état nutritionnel pourraient en partie expliquer que nous observons une plus grande variabilité inter-individuelle dans ces compartiments que dans les compartiments de P.

L'ensemble de ces résultats montre la vraisemblance physiologique du modèle développé. Concernant les flux d'échanges d'N, les prédictions du modèle sont cohérentes avec les données de la littérature, tout en apportant de nouvelles informations sur le fonctionnement intégré du métabolisme azoté qui reste largement méconnu du fait de la nature parcellaire des informations fournies par les méthodes classiques d'exploration. Le comportement global du système prédit par le modèle semble néanmoins cohérent avec nos connaissances générales sur le fonctionnement du système. Le modèle permet également de rendre compte de manière satisfaisante des différentes valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement, grâce au paramétrage des facteurs de fractionnement ε par des valeurs qui semblent cohérentes avec les rares données disponibles et qui apportent de nouvelles informations sur les processus métaboliques impliqués dans la génération du fractionnement isotopique.

II. Utilisation du modèle pour étudier les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans des situations nutritionnelles et physio-pathologiques particulières.

À partir du paramétrage établi dans la partie précédente, nous avons procédé à l'analyse de sensibilité du modèle, afin d'étudier l'effet de modulations de certains flux sur les $\delta^{15}\text{N}$, en dynamique et à l'équilibre isotopique, c.-à-d. à partir du moment où la modulation a lieu et jusqu'à ce que soit atteint le nouvel équilibre isotopique. Les paramètres de fractionnement ε définis précédemment ont été supposés fixes et seuls les flux d'N ont été modifiés (par la modification des paramètres de taux de transfert k). Les objectifs de cette analyse de sensibilité sont multiples et visent à :

- mieux comprendre quels facteurs et perturbations sont les plus susceptibles d'affecter les $\delta^{15}\text{N}$, avec quelle amplitude et dans quel sens. Les conclusions en ce sens seront signalées ensuite par le signe « \Rightarrow »;
- proposer des pistes d'explication quant aux différences de $\delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement lors de modification de la source protéique (ÉTUDE 1) ou lors du développement d'un syndrome métabolique associant insulino-résistance et obésité (ÉTUDE 2). Les conclusions en ce sens seront signalées par le signe « * »;
- étudier la capacité du modèle à prédire des variations de $\delta^{15}\text{N}$ en réponse à des modulations du métabolisme protéique dans des situations particulières, impliquant par exemple des modifications du niveau ou de la qualité de l'apport protéique alimentaire, et vérifier par une démarche de validation externe l'adéquation des prédictions du modèle avec les rares données

correspondantes disponibles dans la littérature. Les conclusions en ce sens seront signalées par le signe « \diamond ».

Le principe général de cette analyse de sensibilité consiste à modifier la valeur de certains paramètres de transfert k tout en gardant les paramètres de fractionnement ε fixes. Initialement (c.-à-d. à $t=0$, avant la modification des paramètres k), le système est à l'état stationnaire (c.-à-d. que ses tailles et flux d'N sont constants) et à l'équilibre isotopique (c.-à-d. que les $\delta^{15}\text{N}$ sont constants), selon le paramétrage défini dans la partie précédente. L'apport alimentaire est désormais simulé de manière équi-distribué sur 24h, c'est-à-dire par un flux moyen constant, sans reproduire l'alternance des phases postprandiale et postabsorptive de 12h décrite précédemment. La prise en compte de la discontinuité de l'apport alimentaire n'est en effet pas requise dans cette partie, puisqu'on s'intéresse ici aux effets à moyen et long-termes des variations des flux d'N, et ceci compliquerait au contraire les simulations et leur interprétation. La modification à $t=0$ de la valeur de certains paramètres k induit des variations des flux, des quantités d'N dans les compartiments et des $\delta^{15}\text{N}$, qui évoluent en dynamique jusqu'à l'établissement, dans la majorité des cas, d'un nouvel état stationnaire et d'un nouvel équilibre isotopique. On peut donc distinguer les effets temporaires de modulations des flux sur les cinétiques d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$ de leurs effets à terme sur les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ au nouvel équilibre isotopique, lorsqu'il existe. Il faut également noter qu'une modulation d'un flux peut être directe, c'est-à-dire induite par la modification du paramètre k associé, ou indirecte, c'est-à-dire induite secondairement par la variation de la quantité d'azote dans le compartiment source en réponse à la variation d'autres flux du modèle.

II.1. Effets de variations des cinétiques protéiques (synthèse et/ou dégradation protéique) sur les $\delta^{15}\text{N}$

Nous avons, dans un premier temps, étudié l'effet de variations des flux de synthèse (SP) et de dégradation (DP) protéiques tissulaires sur les $\delta^{15}\text{N}$ des fractions AA et P des tissus. Ces variations ont été étudiées sur un tissu périphérique type, le muscle, mais les conclusions déduites sont valables pour tous les tissus, étant donné que tous les tissus présentent la même compartimentation et les mêmes échanges entre AA et P. Les notations utilisées dans cette partie sont explicitées dans la figure 64.

II.1.i. Modulation des cinétiques protéiques tissulaires sans variation de la taille du pool

Le FSR d'un tissu peut varier sans induire de modification de la taille protéique du tissu si les flux de SP et de DP varient concomitamment et avec la même amplitude. Ainsi une augmentation similaire des capacités de synthèse (k_s) et de dégradation (k_d) induit une augmentation similaire des flux de synthèse (f_s) et de dégradation (f_d) protéiques. f_s et f_d restant égaux, la masse protéique n'est pas modifiée ($dT_p/dt = f_{sT} - f_{dT} = 0$), alors que le FSR est augmenté de la même proportion que k_s et k_d . Dans ce cas, les $\delta^{15}\text{N}$ dans les compartiments d'AA et de P ne varient pas (comme on peut le voir sur la Figure 67, dans le cas où k_s et k_d ont été augmentés chacun de 20%).

II.1.ii. Modulation des cinétiques protéiques tissulaire avec variation de la taille du pool

Des variations de la taille du compartiment protéique sont observées lorsque les flux de synthèse et de dégradation diffèrent : $dT_p/dt = f_{sT} - f_{dT} \neq 0$.

Cas d'un état anabolique :

Un état anabolique (augmentation de la masse protéique) est caractérisé par une synthèse protéique supérieure à la dégradation ($f_{sT} > f_{dT}$). Dans le modèle, une augmentation de la valeur du paramètre k_s d'un tissu (sans variation du paramètre k_d) induit une augmentation du flux de synthèse associé et une augmentation parallèle de la taille du compartiment protéique de ce tissu. Un nouvel état stationnaire est atteint lorsque le flux de dégradation protéique, qui augmente secondairement en conséquence de l'augmentation de la taille du pool protéique, finit par égaler le flux de synthèse.

Les $\delta^{15}\text{N}$ des AA et P ne sont pas modifiés au nouvel état stationnaire, mais sont temporairement diminués entre les deux états stationnaires pendant l'intervalle de temps où le flux de synthèse est supérieur au flux de dégradation, c'est-à-dire pendant la phase de croissance du pool protéique (Figure 67). Cependant les variations de $\delta^{15}\text{N}$ observées en cinétique sont très faibles. Dans le muscle par exemple, une augmentation de 20% du paramètre k_s induit une augmentation de 20% de la taille du pool protéique associée à une diminution maximale de seulement 0,09 % de l'enrichissement de la fraction P (Figure 67, cas où k_{sM} est augmenté de 20%). La diminution temporaire des $\delta^{15}\text{N}$ dans les compartiments d'AA et de P du muscle induit par répercussion une diminution temporaire des $\delta^{15}\text{N}$ dans chacun des compartiments du système, avec une amplitude similaire ou inférieure selon les compartiments.

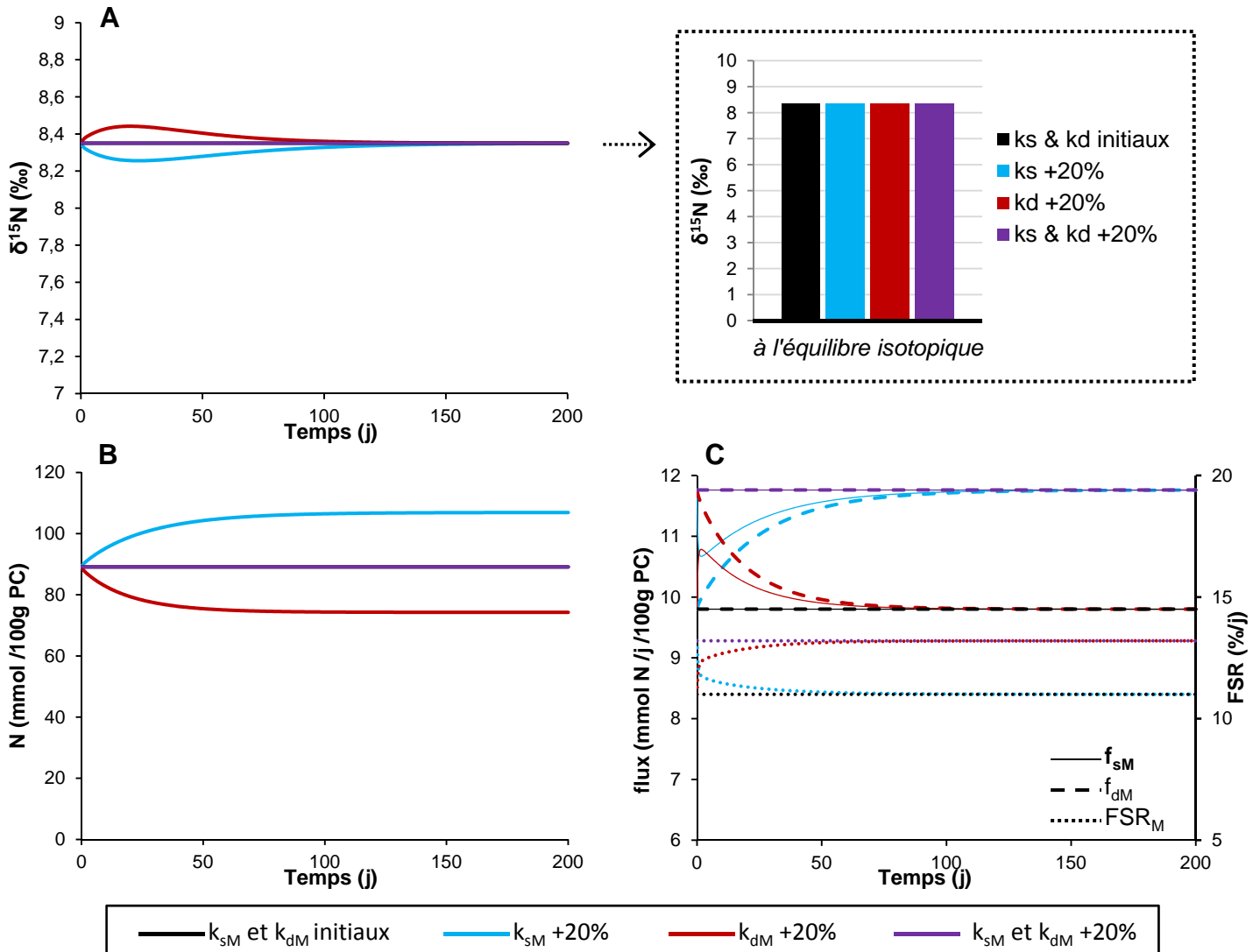
Cas d'un état catabolique :

A l'inverse, un état catabolique (perte de masse protéique) est caractérisé par un flux de dégradation supérieur au flux de synthèse. Cet état peut être simulé par une augmentation de la valeur du paramètre k_d , qui induit une augmentation temporaire du flux de dégradation associé et une diminution de la taille du compartiment protéique jusqu'à l'atteinte d'un nouvel état stationnaire où les flux de synthèse et de dégradation sont égaux et identiques à leur valeur initiale. De même que dans le cas précédent, les $\delta^{15}\text{N}$ des AA et P sont identiques à l'état stationnaire initial et au nouvel état stationnaire, mais sont temporairement augmentés pendant la phase de perte de masse protéique (alors qu'ils étaient temporairement diminués pendant une phase de gain protéique) (Figure 67). Dans le muscle, une augmentation de 20% du paramètre k_{dM} induit une diminution d'environ 17% de la taille du pool protéique avec une augmentation maximale de 0,09% de l'enrichissement dans la fraction P musculaire (Figure 67, cas où k_{dM} est augmenté de 20%). Les $\delta^{15}\text{N}$ des autres compartiments du système sont également temporairement augmentés.

Il est à noter qu'une diminution du paramètre k_s induit exactement les mêmes variations de taille, de flux et de $\delta^{15}\text{N}$ qu'une augmentation du paramètre k_d .

La seule exception à cette règle générale de l'absence d'impact de modulations des cinétiques protéiques sur les $\delta^{15}\text{N}$ à l'équilibre isotopique concerne les P plasmatiques : une augmentation (ou une

Figure 67 : Simulations des évolutions du $\delta^{15}\text{N}$ (A), de la taille (B), des flux et du renouvellement (C) du compartiment protéique musculaire en réponse à des modifications de ses taux de synthèse et dégradation.



L'enrichissement isotopique ($\delta^{15}\text{N}$, panneau A), la taille (N, panneau B) les flux de synthèse et de dégradation (f_s et f_d , panel C) et le renouvellement (FSR, panneau C) du compartiment protéique musculaire (M_p) ont été simulés avec une augmentation de 20% du taux de synthèse protéique musculaire ($k_{sM} + 20\%$) ou du taux de dégradation protéique musculaire ($k_{dM} + 20\%$) ou de ces deux taux (k_{sM} et $k_{dM} + 20\%$).

f_{sM} , flux de synthèse protéique musculaire (en trait plein); f_{dM} , flux de dégradation protéique musculaire (en tirets gras); FSR_M , taux de renouvellement protéique musculaire (en trait pointillé).

diminution) du flux de synthèse de P hépatiques exportées (avec ou sans modification du flux de dégradation, c.-à-d. de la taille du compartiment de P plasmatiques) induit une diminution (ou une augmentation, resp.) légère des $\delta^{15}\text{N}$ des AA et P hépatiques constitutives et exportées, qui contrairement aux autres tissus, persiste au nouvel état stationnaire. Cette exception est liée au fait que les AA précurseurs des P plasmatiques et les AA issus de leur dégradation constituent des pools distincts.

⇒ En conclusion, ces simulations montrent que des variations des flux de synthèse et dégradation protéiques n'affectent pas les $\delta^{15}\text{N}$ une fois atteint le nouvel équilibre isotopique. L'absence de différence de $\delta^{15}\text{N}$ au nouvel état stationnaire par rapport à l'état initial s'explique par le fait que dans un système où deux compartiments sont liés par des échanges réversibles, lorsque les flux d'échange entre ces deux compartiments sont égaux (c.-à-d. le système est à l'état stationnaire), les $\delta^{15}\text{N}$ des compartiments sont indépendants de la valeur des flux mais dépendent uniquement des effets isotopiques associés aux voies d'échange (voir fiche technique n°1). Les $\delta^{15}\text{N}$ des fractions P et AA varient cependant de façon temporaire pendant les phases de croissance ou de diminution du pool P lorsque les flux de synthèse et de dégradation protéiques sont différents : les $\delta^{15}\text{N}$ diminuent lors d'un état anabolique ($f_{sT} > f_{dT}$) et augmentent lors d'un état catabolique ($f_{dT} > f_{sT}$). Les variations des $\delta^{15}\text{N}$ observées en cinétique sont faibles ($\approx 0.1\%$) et sont donc difficilement détectables expérimentalement, d'autant plus qu'elles ont lieu pendant un intervalle de temps limité. De plus, le fait que l'on observe exactement les mêmes variations pour une diminution du paramètre k_s que pour une augmentation du paramètre k_d montre que les $\delta^{15}\text{N}$ ne permettent pas de distinguer si la diminution de la masse protéique est due à une diminution de la capacité de synthèse ou à une augmentation de la protéolyse.

* En termes de piste d'explication des variations de $\delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement, on peut déduire de ces simulations que ce ne sont pas des variations des cinétiques protéiques qui peuvent expliquer les variations de $\delta^{15}\text{N}$ observées lors de l'initiation du syndrome métabolique (ÉTUDE 2). En effet, chez les rats développant une IR et une obésité, les $\delta^{15}\text{N}$ sont plus élevés dans les P du foie et de l'intestin et sont plus faibles dans les P du cœur par rapport aux rats témoins restés minces et insulino-sensibles, sans qu'on puisse corrélérer ces augmentations ou diminutions de $\delta^{15}\text{N}$ à des diminutions ou augmentations respectives du contenu en P de ces tissus (exprimés relativement à la masse corporelle, de la même manière que les tailles N_p dans le modèle), puisque celui-ci n'est pas différent. Dans le muscle *Tibialis anterior*, on observe une diminution conjointe du contenu en P et du $\delta^{15}\text{N}$, ce qui n'est pas non plus cohérent avec l'évolution inverse des tailles et $\delta^{15}\text{N}$ prédite par le modèle.

II.2. Effets des modulations des flux d'échanges d'AA entre plasma et tissus périphériques

Après nous être intéressés aux effets de modulations des flux intra-organes d'AA (flux f_s et f_d , cf. partie précédente), nous avons cherché à étudier les effets de modulations des flux d'échanges inter-organes d'AA sur les $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires, c'est-à-dire l'effet de variations des flux de transfert des AA

plasmatisques vers les AA tissulaires (f_{inT}) et des flux réciproques (f_{outT}). Physiologiquement, ce type de modulations peut survenir dans le cas d'une modification du flux sanguin et du recrutement de capillaires (correspondant à une altération de la fonction endothéliale) et/ou d'une modification de l'activité des transporteurs d'AA au niveau tissulaire (Fujita *et al.* 2006; Hyde *et al.* 2002; Gu *et al.* 2005). Ces modulations de flux ont été simulées tout en maintenant constantes les tailles des compartiments tissulaires et du compartiment d'AA plasmatisques. Dans le modèle, une diminution des flux d'échanges entre le compartiment d'AA plasmatisques et un compartiment d'AA tissulaires a été simulée par une diminution du paramètre k_{in} du tissu et une diminution parallèle du paramètre k_{outT} , qui induisent respectivement une diminution des flux f_{inT} et f_{outT} associés. La diminution du paramètre k_{outT} est déterminée de manière à ce que la diminution du flux f_{outT} induite compense la diminution du flux f_{inT} , afin de maintenir l'état stationnaire sur les tailles des compartiments d'AA tissulaires et plasmatisques. Le maintien de l'état stationnaire a pour intérêt d'éviter une variation indirecte des flux de synthèse et d'oxydation qui serait induite par une variation de la taille du compartiment d'AA tissulaires.

II.2.i. Effets tissulaires isolés

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet d'une diminution des flux f_{in} et f_{out} d'un seul tissu. Les variations des $\delta^{15}N$ induites par ces modulations sont différentes selon le tissu affecté :

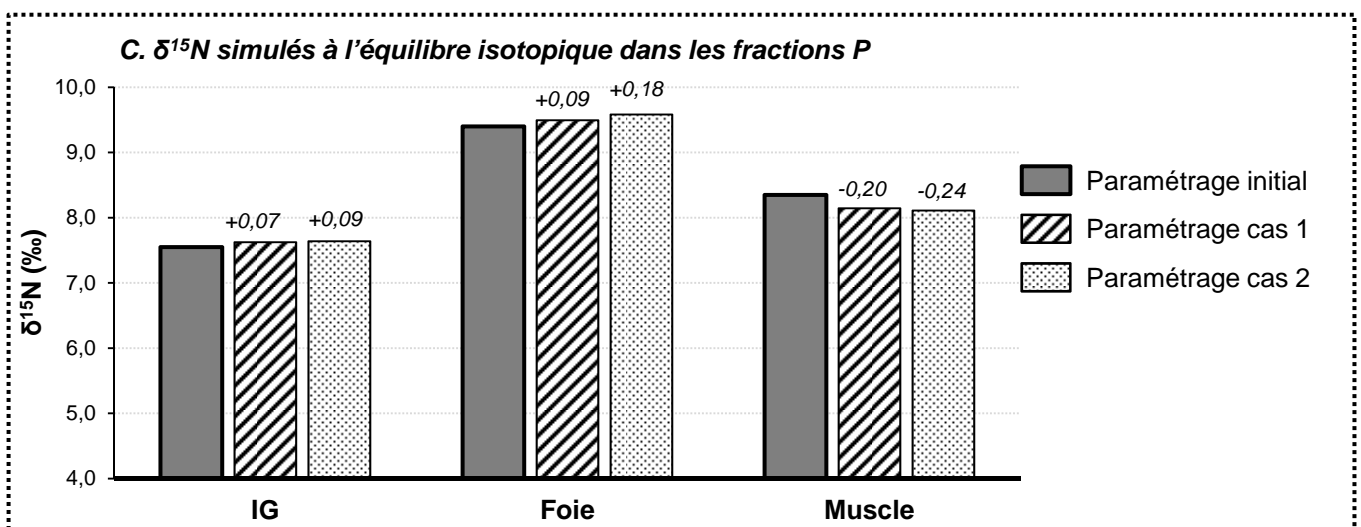
- Une diminution des flux d'échanges entre les AA plasmatisques et les AA hépatiques ou intestinaux n'entraîne pas de variation des $\delta^{15}N$.
- Une diminution de 20% du flux f_{in} du muscle induit une diminution du $\delta^{15}N$ dans le muscle de -0,2‰ au nouvel équilibre isotopique. Par répercussion, les $\delta^{15}N$ sont légèrement augmentés dans les autres tissus : l'augmentation prédite est de +0,15‰ dans les tissus périphériques et les AA plasmatisques, de +0,09‰ dans le foie et les P plasmatisques et de +0,07‰ dans l'intestin. Les variations des $\delta^{15}N$ sont identiques dans les fractions AA et P pour chaque tissu, à l'exception du plasma (Figure 68, cas 1).
- À l'inverse, concernant les autres tissus périphériques, une diminution des flux f_{in} et f_{out} dans un de ces tissus induit une augmentation du $\delta^{15}N$ dans ce tissu au nouvel équilibre isotopique, et une diminution des $\delta^{15}N$ dans les autres tissus dont les flux ne sont pas modifiés.

⇒ De manière générale, on constate que, pour un tissu, le sens de variation de $\delta^{15}N$ en réponse à une diminution des flux f_{in} et f_{out} dépend du signe de la différence de $\delta^{15}N$ entre le pool d'AA de ce tissu et les AA plasmatisques ($\delta T_{AA} - \delta P_{AA}$) : si le $\delta^{15}N$ des AA du tissu est inférieur au $\delta^{15}N$ des AA plasmatisques (comme pour le muscle), une diminution des flux d'échanges entre le plasma et ce tissu induit une diminution de $\delta^{15}N$ dans le tissu, et vice versa. L'amplitude de la variation du $\delta^{15}N$ dans le tissu affecté dépend de l'amplitude de cette différence. De plus, la variation de $\delta^{15}N$ dans le tissu affecté induit secondairement une variation inverse des $\delta^{15}N$ dans les tissus dont les flux sont inchangés. L'impact d'une modulation des flux f_{in} et f_{out} d'un tissu sur les $\delta^{15}N$ des autres tissus dépend de l'importance quantitative des flux du tissu affecté, une modification des flux d'échanges entre le plasma et le muscle entraînant par exemple une variation plus importante des $\delta^{15}N$ des autres tissus qu'une modification des flux d'échanges entre le cœur et le plasma.

Figure 68 : Simulations des $\delta^{15}\text{N}$ des compartiments protéiques musculaire, hépatique et intestinal en réponse à des modifications des taux de transfert d'AA.

A. Paramètres du modèle modifiés						
	cas 1			cas 2		
	IG	Foie	Muscle	IG	Foie	Muscle
	<i>% variation par rapport au paramétrage initial</i>					
k_{in}	0%	0%	-20%	-50%	-50%	-20%
k_{out}^1	0%	0%	-28%	-26%	-37%	-28%

B. Variations associées des tailles des compartiments et des flux						
	cas 1			cas 2		
	IG	Foie	Muscle	IG	Foie	Muscle
	<i>% variation par rapport aux valeurs simulées à partir du paramétrage initial</i>					
f_{in}	0%	0%	-20%	-50%	-50%	-20%
f_{out}^2	0%	0%	-28%	-26%	-37%	-28%
Bilan net ³	0%	0%	0%	0%	0%	0%
TI	0%	0%	-20%	-50%	-50%	-20%



L'enrichissement isotopique ($\delta^{15}\text{N}$) des fractions protéiques (C) et les flux de transfert d'AA entre les compartiments d'AA intra-tissulaires et les pools d'AA plasmatiques (f_{inT} et f_{outT} , B) ont été simulés après une diminution des taux de transfert k_{in} et k_{out} du muscle uniquement (cas 1) ou après une diminution des taux de transfert k_{in} et k_{out} du muscle, du foie et de l'intestin (cas 2). Les modifications des paramètres appliquées dans les différents cas sont présentées dans le tableau A. Les tailles des compartiments ne sont pas modifiées.

¹ k_{pV} pour l'intestin; ² f_{pV} pour l'intestin; le bilan net est calculé selon la relation ($f_{inM} - f_{outM}$) pour le muscle, ($f_{inSI} - f_{pV}$) pour l'intestin et ($f_{inL} + f_{pV} - f_{outL}$) pour le foie. AA, acides aminés libres; P, protéines; IG, muqueuse intestinale; TI, Index de Transport intra-tissulaire; f_{in} , flux de transport d'AA du plasma vers le pool d'AA libres tissulaires; k_{in} , taux de transfert associé au flux f_{in} ; f_{out} , flux de transport d'AA libres du tissu vers le plasma, k_{out} , taux de transfert associé au flux f_{out} .

II.2.ii. Effets combinés sur plusieurs tissus :

Une diminution conjointe des flux f_{in} et f_{out} du foie, de l'intestin et du muscle (de respectivement 50%, 50% et 20%), résulte en une augmentation des $\delta^{15}N$ dans le foie et l'intestin (de 0,18‰ et 0,09‰, respectivement), une diminution du $\delta^{15}N$ dans le muscle (de -0,24‰), et à l'inverse une augmentation des $\delta^{15}N$ dans les autres tissus périphériques (de 0,12‰ ; Figure 68, cas 2). Ces variations simulées sont similaires à celles mises en évidence lors de l'initiation d'un syndrome métabolique chez des rats devenus obèses et IR (ÉTUDE 2), où nous avons observé une augmentation de 0,1 à 0,2‰ des $\delta^{15}N$ dans les P du foie et de l'intestin et une diminution de 0,2‰ du $\delta^{15}N$ dans les P du muscle.

* Ces simulations suggèrent que des diminutions des flux d'échanges entre le plasma et les AA intratissulaires dans le foie, l'intestin et le muscle sont susceptibles d'expliquer en partie les variations de $\delta^{15}N$ observées lors de l'initiation d'un syndrome métabolique (ÉTUDE 2). On pourrait ainsi envisager que, dans une situation d'IR associée à une obésité, les flux d'alimentation en AA circulants des tissus splanchniques et de certains tissus périphériques comme le muscle soient diminués : cette hypothèse est cohérente avec le fait que l'action de l'insuline sur le recrutement de capillaires et/ou l'augmentation du flux sanguin total dans le muscle est altérée chez des individus obèses et IR (Rattigan *et al.* 2007; Keske *et al.* 2009; Kubota *et al.* 2011; Baron *et al.* 1991).

II.3. Effets de modulations nutritionnelles modérées des flux d'oxydation sans altération du bilan azoté

Dans cette troisième partie, nous avons cherché à analyser l'effet de modulations des flux d'oxydation des AA tissulaires (f_{oxT}) sur les $\delta^{15}N$, dans des situations où les tailles des tissus et le bilan azoté ne varient pas. L'objectif était de reproduire des variations légères de conditions nutritionnelles n'affectant pas le bilan azoté de l'organisme mais à la suite desquelles le catabolisme des AA est modulé, telles qu'une modification de la qualité de la source protéique ou une augmentation de l'apport protéique (Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2005; Fouillet *et al.* 2002b; Bos *et al.* 2003; Lecavalier *et al.* 1991). En pratique, les paramètres k_{oxT} du modèle ont été modifiés en premier lieu, puis d'autres paramètres du modèle ont été remaniés en conséquence, afin d'assurer le maintien de l'état stationnaire sur les quantités d'N dans les différents compartiments.

II.3.i. Modulations des flux d'oxydation en réponse à une modification de la qualité protéique

Plusieurs études ont mis en évidence qu'une altération de la qualité de la source protéique induisait une augmentation du catabolisme oxydatif, principalement au niveau splanchnique (Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2005; Fouillet *et al.* 2008). Afin de simuler une situation où la qualité de la protéine alimentaire est diminuée (c.-à-d. mimer ce qui se passe lorsque les protéines de lait, qui constituent la source protéique dans les conditions initiales du modèle et qui sont de très bonne qualité, sont remplacées par une protéine de moins bonne qualité), nous avons donc augmenté les flux d'oxydation au niveau splanchnique et/ou périphérique. Dans le modèle, une augmentation des paramètres d'oxydation k_{oxT} sans modification des autres paramètres entraîne une diminution des tailles des

compartiments d'AA et P tissulaires. En effet, une augmentation des flux d'oxydation tissulaires engendre une augmentation de la production totale d'urée et de l'excrétion urinaire et donc un bilan N global négatif. Par conséquent, pour maintenir l'état stationnaire, nous avons été amenés à compenser l'augmentation de l'oxydation, ce qui a été fait de 2 manières différentes : soit par une augmentation du recyclage entéro-hépatique (cas 1), soit par une diminution du transfert d'AA de la zone splanchnique vers la zone périphérique avec une diminution de l'ensemble des flux périphériques (cas 2). Le cas 3 est un cas intermédiaire qui combine les modes de compensation des cas 1 et 2.

Cas 1 : augmentation de l'oxydation splanchnique compensée par une augmentation du recyclage entéro-hépatique de l'urée

Dans ce 1^{er} scénario, nous avons simulé une augmentation des flux d'oxydation (et par conséquent de la production d'urée), associée à une augmentation compensatoire du recyclage entéro-hépatique de l'urée, afin de maintenir un bilan azoté nul. L'augmentation de l'oxydation des AA sans modification de leur utilisation anabolique (c.-à-d., avec des flux de protéosynthèses et des FSR inchangés) permet de rendre compte d'une diminution de l'efficacité d'utilisation anabolique de la source protéique, c'est-à-dire une augmentation de la proportion d'AA oxydés par rapport aux AA utilisés pour les synthèses protéiques (pOx) dans les tissus. Ce scénario peut correspondre aux modulations induites par l'ingestion d'une protéine alimentaire de qualité légèrement inférieure mais néanmoins parfaitement adéquate, telle que l'ingestion de protéines de soja vs lait (Fouillet *et al.* 2008).

Nous avons tout d'abord testé les effets d'une augmentation uniquement splanchnique de la production d'urée. Dans le modèle, les taux de transfert k_{ox} associés aux flux d'oxydation ont ainsi été augmentés dans la muqueuse intestinale et le foie. Cette augmentation induit une augmentation des flux d'oxydation splanchniques et par conséquent une augmentation de la production totale d'urée. Afin de maintenir un bilan d'N nul, la quantité supplémentaire d'urée produite n'est pas excrétée (la quantité d'urée excrétée étant ainsi maintenue constante) mais entièrement recyclée (c.-à-d. hydrolysée et réabsorbée au niveau colique). En pratique, l'augmentation du recyclage de l'urée est simulée par une augmentation des paramètres k_{UH} (taux de transfert associé au flux d'azote du compartiment d'urée corporelle vers la lumière caeco-colique) et k_{absCC} (taux de transfert associé au flux de réabsorption d'azote depuis la lumière caeco-colique vers le compartiment d'AA hépatiques) du modèle. Ainsi, une augmentation de 45% des flux d'oxydation intestinaux et hépatiques (correspondant à une augmentation du pOx initial, qui passe de 42% à 60%) accompagnée d'une augmentation de 60% de la proportion d'urée produite recyclée (correspondant à une augmentation de f_{UH}/f_{UP} , qui passe de 18% à 29%) se traduit par des $\delta^{15}N$ augmentés dans tous les compartiments tissulaires une fois le nouvel équilibre isotopique atteint (**Figure 69**, cas 1). Cette augmentation est importante et identique dans tous les tissus (+0,4‰), sauf dans la muqueuse intestinale où elle est légèrement moindre (+0,3‰). Les variations des $\delta^{15}N$ sont également identiques dans les fractions AA et P pour chaque tissu.

Nous avons également testé un scénario analogue mais selon lequel les flux d'oxydation de tous les tissus ont été augmentés de la même proportion. Contrairement au cas précédent, une augmentation

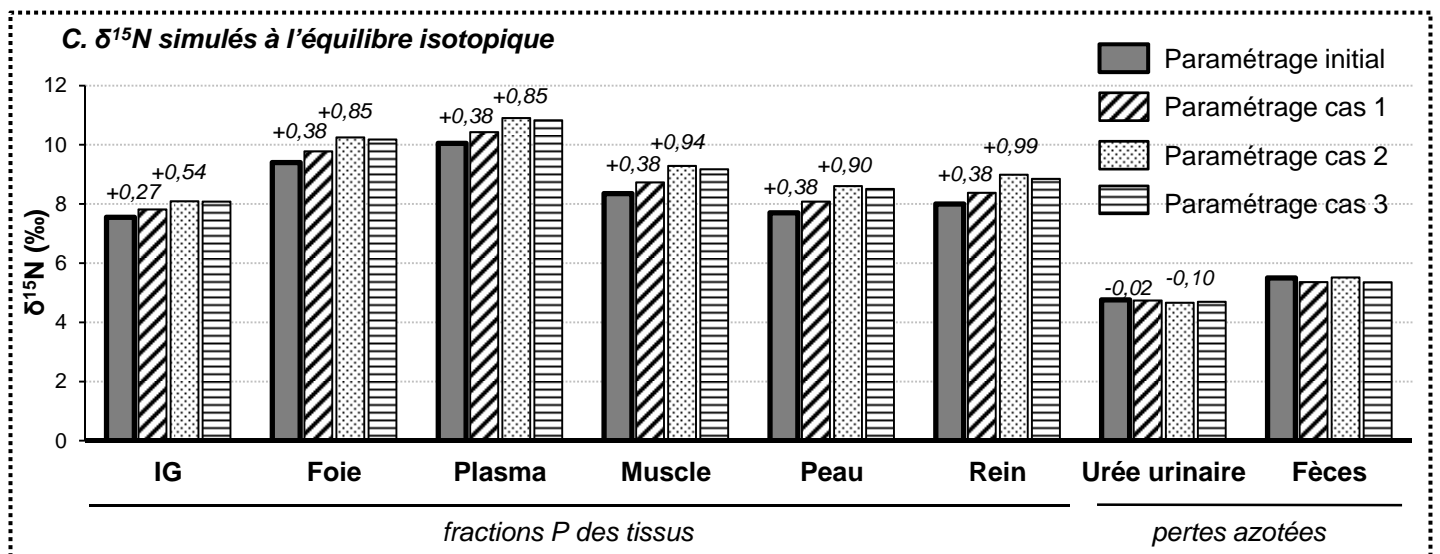
Figure 69 : Simulations des flux métaboliques et des $\delta^{15}\text{N}$ lors d'une variation de la qualité protéique

A. Paramètres du modèle modifiés

	cas 1	cas 2	cas 3
	<i>% variation par rapport au paramétrage initial</i>		
$k_{\text{ox Spl.}}$	45%	45%	69%
k_{outL}	0%	-6%	-3%
$k_{\text{in Periph.}}$	0%	-23%	-13%
k_{UH}	85%	0%	85%
k_{absCC}	66%	0%	66%

B. Variations majeures prédites sur les flux et grandeurs d'intérêt

	cas 1		cas 2		cas 3	
	tissus splanchniques	tissus périphériques	tissus splanchniques	tissus périphériques	tissus splanchniques	tissus périphériques
	<i>% variation par rapport aux valeurs simulées à partir du paramétrage initial</i>					
f_{ox}	45%	0%	45%	-23%	69%	-13%
f_{s}	0%	0%	0%	-23%	0%	-13%
FSR	0%	0%	0%	-23%	0%	-13%
pOx^1	45%	0%	45%	0%	69%	0%
f_{in}	0%	0%	0%	-23%	0%	-13%
f_{UH}	85%		0%		85%	
$f_{\text{UH}}/f_{\text{UP}}^2$	60%		0%		60%	



Les flux métaboliques et grandeurs associés (B) et les enrichissements isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) (C) ont été simulés après une augmentation des taux de transfert associés aux flux d'oxydation dans les tissus splanchniques ($k_{\text{ox Spl.}}$) accompagnée (cas 1) d'une augmentation des taux de transfert associés au recyclage entéro-hépatique de l'urée (k_{absCC} et k_{UH}) ou (cas 2) d'une diminution des taux de transfert d'AA entre les zones splanchniques et périphériques (k_{outL} et $k_{\text{in Periph.}}$) ou (cas 3) de l'ensemble de ces variations. Les modifications des paramètres appliquées dans les différents cas sont présentées dans le tableau A. Dans les trois cas, le système est à l'état stationnaire, i.e. les tailles des compartiments ne sont pas modifiées.

Les valeurs des variations extrêmes (cas 1&2) des $\delta^{15}\text{N}$ sont spécifiées au dessus des histogrammes.

¹pOx = $f_{\text{ox}}/f_{\text{s}}$; ² $f_{\text{UH}}/f_{\text{UP}}$ représente la quantité d'urée produite qui est transférée vers la lumière caeco-colique et hydrolysée. AA, acides aminés libres; P, protéines; IG, muqueuse intestinale; f_{ox} , flux de d'oxydation des AA libres tissulaires; $k_{\text{ox Spl.}}$, taux de transfert associé au flux f_{ox} dans les tissus splanchniques (foie et IG); f_{in} , flux de transport d'AA du plasma vers le pool d'AA libres tissulaires; $k_{\text{in Periph.}}$, taux de transfert associé au flux f_{in} des tissus périphériques; k_{outL} , taux de transfert associé au flux de transport d'AA libres du foie vers le plasma; f_{s} , flux de synthèse protéique; f_{UH} , flux de transfert d'urée vers la lumière caeco-colique; f_{UP} , production totale d'urée.

de 45% de tous les flux d'oxydation tissulaires se traduit par une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ dans la majorité des tissus (de -0,1‰ à -0,3 ‰ dans l'intestin, le foie, le plasma, le cœur et les RBC et d'environ -0,9‰ dans le muscle), à l'exception du rein, de la peau et des poils dont les $\delta^{15}\text{N}$ augmentent de 0,1 à 0,6‰.

⇒ Globalement, une augmentation des flux d'oxydation au niveau splanchnique induit une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires, alors qu'une augmentation des flux périphériques d'oxydation tend plutôt à les diminuer.

* Par comparaison, nous avons mis en évidence une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les tissus splanchniques chez des rats consommant un régime à base de protéines de soja vs de lait (ÉTUDE 1). Ces données expérimentales, en regard des résultats de modélisation, suggèrent qu'une modification de la source protéique affecterait le catabolisme oxydatif spécifiquement dans la zone splanchnique plutôt que dans l'ensemble des tissus.

Cas 2 et 3 : augmentation de l'oxydation splanchnique pas ou seulement partiellement compensée par le recyclage de l'urée, et qui induit une diminution des flux périphériques d'AA

Dans cet autre scénario, nous avons simulé une augmentation des flux d'oxydation dans les tissus splanchniques, se traduisant par une augmentation de l'utilisation splanchnique nette des AA et une diminution de la libération des AA vers le plasma et les tissus périphériques. Dans notre simulation, la diminution de l'alimentation des tissus périphériques en AA circulants, liée à la diminution des flux de transfert entre la zone splanchnique et le pool d'AA plasmatiques (k_{outL}) et entre le pool d'AA plasmatiques et les pools d'AA tissulaires périphériques (k_{in} des tissus périphériques), se traduit par une diminution globale du métabolisme périphérique, c'est-à-dire une diminution de l'ensemble des flux périphériques (oxydation et renouvellement protéique), sans variation des tailles de compartiments.

Dans le cas 2, assez drastique, que nous avons testé, cette augmentation de la production splanchnique d'urée n'est pas du tout compensée par un meilleur recyclage entéro-hépatique. En pratique, les paramètres k_{ox} du foie et de l'intestin ont été augmentés et les paramètres k_{in} , k_{out} , k_{ox} , k_{s} , et k_{d} des tissus périphériques ont été diminués de la même proportion chacun. Dans ce cas, une augmentation de 45% des flux d'oxydation intestinaux et hépatiques (augmentation identique au cas 1), accompagnée d'une diminution d'environ 25% de l'oxydation et du FSR dans la zone périphérique, induit une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans tous les compartiments tissulaires (Figure 69, cas 2). Cette augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ est plus importante que celle obtenue dans le cas 1 (où le métabolisme périphérique n'est pas altéré) : elle est de 0,5‰ environ dans la muqueuse intestinale, de 0,85‰ dans le foie et varie entre 0,9 et 1‰ dans les tissus périphériques à l'équilibre isotopique. Par ailleurs, on observe qu'une variation de l'absorption intestinale n'induit pas de modifications supplémentaires des $\delta^{15}\text{N}$ dans les tissus.

Nous avons également testé un 3^{ème} cas, intermédiaire, dans lequel la diminution de la qualité de la source protéique est associée à une augmentation importante du catabolisme oxydatif dans la zone splanchnique, qui est compensée seulement partiellement par une augmentation du recyclage entéro-

hépatique, et qui, par conséquent, entraîne une altération légère du métabolisme périphérique. Ce scénario pourrait simuler à long terme les modulations métaboliques induites par l'ingestion d'une protéine telle que le blé (Juillet *et al.* 2008). L'augmentation d'environ 70% des flux d'oxydation splanchniques (pOx augmente de 42% à 70%) accompagnée d'une augmentation de 60% de la proportion d'urée produite recyclée (f_{UH}/f_{UP} augmente de 18% à 29%) et d'une diminution d'environ 12% du renouvellement protéique des tissus périphériques, se traduit, comme dans les cas précédents, par une augmentation des $\delta^{15}N$ dans les tissus (Figure 69, cas 3). Logiquement, cette augmentation est d'amplitude intermédiaire par rapport aux cas 1 et 2 : elle est de 0,5 ‰ dans la muqueuse intestinale, de 0,8 ‰ dans le foie et varie entre 0,8 et 0,85‰ dans les tissus périphériques.

⇒ L'augmentation du recyclage entéro-hépatique de l'urée limite l'augmentation des $\delta^{15}N$ tissulaires induite par l'augmentation des flux d'oxydation splanchniques : en effet, l'urée plasmatique étant appauvrie en ^{15}N par rapport aux tissus corporels, l'augmentation du recyclage de l'urée et la réincorporation de l'N ainsi épargné dans le foie et *in fine* dans l'ensemble des tissus contribue à appauvrir les tissus en ^{15}N et ainsi à tempérer l'augmentation de leur $\delta^{15}N$. On note également que les $\delta^{15}N$ de l'urée corporelle et des pools d'excrétion (urée urinaire et fèces) urinaire sont inchangés à l'équilibre isotopique.

* La comparaison des différents cas testés avec les résultats de l'étude 1 suggère qu'une diminution de la qualité protéique induit une augmentation des $\delta^{15}N$ dans l'ensemble des tissus par une augmentation spécifique de l'oxydation splanchnique des AA, l'ampleur de l'augmentation des $\delta^{15}N$ tissulaires dépendant du degré de la stimulation conjointe compensatoire du recyclage entéro-hépatique de l'urée produite. Cette augmentation des $\delta^{15}N$ est ainsi d'autant plus importante que la qualité de la protéine est détériorée et que l'augmentation de la production d'urée n'est pas compensée par son recyclage entéro-hépatique et s'accompagne plutôt d'une altération du métabolisme périphérique.

◇ Ces observations sont en accord avec les résultats de plusieurs études réalisées chez différentes espèces et qui ont mis en relation une augmentation des $\delta^{15}N$ dans les tissus avec une diminution de la valeur biologique ou de l'efficacité d'utilisation des protéines alimentaires (Robbins *et al.* 2005; Gaye-Siessegger *et al.* 2004a).

II.3.ii. Modulations des flux d'oxydation en réponse à une augmentation de l'apport protéique

D'après les données de la littérature, le catabolisme oxydatif est également augmenté en réponse à une augmentation de l'apport protéique, par exemple dans le cas de régimes hyper-protéiques (Forslund *et al.* 1998; Morens *et al.* 2001; Young *et al.* 2000; Masanes *et al.* 1999). Nous avons donc testé l'effet d'une augmentation des flux d'oxydation associée à une augmentation de l'apport azoté sur les $\delta^{15}N$. Contrairement aux cas précédents où l'augmentation des flux d'oxydation devait être compensée par une augmentation du recyclage entéro-hépatique ou une diminution des flux périphériques afin de maintenir un bilan azoté nul, l'augmentation de l'oxydation, dans ce cas, compense elle-même par

construction l'augmentation de l'apport azoté. Concrètement, l'apport azoté a été augmenté de 15 mmol d'N /100g PC /j (soit un apport final de 25 mmolN /100g PC /j) pour simuler l'ingestion d'un régime hyper-protéique constitué de 50% de protéines par rapport au régime initial constitué de 20% de protéines. Dans nos simulations, nous avons considéré que la totalité de l'azote supplémentaire ingéré était absorbé au niveau intestinal, oxydé dans différents tissus et finalement excrété dans les urines, ce qui se traduit par une augmentation des flux d'absorption intestinale, de production totale d'urée et d'excrétion urinaire de 15 mmolN/100g PC/j. Il est à noter que l'augmentation similaire des flux de production d'urée et d'excrétion urinaire, sans modification de la quantité d'urée hydrolysée, équivaut à une diminution relative de l'efficacité du recyclage entéro-hépatique f_{UH}/f_{UP} de 60%, ce qui semble raisonnable au vu des connaissances de la littérature (Fouillet *et al.* 2008). Plusieurs cas ont été distingués en fonction des tissus dans lesquels est réalisée la production d'urée supplémentaire.

Cas 1 : augmentation de l'oxydation dans la zone splanchnique

Dans ce 1^{er} cas, nous avons simulé une augmentation de l'oxydation des AA uniquement dans les tissus splanchniques, en augmentant les paramètres k_{ox} du foie et de l'intestin. La contribution de la zone splanchnique à l'oxydation corporelle globale est donc augmentée relativement à l'état initial. Une augmentation de la production d'urée dans les tissus splanchniques, simulée par une multiplication par 5 environ des flux d'oxydations intestinaux et hépatiques, se traduit, au nouvel équilibre isotopique, par une augmentation importante et identique des $\delta^{15}N$ dans tous les compartiments tissulaires (environ 3‰), à l'exception de l'intestin où l'augmentation du $\delta^{15}N$ est plus faible (1,2‰ ; **Figure 70**, cas 1). Cette augmentation des $\delta^{15}N$ s'explique par une perte préférentielle d'azote léger dans les tissus splanchniques, en raison de l'augmentation de leurs flux d'oxydations ayant un ϵ négatif, qui se répercute ensuite dans l'ensemble des pools tissulaires via les transferts inter-organes d'AA.

Cas 2 et 3 : augmentation de l'oxydation dans tous les tissus

Nous avons également testé les effets d'une augmentation uniforme (cas 2) ou non uniforme (cas 3) de l'oxydation dans tous les tissus. Dans le cas 2, tous les flux d'oxydation tissulaires ont été augmentés de la même proportion (150%). Les tissus contribuent ainsi de façon uniforme à l'augmentation de la production d'urée, et la contribution respective des zones splanchnique et périphérique au catabolisme global des AA est inchangée. Comparativement au cas 1, les variations des $\delta^{15}N$ induites dans ce cas 2 sont globalement plus faibles et différentes selon les tissus : à l'équilibre isotopique, le $\delta^{15}N$ est augmenté de seulement 0,2‰ dans l'intestin, de 0,5 à 0,7‰ dans le foie, le cœur, les RBC et la peau et de 2‰ dans le rein, alors qu'il est diminué de 0,8‰ dans le muscle (Figure 70, cas 2). Ces différences de variations des $\delta^{15}N$ en fonction des tissus sont liées au fait que les facteurs de fractionnement ϵ associés aux flux d'oxydation des AA diffèrent selon les tissus. En particulier, la diminution du $\delta^{15}N$ du muscle en réponse à une augmentation de son flux d'oxydation s'explique par le fait que, contrairement aux autres tissus, son ϵ d'oxydation est positif : une augmentation de l'oxydation musculaire induit donc une perte préférentielle de ^{15}N par le muscle et donc un appauvrissement en ^{15}N du pool musculaire. La diminution du $\delta^{15}N$ dans le muscle se répercute sur les $\delta^{15}N$ des autres tissus via

Figure 70 : Simulations des flux métaboliques et des $\delta^{15}\text{N}$ lors d'une augmentation de l'apport protéique.

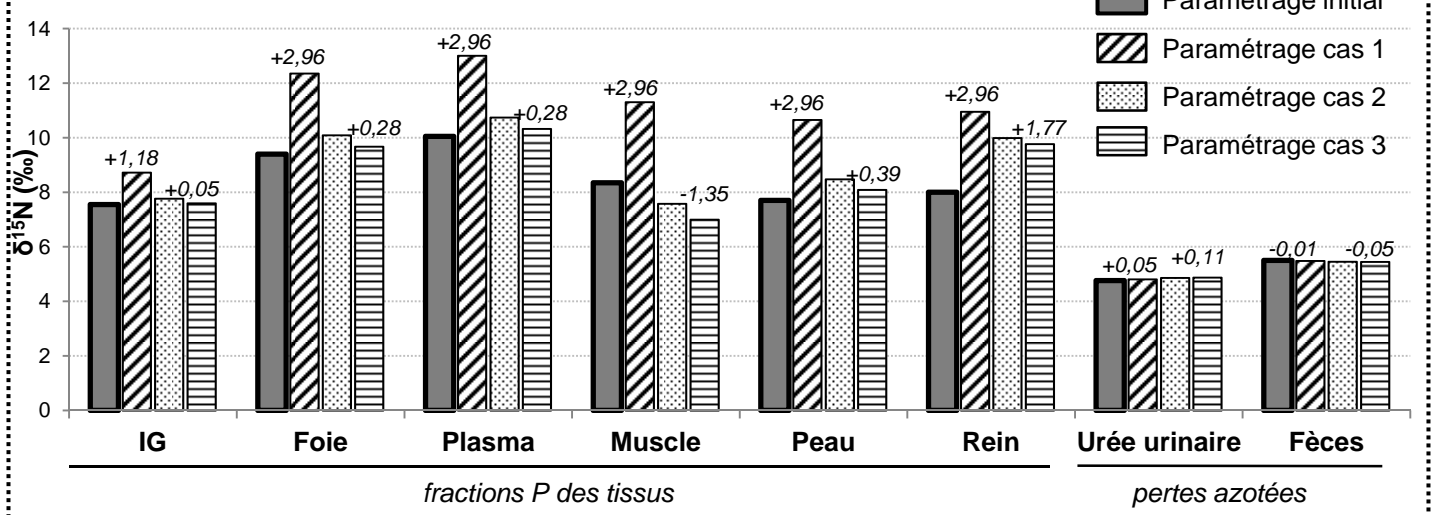
A. Paramètres du modèle modifiés

	cas 1	cas 2	cas 3
	<i>% variation par rapport au paramétrage initial</i>		
Nintake	150%	150%	150%
$k_{\text{ox Spl.}}$	440%	150%	90%
$k_{\text{ox Periph.}}$	0%	150%	180%
k_{UE}	42%	42%	42%

B. Variations majeures prédites sur les flux et grandeurs d'intérêt

	cas 1		cas 2		cas 3	
	tissus splanchniques	tissus périphériques	tissus splanchniques	tissus périphériques	tissus splanchniques	tissus périphériques
	<i>% variation par rapport aux valeurs simulées à partir du paramétrage initial</i>					
f_{ox}	440%	0%	150%	150%	90%	180%
$f_{\text{ox}}/f_{\text{oxWB}}^1$	116%	-60%	0%	0%	-24%	12%
f_{in}	0%	0%	0%	48%	0%	58%
p_{Ox^2}	440%	0%	150%	150%	90%	180%
f_{UH}	150%		150%		150%	
$f_{\text{UH}}/f_{\text{UP}}^3$	-60%		-60%		-60%	

C. $\delta^{15}\text{N}$ simulés à l'équilibre isotopique



Les flux métaboliques (B) et les enrichissements isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) (C) ont été simulés après une augmentation de l'apport protéique (Nintake) associée à une augmentation des taux de transfert associés aux flux d'oxydation dans les tissus splanchniques ($k_{\text{ox Spl}}$) uniquement (cas 1) ou une augmentation des paramètres k_{ox} de même amplitude dans les tissus splanchniques et périphériques (cas 2) ou une augmentation des paramètres k_{ox} plus importante dans les tissus périphériques que splanchniques (cas 3). Les modifications des paramètres appliquées dans les différents cas sont présentées dans le tableau A. Dans les trois cas, le système est à l'état stationnaire, i.e. les tailles des compartiments ne sont pas modifiées. Les valeurs des variations extrêmes (cas 1&3) des $\delta^{15}\text{N}$ sont spécifiées au dessus des histogrammes.

$^1f_{\text{ox}}/f_{\text{oxWB}}$ représente la contribution de l'oxydation des tissus périphériques ou splanchniques à l'oxydation corporelle totale (f_{oxWB}); $^2p_{\text{Ox}} = f_{\text{ox}}/f_{\text{s}}$; $^3f_{\text{UH}}/f_{\text{UP}}$ représente la quantité d'urée produite qui est transférée vers la lumière caeco-colique et hydrolysée. AA, acides aminés libres; P, protéines; IG, muqueuse intestinale; f_{ox} , flux d'oxydation des AA libres tissulaires; k_{oxSpl} , taux de transfert associé au flux f_{ox} dans les tissus splanchniques (foie et IG); $k_{\text{oxPériph.}}$, taux de transfert associé au flux f_{ox} dans les tissus périphériques; f_{UH} , flux de transfert d'urée vers la lumière caeco-colique; f_{UP} , production totale d'urée.

le transfert des AA musculaires vers le plasma, ce qui explique la plus faible augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les autres tissus dans ce cas 2 par rapport au cas 1. Ce phénomène est encore amplifié lorsque l'oxydation augmente dans tous les tissus mais en affectant davantage les tissus périphériques que splanchniques (Figure 70, cas 3).

Par ailleurs, dans tous les cas, les $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle et urinaire à l'équilibre isotopique sont légèrement augmentés (+0,1‰).

⇒ En conclusion, les prédictions du modèle montrent qu'une augmentation du catabolisme oxydatif en réponse à une augmentation de l'apport azoté induit une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les différents tissus, sauf dans le muscle si son propre catabolisme oxydatif est augmenté. Globalement, les $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires sont d'autant plus augmentés que les flux d'oxydation des tissus splanchniques sont augmentés. Des mesures de $\delta^{15}\text{N}$ pourraient donc permettre de distinguer la contribution relative des tissus à l'oxydation corporelle globale : une forte augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans l'ensemble des tissus signifierait une augmentation de l'oxydation dans la zone splanchnique, alors qu'une faible augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les tissus et une diminution du $\delta^{15}\text{N}$ musculaire seraient plutôt en faveur d'une contribution augmentée de l'oxydation musculaire à l'oxydation corporelle totale.

◇ Les résultats de ces simulations sont en accord avec les résultats d'une étude réalisée chez le rat mettant en évidence une augmentation progressive des $\delta^{15}\text{N}$ des P plasmatiques et jéjunales lorsque l'apport alimentaire d'N augmente au-delà des besoins (Sick *et al.* 1997). Des études chez le poisson et l'oiseau ont également mis en évidence une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les P plasmatiques ou musculaires, sans variation de la masse corporelle, lors de la consommation de régimes plus riches en P (Focken 2001; Pearson *et al.* 2003).

II.4. Effets de modulations plus drastiques des flux dans des conditions de restrictions protéiques sévères accompagnées de perte de masse protéique (non maintien du bilan d'N)

Contrairement à l'ensemble des situations modélisées précédemment, dans lesquelles les modifications opérées sur les différents flux n'affectaient pas la taille des compartiments, nous avons ici examiné des situations dans lesquelles le bilan d'N global est altéré, avec des perturbations plus importantes des flux métaboliques entraînant une variation des quantités d'N dans les compartiments. Nous avons pris l'exemple de deux conditions nutritionnelles particulières : le jeûne court et le jeûne prolongé. Dans ces deux cas, l'apport alimentaire en N est considéré nul, engendrant un bilan d'N négatif et une perte de masse protéique plus ou moins importante selon les tissus et les mécanismes d'épargne azotée mis en place.

Dans le modèle, un apport diminué ou nul entraîne une diminution des flux entrants d'N alimentaire dans le système et par conséquent une diminution de la quantité d'N dans l'ensemble des compartiments : cette diminution est particulièrement importante dans les tissus splanchniques qui sont les plus directement alimentés par l'azote exogène. Étant donné que les flux sont, par définition, proportionnels à la quantité d'N présente dans le compartiment source, une diminution de la taille des

compartiments entraîne inéluctablement une diminution des flux associés. Dans nos simulations, nous avons diversement modulé les paramètres de transfert k afin d'accentuer ou de limiter, voire d'inverser, les diminutions des flux associés. Les simulations ont été réalisées sur quelques jours uniquement (puisque un jeûne n'est pas viable indéfiniment), et le système n'est ni à l'état stationnaire ni à l'équilibre isotopique à la fin de la période de simulation. Dans ce contexte, les $\delta^{15}\text{N}$ rapportés dans les différents scénarios ne caractérisent donc pas une altération métabolique installée mais indiquent le sens d'évolution et la gamme de variation des $\delta^{15}\text{N}$ en fonction des perturbations métaboliques.

II.4.i. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans une situation de jeûne court ou de régime protéoprive

Dans un premier temps, nous avons essayé de reproduire des situations dans lesquelles une diminution de l'apport azoté se traduit par une perte de masse protéique principalement splanchnique et par la mise en place de mécanismes d'épargne azotée au niveau périphérique qui conduisent à préserver la masse protéique, en particulier musculaire. Ces conditions pourraient mimer des altérations métaboliques ayant lieu pendant la première phase d'un jeûne (phase d'épargne azotée, (Goodman *et al.* 1981; Grizard *et al.* 1995)) ou en réponse à une privation de protéines alimentaires sans déficit énergétique (régime protéoprive). Dans ces cas, les besoins en énergie sont principalement satisfaits par l'oxydation de substrats lipidiques ou glucidiques, épargnant ainsi la masse protéique corporelle. Nous avons simulé deux scénarios différents, selon lesquels l'épargne azotée est réalisée soit principalement grâce à une diminution de l'oxydation des AA au niveau périphérique (Tableau 22, cas A1), soit grâce à une augmentation du recyclage entéro-hépatique (Tableau 22, cas A2) :

- Dans le 1^{er} scénario, les flux d'oxydation dans les tissus périphériques sont fortement diminués (d'environ 85%) alors que les flux de synthèse et dégradation protéiques sont moins affectés (leur diminution étant de 3 à 30%) : l'augmentation de l'utilisation relative des AA pour les synthèses protéiques vs. l'oxydation (diminution de pOx) contribue à limiter la perte de masse protéique dans ces tissus à environ 15% de leur masse initiale. Dans le foie et l'intestin, pOx est inchangé, mais la diminution des taux de dégradation protéique (diminution d'environ 45%) permet de limiter la perte de masse protéique à 20 et 35% de leur masse initiale respectivement (Tableau 23, cas A1).

Dans ces conditions, on observe une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans tous les tissus : après 7 jours, cette augmentation varie entre 0,05 et 0,7‰ dans les P des tissus périphériques et est plus élevée dans les P hépatiques et intestinales (environ +1,6‰). Le $\delta^{15}\text{N}$ dans les pools d'urée est temporairement diminué (-0,5‰ ; **Figure 71**, cas A1).

- Dans le 2^{ème} scénario, une variation similaire des masses protéiques a été reproduite sans spécifiquement diminuer les flux d'oxydation dans les tissus périphériques mais en augmentant le recyclage entéro-hépatique de l'urée et la réutilisation de l'azote issu de son hydrolyse pour les synthèses protéiques (augmentation de f_{UH}/f_{UP} et moindre diminution de f_{absCC}) ainsi qu'en diminuant les FSR de l'ensemble des tissus (Tableau 23, cas A2). Dans ce cas, on observe également une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ de tous les tissus, avec une amplitude variable selon les tissus mais globalement plus faible que dans le premier scénario (Figure 71, cas A2).

Tableau 22 : Principaux paramètres du modèle modifiés pour simuler des situations de jeûne d'intensité variable.

	modulations type "jeûne court"		modulations type "jeûne prolongé"		
	cas A1	cas A2	cas B1	cas B2	cas B3
	<i>% variation par rapport au paramétrage initial</i>				
N_{intake}	-100%	-100%	-100%	-100%	-100%
k_{ox}					
tissus splanchniques	0%	0%	0%	0%	0%
muscle	-80%	0%	0%	500%	50%
autres tissus périphériques	-80%	0%	0%	0%	0%
k_d					
tissus splanchniques	-30%	-50%	-40%	-40%	-40%
muscle	0%	-50%	130%	0%	70%
autres tissus périphériques	0%	-50%	0%	0%	0%
$k_{out M}$	0%	0%	0%	500%	50%
k_{UH}	0%	400%	0%	0%	0%
k_{absCC}	0%	400%	0%	0%	0%

k_{ox} , taux de transfert associé au flux d'oxydation des AA libres tissulaires; k_d , taux de transfert associé au flux de dégradation protéique; k_{outM} , taux de transfert associé au flux de transfert des AA libres musculaires vers le plasma; k_{UH} , taux de transfert associé au flux d'urée vers la lumière caeco-colique; k_{absCC} , taux de transfert associé au flux d'absorption depuis la lumière caeco-colique.

II.4.ii. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans une situation de jeûne prolongé

Dans une situation de jeûne prolongé, les P corporelles sont davantage dégradées et l'oxydation des AA contribue de façon importante à la production d'énergie. Un fort catabolisme est plus particulièrement observé dans le muscle, entraînant une fonte musculaire importante (Goodman *et al.* 1981; Fryburg *et al.* 1995; Cherel *et al.* 1991). Cet état correspond à la phase ultime du jeûne, où les composés azotés ne sont plus épargnés et où la perte de masse protéique est aggravée (phase dite de fonte protéique, (Goodman *et al.* 1981; Grizard *et al.* 1995)).

Nous avons simulé une diminution accentuée de la quantité d'N dans le compartiment protéique musculaire (-50%) par une augmentation de la proportion d'AA oxydés vs. utilisés pour les synthèses protéiques (augmentation de k_{oxM}) et/ou par une augmentation du taux de dégradation protéique (augmentation k_{dM} , Tableaux 22 & 23, cas B1, B2 et B3).

Comme précédemment, les $\delta^{15}\text{N}$ sont augmentés dans tous les pools, de manière plus importante dans les tissus splanchniques (+0,95‰) que dans le muscle (+0,7‰ ; Figure 71, cas B1, B2 & B3). On observe que le $\delta^{15}\text{N}$ des P musculaires est d'autant plus augmenté que la perte de masse protéique est induite par une plus forte augmentation de la dégradation protéique plutôt que par une augmentation de l'oxydation (Figure 71, comparaison des cas B1 et B2). En effet, une augmentation de l'oxydation musculaire concourt à appauvrir le pool protéique en ^{15}N du fait de l'effet isotopique positif associé au flux d'oxydation.

◆ Ces prédictions sont en accord avec plusieurs données expérimentales mettant en évidence une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires dans des situations de stress nutritionnel ou de restriction protéique. Par exemple, chez la caille qui cesse de s'alimenter pendant sa période d'incubation, une importante augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ a été observée dans le foie (d'environ 2‰) et le muscle (d'environ 1‰) en relation avec une perte de masse importante dans ces deux tissus, de l'ordre de 60% dans le foie et de 45% dans le muscle (Hobson *et al.* 1993). Il est à noter que dans ces résultats, en accord avec nos simulations, l'augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ est moindre dans le muscle que dans le foie, dont la perte de masse est également plus importante. Une augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ dans le plasma et les cellules sanguines a également été rapportée chez le pingouin après une longue période de jeûne (Cherel *et al.* 2005). Une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ corporels est également prédite dans le cas d'un apport azoté nul par les modèles développés par Martinez del Rio & Wolf (Martinez del Rio & Wolf 2005) et Ponsard & Averbuch (Ponsard & Averbuch 1999). Ces modèles sont des modèles corps-entier dans lesquels le pool d'N corporel est représenté par un unique compartiment, et l'augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ dans ce pool corporel global est expliqué par l'excrétion préférentielle d'N léger dans les urines (du fait d'un effet isotopique négatif associé à la production d'urée) et donc à la rétention corporelle d'N enrichi en ^{15}N . Si les prédictions de ces modèles corps-entier sont en accord avec les prédictions de notre modèle, qui distingue les différents organes et fractions azotées dans l'organisme, les mécanismes responsables de l'accumulation de ^{15}N dans les tissus lors d'un jeûne ou d'un stress nutritionnel tels que prédits par notre modèle sont différents de ceux invoqués par les autres

Tableau 23 : Variations majeures des flux, grandeurs d'intérêt et tailles des compartiments prédites par le modèle lors de la simulation d'un jeûne d'intensité variable.

	modulations type "jeûne court"		modulations type "jeûne prolongé"		
	cas A1	cas A2	cas B1	cas B2	cas B3
<i>% variation par rapport aux valeurs simulées à partir du paramétrage initial</i>					
flux de synthèse (fs)					
tissus splanchniques [†]	-50%	-65%	-66%	-68%	-67%
muscle	-33%	-65%	-19%	-87%	-48%
autres tissus périphériques*	-20%	-63%	-35%	-36%	-36%
flux de dégradation (fd)					
tissus splanchniques	-46%	-62%	-62%	-63%	-62%
muscle	-14%	-53%	22%	-44%	-5%
autres tissus périphériques	-14%	-56%	-22%	-22%	-23%
taux de renouvellement protéique (FSR)					
tissus splanchniques	-33%	-54%	-46%	-46%	-46%
muscle	-22%	-63%	52%	-77%	-6%
autres tissus périphériques	-10%	-60%	-20%	-20%	-20%
flux d'oxydation (fox)					
tissus splanchniques	-50%	-65%	-66%	-68%	-67%
muscle	-87%	-65%	-19%	-23%	-21%
autres tissus périphériques	-84%	-63%	-35%	-36%	-36%
proportion oxydation vs synthèse (pOx)					
tissus splanchniques	0%	0%	0%	0%	0%
muscle	-80%	0%	0%	500%	50%
autres tissus périphériques	-80%	0%	0%	0%	0%
contribution à l'oxydation corporelle totale					
tissus splanchniques	90%	0%	-45%	-45%	-45%
tissus périphériques	-47%	0%	23%	23%	23%
fUE	-73%	-65%	-39%	-41%	-41%
fUP	-73%	-80%	-39%	-41%	-41%
fUH/fUP	0%	190%	0%	0%	0%
taille des principaux compartiments protéiques					
IG	-34%	-34%	-54%	-56%	-55%
Foie	-20%	-22%	-32%	-34%	-34%
Plasma	-43%	-41%	-58%	-59%	-59%
Muscle	-14%	-6%	-47%	-44%	-44%
Rein	-17%	-14%	-43%	-44%	-44%
Peau	-11%	-12%	-19%	-19%	-20%

[†]foie et muqueuse intestinale (IG); *Peau, Rein, Cœur, Cellules sanguines. f_{UP} , production totale d'urée; f_{UE} , flux d'excrétion urinaire de l'urée; f_{UH} , flux de transfert d'urée vers la lumière caeco-colique.

modèles, à savoir la production et l'excrétion d'N appauvri dans les urines (Ponsard & Averbuch 1999; Martinez del Rio & Wolf 2005). Selon nos simulations, l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ résulte davantage d'une augmentation de la dégradation des tissus protéiques et de la réutilisation des AA riches en ^{15}N ainsi libérés pour le renouvellement protéique tissulaire : en l'absence de P alimentaires (appauvries en ^{15}N), l'organisme recycle ses propres P (enrichies en ^{15}N) pour alimenter le renouvellement protéique continu des tissus, et c'est ce recyclage des P endogènes qui participe surtout à l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires. D'après nos prédictions, la production d'urée semble contribuer de manière moins importante et univoque à l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires en cas de jeûne. En effet, si l'augmentation de l'oxydation splanchnique (ϵ_{oxSI} et $\epsilon_{\text{oxL}} < 0$) contribue à diminuer le $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée produite et à augmenter le $\delta^{15}\text{N}$ des tissus, l'augmentation de l'oxydation musculaire ($\epsilon_{\text{oxM}} > 0$) produit l'effet inverse en augmentant le $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée produite et en diminuant le $\delta^{15}\text{N}$ des tissus. D'ailleurs, dans nos prédictions, la production d'urée est diminuée et l'urée produite s'enrichit en ^{15}N . Finalement, en termes de bilan, l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires s'explique non pas par la perte d'urée appauvrie mais par le fait que l'organisme n'est plus alimenté par les protéines alimentaires appauvries. Ceci est en accord avec plusieurs études réalisées chez des mammifères qui ont rapporté une augmentation de l'enrichissement dans l'urée urinaire ou dans l'urine lors d'une restriction alimentaire caractérisée par un bilan azoté négatif et/ou une perte de masse corporelle (Barboza & Parker 2006; Deschner *et al.* 2012; Lee *et al.* 2012).

II.5. Quelles informations peut-on tirer des $\delta^{15}\text{N}$ facilement observables dans les pools d'excrétion à propos des flux d'N ?

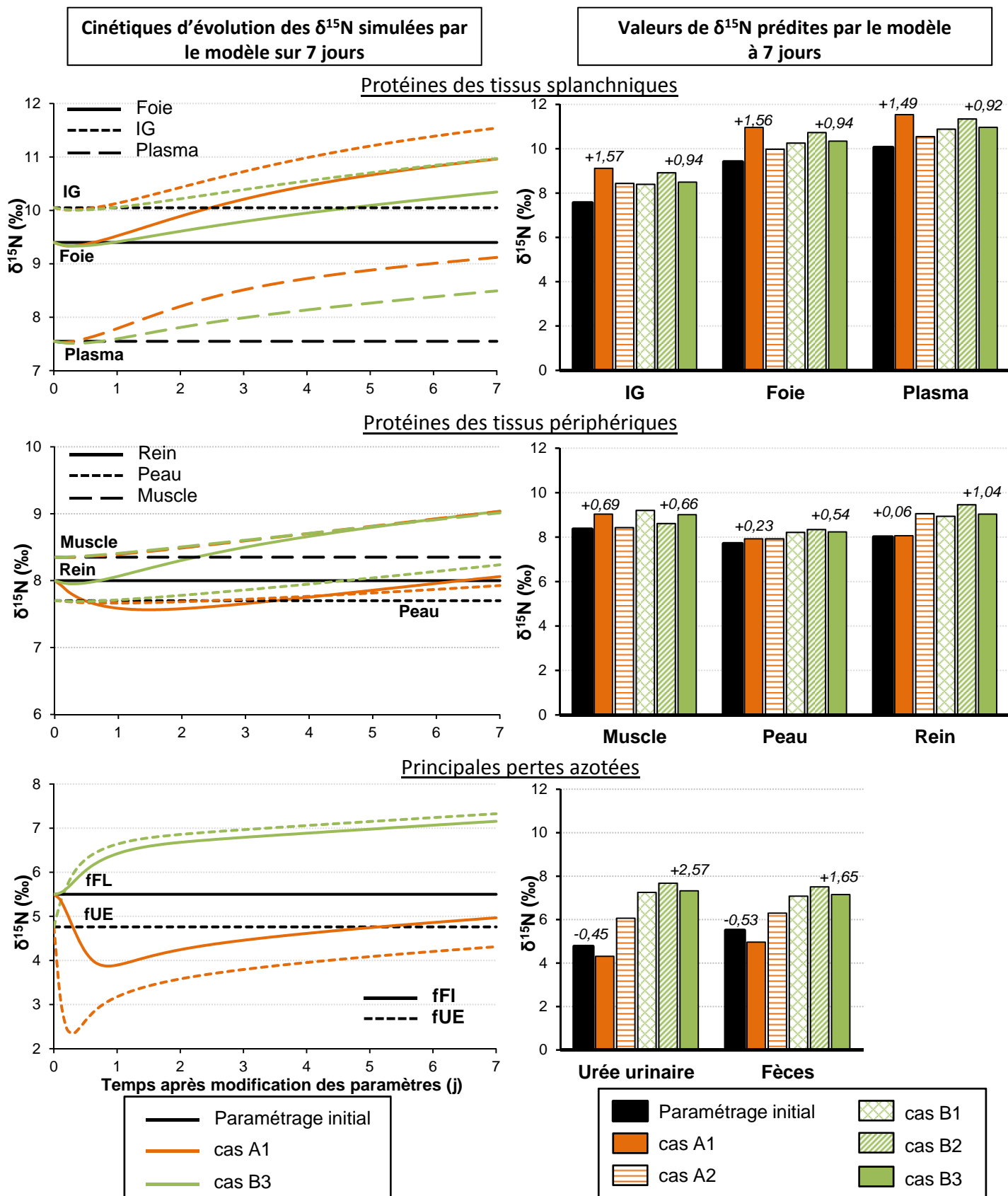
Dans l'optique de pouvoir utiliser les $\delta^{15}\text{N}$ comme des signatures isotopiques de l'impact métabolique de certaines conditions nutritionnelles ou physiopathologiques, il est intéressant d'analyser si les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans des pools faciles d'accès tels que les pools d'excrétion (urine et fèces) peuvent constituer des biomarqueurs de la modulation de certains flux d'N dans l'organisme.

II.5.i. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle et de l'urée urinaire

De par la structure du modèle, le $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle (δ_{BU}) et celui de l'urée excrétée dans les urines (δ_{UE}) évoluent conjointement, δ_{UE} étant continuellement égale à δ_{BU} à la valeur du facteur de fractionnement ϵ_{UE} près (c.-à-d., $\delta_{\text{UE}} = \delta_{\text{BU}} + \epsilon_{\text{UE}}$). De ce fait, δ_{UE} et δ_{BU} varient de la même manière (même sens et de même amplitude de variation) en réponse à une modulation nutritionnelle ou physiopathologique donnée.

Dans les simulations où les quantités d'N dans les compartiments sont inchangées ou évoluent rapidement vers un nouvel état stationnaire, le système atteint un nouvel état d'équilibre isotopique et les variations de δ_{BU} , quand elles existent, sont seulement transitoires et ne persistent pas au nouvel état d'équilibre isotopique. En effet, les modulations de flux dans des cas de variations modérées de la qualité ou de la quantité de l'apport protéique ne modifient pas ou très peu les valeurs de δ_{BU} ou δ_{UE} à l'équilibre (Figures 69 & 70). Ceci s'explique par le fait qu'à l'état stationnaire (bilan d'N nul), les $\delta^{15}\text{N}$ des

Figure 71 : Simulations des $\delta^{15}\text{N}$ lors d'un jeûne d'intensité variable.



Les enrichissements isotopiques ($\delta^{15}\text{N}$) dans les protéines corporelles et les pertes azotées ont été simulés avec un apport protéique (N_{intake}) nul et selon les modifications des paramètres de flux métaboliques indiquées dans le tableau RM6. Les cinétiques d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$ entre 0 et 7 jours sont présentées dans le panneau de gauche et les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ prédites à l'issue des 7 jours dans le panneau de droite.

Cas A : jeûnes de type court avec épargne de la masse protéique musculaire, grâce essentiellement soit à une diminution de l'oxydation dans les tissus périphériques (cas A1) soit à une augmentation du recyclage de l'urée (cas A2). Cas B : jeûnes de type prolongé avec fonte protéique musculaire provenant d'une augmentation de la dégradation protéique musculaire (cas B1), d'une diminution de la synthèse et d'une augmentation de l'oxydation musculaires (cas B2) ou d'une situation intermédiaire (cas B3).

Les valeurs des variations des $\delta^{15}\text{N}$ après 7 jours pour les cas A1 et B3 sont indiqués au dessus des histogrammes.

apports et des pertes azotés sont de nouveau équilibrés lorsque le nouvel équilibre isotopique est atteint, et comme le $\delta^{15}\text{N}$ de l'apport ne varie pas et que l'excrétion d'urée représente la majeure partie des pertes azotées, le $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urée recouvre sa valeur initiale.

Néanmoins, δ_{BU} peut varier temporairement entre ces deux états d'équilibre isotopique en réponse à des variations des flux métaboliques, et les variations de δ_{BU} semblent alors principalement liées à des variations du flux d'oxydation musculaire, qui, de par le paramétrage du modèle, est le plus large contributeur à l'oxydation corporelle totale. Ainsi, dans le cas de la simulation d'une croissance de la masse protéique musculaire, la diminution transitoire du flux d'oxydation musculaire est accompagnée d'une diminution transitoire des $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urée corporelle et dans les P musculaires (M_p), tandis qu'à l'inverse, dans le cas d'une déplétion de la masse protéique, δ_{BU} et δM_p augmentent transitoirement en parallèle de l'augmentation du flux d'oxydation musculaire (**Figure 72**). Cependant dans la plupart des cas, les variations temporaires de δ_{BU} et δ_{UE} sont difficiles à interpréter et à imputer à la modification d'un flux d'N particulier, car leur sens et amplitude de variation sont la résultante complexe de la modification conjointe de plusieurs flux d'N. Ainsi, les variations de δ_{BU} et δ_{UE} semblent principalement liées aux variations des contributions relatives des zones splanchnique et périphérique à l'oxydation ou la production d'urée corporelle totale. En effet, dans nos simulations impliquant des modulations des flux d'oxydation pour rendre compte d'un apport protéique qualitativement diminué ou quantitativement augmenté, on observe qu'une augmentation de l'oxydation dans le foie et l'intestin est associée à une diminution temporaire de δ_{BU} , alors qu'une augmentation de l'oxydation musculaire est associée à une augmentation temporaire de δ_{BU} . Dans tous les cas, les variations de δ_{BU} et δ_{UE} sont de faible amplitude et ont lieu sur une fenêtre de temps limitée. On note cependant des variations temporaires plus importantes de δ_{BU} et δ_{UE} dans des situations de fort catabolisme musculaire telles qu'un jeûne prolongé (Figure 71). Néanmoins, dans les simulations correspondantes, l'ensemble des flux est modifié et il est donc compliqué de déterminer si, et dans quelle mesure, la modulation spécifique d'un flux est responsable des variations observées de δ_{BU} et δ_{UE} .

⇒ En conclusion, les variations prédites pour les $\delta^{15}\text{N}$ des pools d'urée corporelle ou urinaire sont généralement non permanentes, peu sensibles (c.-à-d. de faible amplitude), non ou peu spécifiques (c.-à-d. ne pouvant pas être attribuées à la modulation d'un flux unique) et apparaissent donc peu informatives et difficiles à interpréter. En effet, l'urée étant un produit final du métabolisme azoté, les variations observées de son $\delta^{15}\text{N}$ sont la résultante de modulations diverses (s'additionnant ou s'inversant) des flux métaboliques azotés. Néanmoins, de manière très simplifiée, une augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle ou de l'urée urinaire à un temps donné pourrait témoigner d'un fort état catabolique, notamment au niveau musculaire, mais cette signature disparaît dès que les processus homéostatiques mettent fin à cet épisode catabolique aigu.

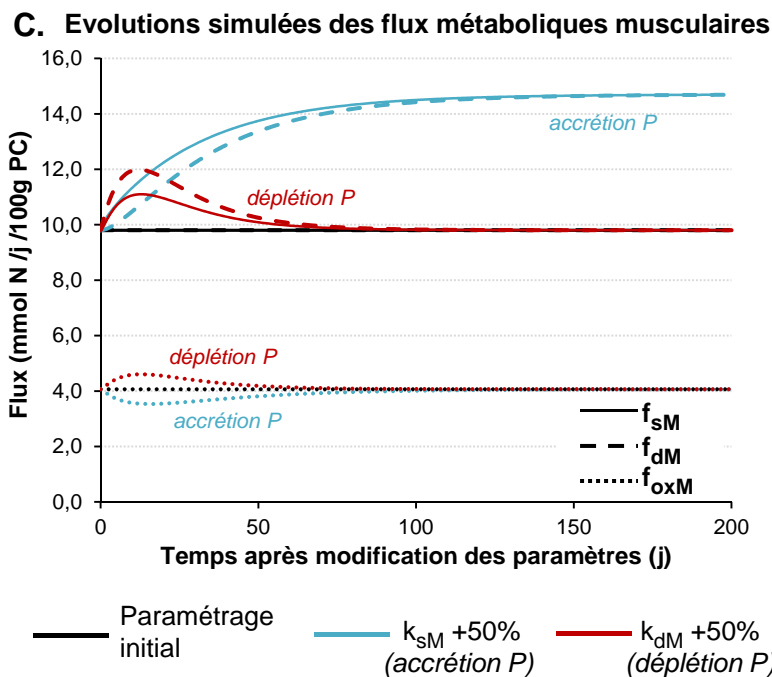
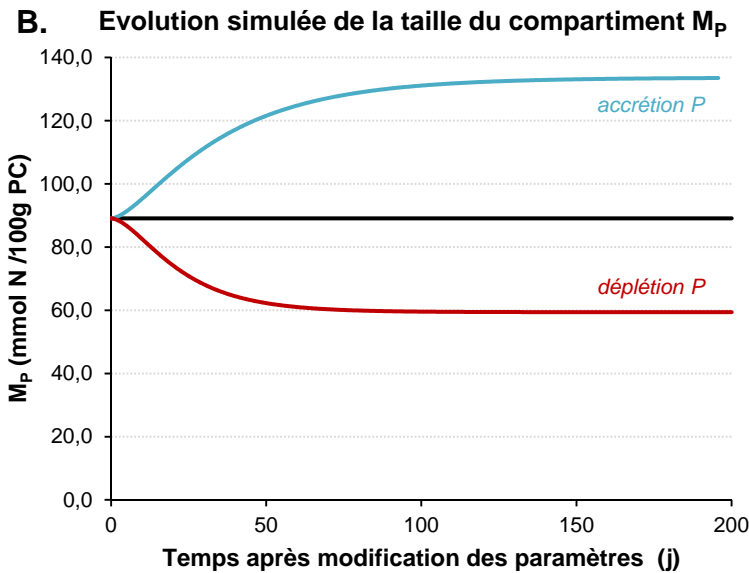
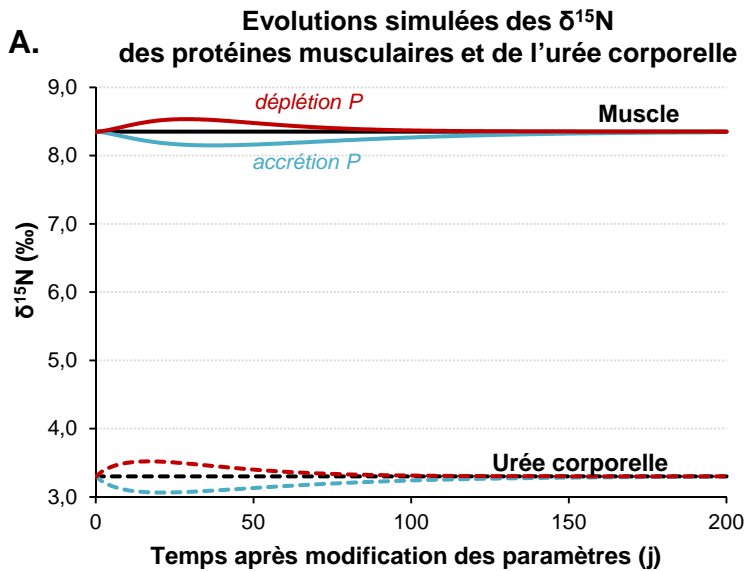


Figure 72 : Simulations de l'évolution du $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle en relation avec le $\delta^{15}\text{N}$ des P musculaires et les variations de la masse protéique et des flux métaboliques musculaires.

Les $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urée corporelle et les P musculaires (A), la taille du compartiment protéique musculaire (B) et les flux métaboliques associés à ce compartiment (C) ont été simulés après une augmentation du taux de synthèse protéique ($k_s+50\%$) ou après une augmentation du taux de dégradation protéique ($k_d+50\%$).

f_{sM} (k_{sM}), flux (taux) de synthèse protéique musculaire; f_{dM} (k_{dM}), flux (taux) de dégradation protéique musculaire; f_{oxM} , flux d'oxydation des AA libres musculaires.

II.5.ii. Variations des $\delta^{15}\text{N}$ des fèces

Contrairement aux pertes urinaires, le modèle prédit, dans certains cas, une modification du $\delta^{15}\text{N}$ des pertes fécales (δ_{FL}) à l'équilibre isotopique. Dans les simulations reproduisant une diminution de la qualité protéique ou une augmentation de l'apport protéique, on observe une variation de δ_{FL} en fonction du recyclage entéro-hépatique de l'urée : δ_{FL} diminue lorsque le recyclage de l'urée (f_{UH}) ou son efficacité ($f_{\text{UH}}/f_{\text{UP}}$, la proportion d'urée produite qui est recyclée) augmente (**Figure 73**). En théorie, ces variations sont cohérentes avec le fait que l'urée est appauvrie en ^{15}N par rapport au contenu colique et que, par conséquent, un afflux augmenté d'urée vers le colon entraîne un appauvrissement en ^{15}N du contenu colique et donc de l'N excrété dans les fèces. Ces variations sont cependant de faible amplitude (de 0 à -0,4‰).

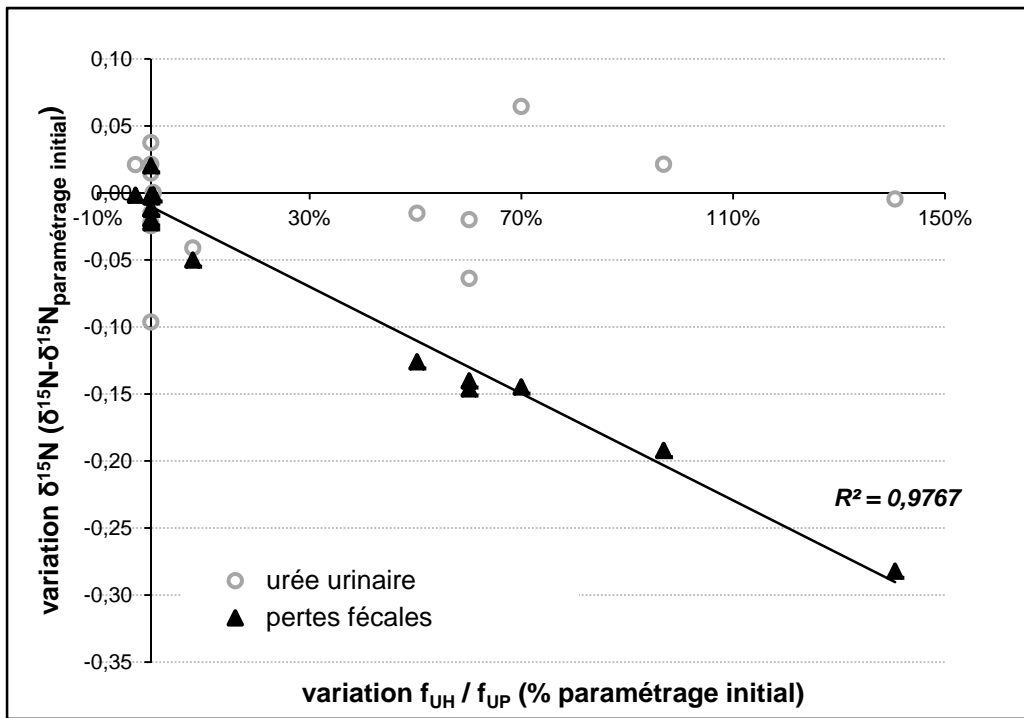
⇒ L'analyse des variations du $\delta^{15}\text{N}$ des pertes fécales fournit une piste intéressante pour l'étude de l'importance du recyclage entéro-hépatique de l'urée et des modulations de son efficacité.

III. Conclusions

Ce travail de modélisation nous a permis de développer un modèle multi-compartimental du métabolisme azoté chez le rat, constitué de 21 compartiments et de 49 voies d'échanges. Ce modèle a notamment la particularité de distinguer différents tissus splanchniques (foie et intestin) et périphériques (muscles, rein, peau, cœur et cellules sanguines). Il distingue également, au sein de chaque tissu, les AA libres des P, ce qui permet de considérer les différents flux d'N à la fois inter-organes (échanges d'AA entre tissus et plasma) et intra-organes (échanges entre AA et P tissulaires via les synthèses et dégradations protéiques). Le modèle confirme l'existence d'effets isotopiques associés à certaines voies métaboliques qui induisent et expliquent les différences de $\delta^{15}\text{N}$ intra et inter-tissulaires que nous avons observées expérimentalement. Les résultats des estimations des paramètres de fractionnement isotopique (ϵ) du modèle montrent qu'il existe un effet isotopique (c.-à-d., une discrimination entre les deux isotopes de l'azote) au niveau des voies d'oxydation des AA, qui explique les différences de $\delta^{15}\text{N}$ entre les compartiments d'AA tissulaires, d'AA plasmatiques et d'urée corporelle. Nos résultats montrent également un effet isotopique lors des synthèses et/ou dégradations protéiques, qui permet de rendre compte de l'enrichissement relatif en ^{15}N des P par rapport aux AA libres tissulaires.

L'intérêt principal du modèle réside dans sa capacité à simuler des variations de $\delta^{15}\text{N}$ en réponse à des modulations des flux d'N correspondant à des variations des conditions nutritionnelles et physiopathologiques. Ainsi, les prédictions du modèle permettent de mieux comprendre quels $\delta^{15}\text{N}$ sont susceptibles de varier, et comment et pourquoi ils varient. Nous avons montré que des variations des flux intra-organes d'AA (c.-à-d., les synthèses et dégradations protéiques) n'affectaient pas les $\delta^{15}\text{N}$ à l'équilibre, mais que les $\delta^{15}\text{N}$ des P et de l'urée pouvaient être temporairement diminués lors d'une croissance du pool protéique et à l'inverse augmentés lors d'une réduction de la masse protéique du

Figure 73 : Relation entre les variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans les pools d'excrétion et l'efficacité du recyclage entéro-hépatique de l'urée (f_{UH}/f_{UP}).



f_{UH} , flux de transfert d'urée vers la lumière caeco-colique; f_{UP} , production totale d'urée.

tissu. Nous avons également montré que des modulations des flux d'échanges inter-organes d'AA induisaient des variations de $\delta^{15}\text{N}$ dans les P tissulaires, d'amplitude et de sens variables selon les tissus. Quantitativement, les flux dont les modulations affectent le plus les $\delta^{15}\text{N}$ sont les flux d'oxydation des AA, mais leur effet est complexe. De manière générale et un peu schématique, les prédictions du modèle indiquent qu'une augmentation des flux d'oxydation splanchniques se traduit par une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires, alors qu'une augmentation des flux d'oxydation périphériques, et principalement du flux d'oxydation musculaire, se traduit plutôt par une diminution des $\delta^{15}\text{N}$. On note également que lors de l'augmentation de l'oxydation splanchnique et de la production d'urée, l'augmentation concomitante du recyclage entéro-hépatique limite l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$. Enfin les variations de $\delta^{15}\text{N}$ des pertes fécales pourraient signer des variations des quantités d'urée hydrolysée au niveau caeco-colique et réabsorbée, c'est-à-dire les variations du recyclage de l'urée et de son efficacité. A l'inverse, nous avons montré que les variations de $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urée excrétée ne constituent pas un marqueur spécifique facile à interpréter.

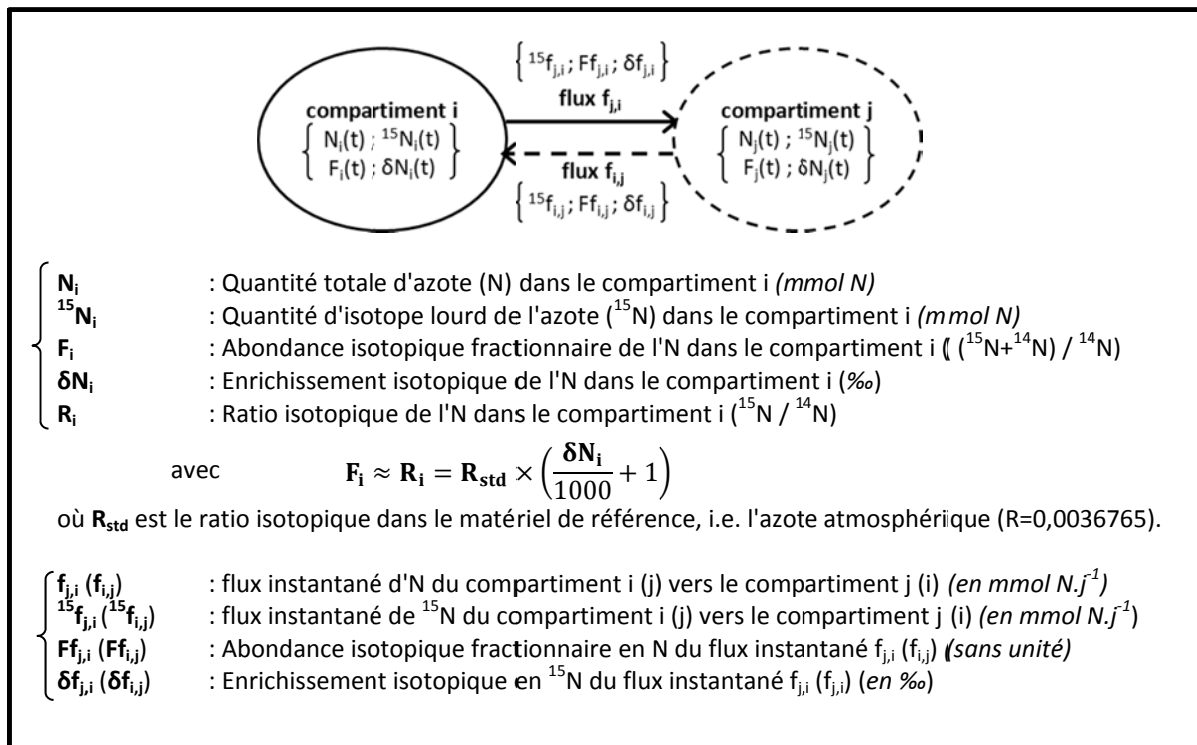
Le modèle permet également de proposer des pistes d'explication concernant les variations des $\delta^{15}\text{N}$ que nous avons constatées sous différentes conditions dans nos travaux expérimentaux (ÉTUDES 1 et 2). Les prédictions du modèle suggèrent que l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ dans les fractions protéiques tissulaires observées lors de la modification de la source protéique (soja vs. lait, ÉTUDE 1) pourrait résulter d'une augmentation du catabolisme oxydatif dans les tissus splanchniques. Par ailleurs, nos prédictions suggèrent que l'augmentation du $\delta^{15}\text{N}$ des P hépatiques et intestinales et la diminution du $\delta^{15}\text{N}$ des P musculaires observées lors de l'initiation d'un syndrome métabolique (rats obèses et insulino-résistants vs. minces et insulino-sensibles, ÉTUDE 2) pourraient résulter d'une diminution des flux inter-organes d'AA (flux de transfert entre les AA circulants et les AA du foie, de l'intestin et du muscle), tandis que des modulations des flux intra-organes d'AA (et en particulier, des flux de synthèse et dégradation protéiques musculaires) ne permettent pas de reproduire ces variations. Enfin, les prédictions du modèle confirment les observations et théories généralement admises dans la littérature, en particulier l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ lors de restrictions protéiques sévères telles que le jeûne et plus généralement, l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ lorsque l'efficacité de l'utilisation des protéines alimentaires pour les synthèses protéiques diminue (y compris lors de modulations nutritionnelles qui n'altèrent pas le bilan azoté, comme une dégradation de la qualité de la source protéique ou une augmentation de l'apport azoté au-delà de l'apport optimal). La cohérence des prédictions du modèle avec les données de la littérature permet d'attester de sa validité et de sa capacité à rendre compte et expliquer les variations de $\delta^{15}\text{N}$.

Fiche technique n°2

FORMULATION MATHÉMATIQUE DES ÉQUATIONS DIFFÉRENTIELLES DU MODÈLE MULTI-COMPARTIMENTAL : ÉVOLUTIONS DES QUANTITÉS D'AZOTE ET DES ENRICHISSEMENTS ISOTOPIQUES DANS UN COMPARTIMENT

Dans le modèle multi-compartmental développé, chaque compartiment est caractérisé par 2 équations différentielles : l'une décrivant l'évolution dynamique de sa taille N, c'est-à-dire de la quantité d'azote présente dans le compartiment, l'autre décrivant l'évolution de sa composition isotopique, exprimée par l'abondance fractionnaire 'F' ou l'enrichissement isotopique 'δ'.

Schéma général des flux d'échanges entre 2 compartiments i et j et des grandeurs associées :



Evolution de la taille du compartiment i :

D'après le principe de conservation de la masse, la variation de la quantité d'azote (dN_i) dans le compartiment i pendant un court intervalle de temps (dt) est égale à la différence entre la somme des flux entrants depuis les autres compartiments j du modèle ($f_{i,j}$) et la somme des flux sortants du compartiment i ($f_{j,i}$), selon l'équation suivante :

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = \sum_j f_{i,j} - \sum_j f_{j,i}$$

Sous l'hypothèse que les transferts d'N sont définis par des lois d'action de masse (i.e. le flux d'azote sortant d'un compartiment est directement proportionnel à la taille de ce compartiment), chaque flux d'azote du compartiment i vers le compartiment j est défini comme le produit d'un coefficient de transfert $k_{j,i}$ par la quantité d'azote dans le compartiment i, soit :

$$f_{j,i}(t) = k_{j,i} \times N_i(t)$$

avec $k_{j,i}$: le taux de transfert du compartiment i vers le compartiment j ($en\ f^{-1}$), considéré constant.

L'évolution de la taille du compartiment i est donc définie par l'équation suivante :

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = \sum_j (k_{i,j} \times N_j(t)) - \sum_j (k_{j,i} \times N_i(t))$$

À l'état stationnaire, les tailles des compartiments sont constantes et par conséquent,

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = 0 \quad \text{et} \quad \sum_j f_{i,j} = \sum_j f_{j,i}$$

Evolution de la composition isotopique du compartiment i :

L'équation d'évolution de la composition isotopique du compartiment i est obtenue en appliquant le principe de conservation de la masse à l'isotope lourd (^{15}N), soit :

$$\frac{d^{15}N_i(t)}{dt} = \sum_j {}^{15}f_{i,j}(t) - \sum_j {}^{15}f_{j,i}(t) \quad (E1)$$

En introduisant la notation F_i , représentant l'abondance fractionnaire dans le compartiment i et définie comme la proportion de ^{15}N par rapport à la quantité d'azote total : $F_i = {}^{15}N_i/N_i$, la quantité d'isotope lourd dans le compartiment i peut s'exprimer sous la forme :

$${}^{15}N_i(t) = N_i(t) \times F_i(t) \quad (E2)$$

De la même manière, la quantité d'isotope lourd qui est instantanément transférée du compartiment i vers le compartiment j (${}^{15}f_{j,i}$) peut s'écrire sous la forme :

$${}^{15}f_{j,i}(t) = F_{j,i}(t) \times f_{j,i}(t) \quad (E3)$$

En utilisant les relations (E2) et (E3) et en appliquant la formule de Leibniz pour le calcul de la dérivée du produit ($N_i \times F_i$), l'équation (E1) peut être exprimée sous la forme :

$$\frac{d^{15}N_i(t)}{dt} = \frac{d(N_i(t) \cdot F_i(t))}{dt} = N_i(t) \times \frac{dF_i(t)}{dt} + F_i(t) \times \frac{dN_i(t)}{dt} = \sum_j (f_{i,j}(t) \times F_{i,j}(t)) - \sum_j (f_{j,i}(t) \times F_{j,i}(t))$$

Sous l'hypothèse d'état stationnaire du compartiment i (c.-à-d. $dN_i/dt = 0$), on en déduit l'équation décrivant l'évolution de l'abondance fractionnaire dans le compartiment i :

$$\frac{dF_i(t)}{dt} = \left[\sum_j (f_{i,j} \times F_{i,j}(t)) - \sum_j (f_{j,i} \times F_{j,i}(t)) \right] / N_i \quad (E4)$$

Le facteur de fractionnement isotopique $\alpha_{j,i}$ associé au transfert d'azote entre les compartiments i et j est défini par la relation :

$$\alpha_{j,i} = \frac{R_{f_{j,i}}}{R_i} \approx \frac{F_{j,i}}{F_i}$$

avec R_i : le ratio isotopique dans le compartiment i ,

$R_{f_{j,i}}$: le ratio isotopique dans le flux instantané de transfert d'azote du compartiment i vers le compartiment j ,

En introduisant cette notation dans l'équation (E4), on en déduit l'équation décrivant l'évolution de l'abondance fractionnaire dans le compartiment i :

$$\frac{dF_i(t)}{dt} = \left[\sum_j (\alpha_{j,i} \times f_{j,i} \times F_j(t)) - \left(\sum_j (\alpha_{i,j} \times f_{i,j}) \right) \times F_i(t) \right] / N_i \quad (E5)$$

Parallèlement, cette équation peut être exprimée avec les notations $\delta^{15}\text{N}$ (pour représenter l'enrichissement isotopique) et ε (pour représenter le fractionnement isotopique) :

- l'abondance fractionnaire F est approximée par le ratio isotopique R ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) tel que :

$$F_i \approx R_i = R_{\text{std}} \times \left(\frac{\delta N_i}{1000} + 1 \right)$$

L'introduction de cette notation dans l'équation (E4) conduit à l'équation suivante :

$$\frac{d\delta N_i(t)}{dt} = \left[\sum_j (f_{i,j} \times \delta f_{i,j}(t)) - \sum_j (f_{j,i} \times \delta f_{j,i}(t)) \right] / N_i \quad (E6)$$

- le facteur de fractionnement isotopique $\varepsilon_{j,i}$ associé au transfert d'azote entre les compartiments i et j est défini comme la différence entre l'enrichissement isotopique du flux instantané sortant du compartiment i ($\delta f_{j,i}$) et l'enrichissement isotopique du compartiment i (δN_i) selon la relation :

$$\varepsilon_{j,i} = \delta f_{j,i} - \delta N_i \quad \text{et de la même manière :} \quad \varepsilon_{i,j} = \delta f_{i,j} - \delta N_i$$

Cette relation est issue de la relation $\varepsilon_{j,i} = (\alpha_{j,i} - 1) \times 1000$, avec $\alpha_{j,i} = R_{f_{j,i}} / R_i$.

L'équation (E6) peut donc être reformulée en utilisant la notation ε , pour aboutir à l'équation finale décrivant l'évolution de l'enrichissement isotopique dans le pool i :

$$\frac{d\delta N_i(t)}{dt} = \sum_j \left[\frac{f_{i,j}}{N_i} \times (\delta N_j(t) + \varepsilon_{i,j}) \right] - \sum_j \left[\frac{f_{j,i}}{N_i} \times (\delta N_i(t) + \varepsilon_{j,i}) \right] \quad (E7)$$

Sous l'hypothèse d'état stationnaire du compartiment i (i.e. $\sum_j f_{j,i} = \sum_j f_{i,j}$) cette équation peut également s'écrire sous la forme :

$$\frac{d\delta N_i(t)}{dt} = \sum_j \left[\frac{f_{i,j}}{N_i} \times (\delta N_j(t) - \delta N_i(t) + \varepsilon_{i,j}) \right] - \sum_j \left[\frac{f_{j,i}}{N_i} \times \varepsilon_{j,i} \right] \quad (E8)$$

DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION GÉNÉRALE

Notre travail, associant expérimentation et modélisation, nous a permis de valider nos deux hypothèses initiales principales, à savoir que, d'une part, les abondances naturelles relatives des isotopes stables de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) varient dans les différents pools métaboliques en fonction des conditions nutritionnelles et physiopathologiques, du fait de modulations du métabolisme azoté associées à ces conditions, et que, d'autre part, l'analyse par modélisation de ces données de $\delta^{15}\text{N}$ permet de les expliquer et d'en extraire des informations sur les flux métaboliques, leur fonctionnement intégré et leurs modulations.

Identification des facteurs de variations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans les différents pools azotés

Un des intérêts et apports majeurs de notre travail expérimental est qu'il a permis d'acquérir un corpus conséquent de données de $\delta^{15}\text{N}$ dans plusieurs tissus (estomac, intestin grêle, colon et caecum, foie, plasma, muscles, rein, cœur, rate, peau, tissu adipeux) et dans différentes fractions azotées (AA, P, urée, NH₄) chez le rat. Ces données ont été obtenues dans différentes conditions nutritionnelles (chez des rats nourris avec des P de qualité différente, ÉTUDE 1) ou physiopathologiques (chez des rats présentant ou non un syndrome métabolique, associant IR et obésité, après avoir consommé un même régime potentiellement obésogène, ÉTUDE 2) et à différentes échelles de temps, c'est-à-dire soit à un temps unique après une période plus ou moins longue d'adaptation au régime pour approcher l'équilibre isotopique (ÉTUDES 1 & 2), soit en cinétique pour suivre les évolutions des $\delta^{15}\text{N}$ après la modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime (ÉTUDE 3). Ces mesures variées nous ont permis de mettre en évidence des variations intra-individuelles (entre les différents tissus et fractions), inter-individuelles (en fonction des conditions) et temporelles de $\delta^{15}\text{N}$. À la différence de la plupart des données rapportées dans la littérature, qui sont issues d'études en éco-physiologie dans lesquelles les conditions nutritionnelles sont souvent mal caractérisées, nos mesures de $\delta^{15}\text{N}$ ont été réalisées dans des conditions contrôlées de poids, de composition corporelle et d'apport alimentaire, c'est-à-dire avec un régime alimentaire bien caractérisé en termes de $\delta^{15}\text{N}$ et de teneur en N et avec des apports azotés similaires entre les différents groupes d'animaux comparés le cas échéant. Ceci nous a permis (i) d'étudier les variations de l'enrichissement relatif des différents pools par rapport au régime (c.-à-d. la discrimination isotopique $\Delta^{15}\text{N}$), qui dépend plus spécifiquement du métabolisme azoté, contrairement au $\delta^{15}\text{N}$ qui varie principalement selon le $\delta^{15}\text{N}$ du régime, et (ii) d'étudier les variations de $\Delta^{15}\text{N}$ en l'absence de facteurs non contrôlés de variation (alors que par exemple dans la littérature, les effets de la qualité de l'apport en P sont rarement dissociables des effets confondants des quantités d'apports en P).

L'ensemble de nos données expérimentales souligne une forte variabilité des $\delta^{15}\text{N}$ entre les tissus et entre les différentes fractions. On peut en dégager quelques grandes tendances, que l'on retrouve dans les mesures de $\delta^{15}\text{N}$ réalisées chez les rats contrôles (soumis *ad libitum* à un régime à base de 20% de caséine, dans des conditions standard) dans nos trois études. Ainsi, les fractions P des tissus sont systématiquement plus riches en ^{15}N que les fractions d'AA libres correspondantes, et l'écart entre ces deux fractions est différent selon les tissus ; il est par exemple important dans le muscle et le plasma, mais plus faible dans la muqueuse intestinale et dans le rein. Par ailleurs, les $\Delta^{15}\text{N}$ des P du foie et du plasma sont plus élevés que ceux du muscle ou de l'intestin grêle, et les AA musculaires sont

systématiquement fortement appauvris par rapport au régime et aux autres pools azotés corporels. La variabilité inter-tissulaire des $\Delta^{15}\text{N}$ et la reproductibilité des différences entre tissus indiquent que les $\Delta^{15}\text{N}$ dépendent des caractéristiques métaboliques propres de chaque tissu. Cette variabilité inter-tissulaire était déjà rapportée dans la littérature (Tableau 24), mais par comparaison de valeurs issues d'études, voire d'espèces, différentes (Vanderklift & Ponsard 2003; Caut *et al.* 2009), et aucune étude n'avait jusqu'ici mesuré de manière concomitante les $\Delta^{15}\text{N}$ dans un ensemble aussi varié et complet de tissus et de pools azotés. De plus, aucune étude n'avait, à notre connaissance, mesuré les $\delta^{15}\text{N}$ des AA libres des tissus, et montré l'enrichissement relatif systématique en ^{15}N des P par rapport aux AA libres au sein des tissus que nous avons mis en évidence. Enfin, alors que la plupart des données de la littérature rapportent un appauvrissement en ^{15}N de l'urine sans distinction de ses différents composés azotés, nous avons mis en évidence que les $\delta^{15}\text{N}$ de l'urine totale et de l'urée urinaire n'étaient pas significativement différents de celui du régime, mais que l'ammoniaque urinaire était légèrement enrichi en ^{15}N . Par contre, nous trouvons que l'urée corporelle est appauvrie en ^{15}N par rapport à l'urée urinaire et au régime. Ces mesures de $\delta^{15}\text{N}$ des différentes formes d'élimination de l'azote indiquent que la théorie généralement admise d'une élimination d'N appauvri dans les urines, pour expliquer l'accumulation de ^{15}N dans les tissus, est en réalité plus complexe, et que, si le catabolisme des AA et la production d'urée aboutissent bien à la formation d'un pool d'urée corporelle appauvrie en ^{15}N , d'autres processus sont susceptibles d'induire un fractionnement isotopique lors de son élimination.

Outre les variations intra-individuelles, nous avons confirmé, dans nos études 1 et 2, que les $\Delta^{15}\text{N}$ variaient entre les individus en fonction de leur conditions nutritionnelles (selon leur source de P alimentaire, ÉTUDE 1) et de leur statut physiopathologique (dans le contexte de l'instauration nutritionnelle précoce d'un syndrome métabolique, ÉTUDE 2). Comme nous l'avons montré dans la deuxième partie de l'introduction bibliographique, quelques études suggéraient un effet de la qualité des P alimentaires sur les $\Delta^{15}\text{N}$ corporels. Cependant, dans ces études ou méta-analyses de données disparates, la quantité d'N ingérée n'était généralement pas mesurée ou contrôlée, et la modification de la qualité des P alimentaires était souvent associée à une modification du bilan azoté corporel global, avec une perte de masse corporelle ou une diminution de la croissance chez les individus consommant des P de qualité inférieure, si bien que l'on ne pouvait pas réellement conclure à un effet spécifique de la qualité protéique dans ces situations. Dans l'ÉTUDE 1, nous démontrons qu'une diminution légère de la qualité P (soja vs. lait) induit spécifiquement une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ dans les P corporelles : en l'absence de modification des quantités de P consommées et du taux de croissance, cette variation des $\Delta^{15}\text{N}$ est directement imputable à des modulations du métabolisme azoté induites par le changement de la source protéique. Le sens de variation mis en évidence, c.-à-d. une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ pour une diminution de la qualité protéique, est en accord avec les données de la littérature et la théorie générale selon laquelle une diminution de l'efficacité d'utilisation des P alimentaires (liée à une moins bonne adéquation des apports alimentaires par rapport aux besoins métaboliques en AA) induit une augmentation de la discrimination isotopique via une augmentation du nombre de processus métaboliques (transaminations et désaminations) induisant un fractionnement isotopique.

Si de nombreuses études, notamment en écologie, ont rapporté des variations des $\Delta^{15}\text{N}$ en relation avec des modifications importantes de l'apport azoté, du bilan azoté et du statut corporel (perte ou gain de masse corporelle), peu se sont intéressées à l'impact de modulations plus subtiles ou

**Tableau 24 : Valeurs de discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$) tissulaires chez le rongeur :
comparaison des valeurs obtenues dans nos travaux expérimentaux
et des données rapportées dans la littérature**

Tissus	Données expérimentales ¹	Données de la littérature ²	
		valeurs	Références
Cœur	4,5	[2,7 ; 5,1]	Yoneyama <i>et al.</i> , 1983; DeNiro <i>et al.</i> , 1984
Foie	[3,8 ; 4,4]	[1,1 ; 5,5]	Kurle CM., 2009; Yoneyama <i>et al.</i> , 1983; DeNiro <i>et al.</i> , 1984; Caut <i>et al.</i> , 2008; Gaebler <i>et al.</i> , 1966; MacAvoy <i>et al.</i> , 2005; Arneson <i>et al.</i> , 2005
Intestin grêle	[1,9 ; 2,5]	[1,4 ; 2,2]	Sick <i>et al.</i> , 1997
Rein	[2,2 ; 3,0]	[0,8 ; 2,6]	Kurle CM., 2009; Yoneyama <i>et al.</i> , 1983; DeNiro <i>et al.</i> , 1984
Muscle	[1,9 ; 3,1]	[1,1 ; 3,4]	Kurle CM., 2009; Yoneyama <i>et al.</i> , 1983; DeNiro <i>et al.</i> , 1984; Caut <i>et al.</i> , 2008; Gaebler <i>et al.</i> , 1966; MacAvoy <i>et al.</i> , 2005; Arneson <i>et al.</i> , 2005; Ambrose <i>et al.</i> , 2000
Cellules sanguines	2,7	[1,2 ; 2,9]	Kurle CM., 2009; Yoneyama <i>et al.</i> , 1983
Poils	1,6	[-1,5 ; 3,9]	Kurle CM., 2009; Caut <i>et al.</i> , 2008, Ambrose <i>et al.</i> , 2000; DeNiro <i>et al.</i> , 1984
Plasma	[4,3 ; 5,1]	[3,2 ; 4,9]	Kurle CM., 2009; Yoneyama <i>et al.</i> , 1983; Sick <i>et al.</i> , 1997
Urines	[-0,4 ; -0,2]	[-2,9 ; -0,9]	Sick <i>et al.</i> , 1997
Fèces	[0,0 ; 1,0]	[1,4 ; 2,3]	Hwang <i>et al.</i> , 2007

¹moyennes pondérées des valeurs mesurées sur les fractions protéiques et acides aminés de chaque tissu, obtenus chez des rats sains nourris avec un régime à base de P de lait. ²données issues d'études réalisées sur des rats ou souris.

indirectes du métabolisme azoté dans des situations pathologiques ou pré-pathologiques. Parmi les très rares études concernant les variations pathologiques des $\delta^{15}\text{N}$ ou $\delta^{13}\text{C}$, il a été mis en évidence des modifications des $\delta^{15}\text{N}$ dans les cheveux chez des individus atteints de cirrhose hépatique (Petzke *et al.* 2006) et une variation des $\delta^{13}\text{C}$ dans l'air expiré chez des souris en réponse à une endotoxémie (Butz *et al.* 2009). Dans l'ÉTUDE 2, nous avons mis en évidence des variations des $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ dans différents tissus chez des rats devenus obèses et IR après 10 semaines d'adaptation à un régime gras et sucré potentiellement obésogène, par rapport à des rats soumis au même régime mais restés relativement maigres et insulino-sensibles. Ces données sont particulièrement intéressantes et novatrices car elles démontrent que les altérations bien connues du métabolisme du glucose et des acides gras, qui adviennent lors du développement d'un syndrome métabolique, s'accompagnent également d'altérations du métabolisme protéique, qui elles sont encore largement méconnues mais qui se traduisent par des modifications des $\delta^{15}\text{N}$ dans certains pools. Ces modifications de $\delta^{15}\text{N}$ signent bien des modulations métaboliques, et non des différences de consommation alimentaire ou de composition corporelle, puisque la consommation relative et le pourcentage de masse maigre sont inchangés. D'autre part, alors que dans les études citées précédemment, les $\delta^{15}\text{N}$ n'étaient mesurés que dans un seul pool azoté (cheveux, cartilage ou plasma), nous montrons ici que le sens et l'amplitude des modifications $\delta^{15}\text{N}$ sont différents selon les tissus (avec une diminution des $\delta^{15}\text{N}$ dans le muscle et le cœur et une augmentation dans le foie et la muqueuse intestinale), ce qui suggère que le métabolisme azoté de ces tissus est différemment affecté lors de la mise en place nutritionnelle précoce d'un syndrome métabolique associant IR et obésité. D'une manière plus générale, ces résultats soulignent l'intérêt et la nécessité de mesurer les $\delta^{15}\text{N}$ dans différents tissus pour explorer des modulations métaboliques dans des conditions pathologiques.

Enfin, nous avons montré, dans l'ÉTUDE 3, que les dynamiques d'incorporation isotopique, en réponse à la modification du $\delta^{15}\text{N}$ du régime, varient selon les tissus et les fractions P ou AA. Plusieurs études avaient déjà rapporté que, lors d'un changement de régime, les tissus ayant un taux de renouvellement rapide, comme le foie, incorporaient plus rapidement la nouvelle composition isotopique du régime que les tissus ayant un taux de renouvellement plus lent, comme le muscle. Les résultats de notre étude permettent d'élargir l'observation de variations des cinétiques isotopiques à des tissus jusque-là peu étudiés comme l'intestin, le rein ou la peau. De plus, et surtout, alors que les études de la littérature ne suivent les évolutions des $\delta^{15}\text{N}$ que dans les tissus entiers, nos mesures distinctes des $\delta^{15}\text{N}$ dans chacune des fractions AA et P de chaque tissu montrent que ces deux fractions peuvent évoluer de manière conjointe et parallèle (comme dans le muscle) ou disjointe (comme dans la peau), ces différences reflétant vraisemblablement des différences dans la structure des échanges entre les AA libres et les P selon les tissus. Ainsi, l'étude comparée des évolutions de $\delta^{15}\text{N}$ des fractions AA et P permet d'analyser les caractéristiques cinétiques mais aussi structurelles du renouvellement protéique dans les tissus, et en particulier le degré de compartimentation des AA précurseurs.

Au final, l'ensemble de notre travail expérimental, rapporté dans les ÉTUDES 1, 2 et 3, renforce notre hypothèse initiale que les $\Delta^{15}\text{N}$ et leurs variations sont liées au métabolisme azoté : les différences de $\Delta^{15}\text{N}$ mises en évidence entre tissus et fractions à l'état stationnaire et les variations inter-tissulaires des dynamiques isotopiques suggèrent que les $\Delta^{15}\text{N}$ reflètent les caractéristiques métaboliques spécifiques de chaque tissu, tandis que les variations inter-individuelles des $\Delta^{15}\text{N}$ observées indiquent

leur capacité à signer des modulations fines du métabolisme des P et AA qui ont lieu sans modification du bilan azoté global.

Intérêt de l'approche de modélisation pour l'analyse des $\delta^{15}\text{N}$ en lien avec le métabolisme azoté

Le travail de modélisation compartimentale (ÉTUDES 3 & 4) a été réalisé dans le but de proposer une interprétation mécaniste de l'ensemble des données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$, et d'en extraire l'information sous-jacente qu'elles contiennent concernant les valeurs des flux azotés qui leur ont donné naissance.

Dans l'ÉTUDE 3, nous avons montré que l'analyse conjointe des cinétiques isotopiques des AA et P tissulaires fournit des informations quantitatives (c.-à-d. numériques) sur les taux de renouvellement protéique des tissus, et des informations qualitatives (c.-à-d. cognitives) sur le niveau de compartimentation des pools d'AA et de P. En effet, grâce au développement d'un modèle simple du métabolisme protéique tissulaire constitué de deux compartiments représentant respectivement un pool précurseur (AA) et un pool produit (P) et échangeant par des flux de synthèse et dégradation protéiques, nous avons pu estimer des taux de renouvellement protéique dans le foie, le muscle, le rein et le plasma. L'intérêt de ces estimations est qu'elles représentent des valeurs intégrées des FSR sur des périodes de temps relativement longues (environ 2 mois) dans des conditions nutritionnelles prolongées qui moyennent les fluctuations journalières de FSR au cours des phases postprandiales et postabsorptives. Nos valeurs diffèrent en ce sens des valeurs de FSR estimées par les méthodes traceurs classiques, qui sont obtenues sur des périodes de temps courtes (quelques heures) et dont la représentativité est par conséquent restreinte à des conditions aiguës, ces estimations à court-terme ne pouvant pas être extrapolées à des durées plus longues (Gasier *et al.* 2010). Les valeurs de FSR intégrées qui sont fournies par notre approche ont donc un intérêt évident en nutrition et santé pour évaluer l'effet à moyen et long termes d'un régime ou traitement sur le renouvellement protéique des tissus. De plus, notre approche permet de mieux comprendre la complexité de la compartimentation du renouvellement protéique dans les différents tissus. En effet, tandis que les méthodes traceurs développées reposent sur des hypothèses simplificatrices concernant la structure du métabolisme protéique et nécessitent l'atteinte d'un équilibre isotopique dans le pool précurseur, notre méthode permet au contraire d'étudier la complexité des échanges précurseurs-produits en comparant les cinétiques isotopiques des précurseurs (AA) et produits (P) dans des conditions de non-équilibre isotopique. Ainsi, nous avons mis en évidence que des modèles simples à 2 compartiments de type précurseurs-produits des flux de synthèse et dégradation protéiques permettent bien de rendre compte des cinétiques isotopiques observées dans le foie, le muscle et le rein. Au contraire, dans des tissus tels que la peau ou l'intestin grêle, le renouvellement protéique implique un système plus complexe, constitué d'au moins trois compartiments, avec 2 compartiments distincts soit pour le pool de P (dans le cas de la peau), soit pour le pool d'AA précurseurs (dans le cas de l'intestin). Ces conclusions sont cohérentes avec les connaissances générales issues de données de la littérature concernant le métabolisme protéique de ces deux tissus. Dans le cas de la peau, la compartimentation de son pool protéique est vraisemblablement liée au fait qu'elle présente une hétérogénéité spatiale et cinétique, avec 2 couches principales de cellules (derme et épiderme) constituées de P ayant des vitesses de renouvellement différentes (Zhang *et al.* 2003). La complexité du renouvellement protéique intestinal résulte plutôt d'une compartimentation supérieure de son pool

d'AA précurseurs des synthèses protéiques, avec une utilisation directe des AA plasmatiques ou extracellulaires pour les protéosynthèses sans mélange avec les AA intracellulaires et/ou issus de la protéolyse (phénomène de "channeling" ; (Johnson *et al.* 2001; Waterlow 2006)). Ces interprétations sont également cohérentes avec le fait que les synthèses protéiques intestinales sont particulièrement dépendantes de l'apport d'AA alimentaires (Baracos *et al.* 2000). Cette étude montre donc l'intérêt de l'analyse par modélisation compartimentale des dynamiques d'évolution des $\delta^{15}\text{N}$ à l'état naturel pour l'exploration à la fois quantitative et qualitative du renouvellement protéique dans les différents tissus. Néanmoins, l'acquisition de données supplémentaires de $\delta^{15}\text{N}$, par exemple dans les différents pools potentiellement précurseurs des protéosynthèses intestinales, est nécessaire pour départager les différentes structures envisagées pour la représentation du renouvellement protéique dans ce tissu et explorer plus en détails sa complexité et son niveau de compartimentation.

Dans l'ÉTUDE 4, nous avons développé un modèle plus global du métabolisme azoté à l'échelle de l'organisme entier, afin d'analyser les mesures de $\delta^{15}\text{N}$ obtenues dans les différentes fractions et tissus corporels à l'état stationnaire et leurs modulations nutritionnelles et physiopathologiques. Comme nous l'avons expliqué dans la première partie de l'introduction bibliographique, les modèles décrivant le métabolisme azoté à l'échelle corps-entier sont peu nombreux et surtout ne distinguent généralement pas tous les différents compartiments impliqués dans les phénomènes d'absorption, de rétention et d'élimination de l'azote. L'intérêt du modèle multi-compartimental que nous avons développé est qu'il distingue à la fois plusieurs compartiments splanchniques (foie, intestin) et périphériques (muscle, peau, rein, cellules sanguines, cœur) et, au sein de chaque tissu, les AA libres des P. Ces distinctions permettent de rendre compte des différents flux d'azote à la fois inter-organes, par des échanges d'AA, et intra-organes, par des flux de synthèse et dégradation protéiques tissulaires et des flux de transamination et désamination, ainsi que de l'hétérogénéité de l'ensemble de ces flux. Cette représentation globale du métabolisme azoté, qui distingue les différentes échelles tissulaire et intra-tissulaire fournit une vision novatrice du fonctionnement intégré du métabolisme azoté dont les données éparpillées de la littérature ne donnaient auparavant qu'une vision parcellaire et fragmentée. Le deuxième intérêt de ce modèle réside dans le fait qu'il a permis de déterminer quelles voies métaboliques devaient être associées à des facteurs de fractionnement isotopique pour rendre compte des $\delta^{15}\text{N}$ observés dans les différents pools de l'organisme. Le paramétrage de ce modèle et ses prédictions nous ont ainsi permis de mieux comprendre les phénomènes de fractionnement isotopique en lien avec le métabolisme azoté. Notre modèle met en évidence l'existence d'effets isotopiques sur les voies du catabolisme des AA, conduisant à la production d'urée corporelle appauvrie en ^{15}N . Cette observation est en accord avec les conclusions des modèles simples, ne considérant qu'un unique compartiment protéique, qui ont été développés pour l'étude de la discrimination isotopique à l'échelle corps-entier (Balter *et al.* 2006; Martinez del Rio & Wolf 2005; Ponsard & Averbuch 1999). Cependant, alors que la théorie communément admise et appuyée par les conclusions de ces modèles explique l'accumulation de ^{15}N dans les tissus par l'excrétion préférentielle d'azote appauvri en ^{15}N , notre modèle, grâce à sa complexité plus importante, permet de proposer une explication alternative à cet enrichissement des tissus corporels, qui est en accord avec nos différentes données expérimentales. En effet, nous avons mis en évidence l'existence, également sur d'autres voies métaboliques, et plus particulièrement lors des synthèses et/ou dégradations protéiques, d'un fractionnement isotopique qui peut traduire l'existence d'effets isotopiques soit directement

associés aux processus de protéosynthèses et/ou protéolyses, soit indirectement associés au métabolisme intra-tissulaire des AA et aux processus de transamination. Nous avons ainsi montré que l'accumulation plus ou moins importante de ^{15}N dans les tissus peut résulter de la libération préférentielle de ^{14}N par la dégradation protéique (du fait d'un fractionnement chimique associé à la protéolyse) et/ou de l'utilisation préférentielle d'AA enrichis en ^{15}N pour les synthèses protéiques en raison d'un fractionnement isotopique, soit sur la voie de protéosynthèse, soit dans les voies du métabolisme intracellulaire des AA (transaminations et désaminations), avec l'export, plus ou moins important, vers d'autres tissus, des AA appauvris en ^{15}N issus des réactions de transaminations et désaminations. En plus d'expliquer l'enrichissement relatif en ^{15}N des tissus par rapport au régime, la prise en compte des phénomènes de fractionnement isotopique au niveau tissulaire (par des facteurs de fractionnement différents selon les tissus) est indispensable pour rendre compte des différences de $\Delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement entre les tissus et des modulations, d'amplitude et de sens différents selon les tissus, mises en évidence lors de l'initiation d'un syndrome métabolique par exemple. Dans notre modèle, l'estimation de facteurs de fractionnement, de signe et d'amplitude différents pour chaque tissu, sur les voies de protéosynthèses/protéolyses et d'oxydation, dénote vraisemblablement une intensité du métabolisme des AA (c.-à-d. l'importance des réactions de transaminations et interconversions des AA) variable selon les tissus et/ou une proportion d'export de ces AA métabolisés par rapport à leur utilisation interne plus ou moins importante en fonction des tissus. Si le modèle développé démontre que de tels effets isotopiques sont indispensables pour rendre compte des données de $\delta^{15}\text{N}$, l'interprétation de leur signification physiologique reste encore spéculative. Enfin, le modèle met également en évidence l'existence d'un effet isotopique sur les voies d'élimination de l'urée, permettant d'expliquer la différence de $\delta^{15}\text{N}$ systématiquement observée dans nos différents travaux expérimentaux entre l'urée plasmatique (qui représente l'urée directement produite) et l'urée urinaire. Nous interprétons cet effet isotopique par l'existence d'un fractionnement isotopique associé à la réabsorption de l'urée au niveau rénal, ce qui est cohérent avec la mise en évidence de variations des $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urine et les tissus corporels dans des conditions de stress hydrique dans lesquelles la réabsorption d'urée est vraisemblablement modulée (Ambrose 1991; Ambrose & Deniro 1986).

Le modèle développé permet donc d'identifier quels sont les facteurs de fractionnement associés aux différentes voies métaboliques, et les simulations du modèle ainsi calibré permettent alors de caractériser quelles variations de $\delta^{15}\text{N}$ résultent de quelles modulations des flux d'N, ce qui permet de mieux comprendre comment, et en fonction de quels flux, les $\delta^{15}\text{N}$ sont susceptibles de varier. Ceci nous a en particulier permis d'interpréter les variations des $\delta^{15}\text{N}$ mises en évidence lors de nos travaux expérimentaux (ÉTUDES 1 ET 2) en termes de modulations du métabolisme azoté. Ainsi, la mise en évidence d'une augmentation des $\Delta^{15}\text{N}$ chez des rats consommant un régime à base de P de soja vs. de lait, suggère, en regard des résultats de modélisation, qu'une diminution de la qualité de la source P induit une augmentation du catabolisme oxydatif des AA, et plus spécifiquement dans la zone splanchnique. Cette interprétation est en accord avec les données de la littérature qui rapportent une augmentation de l'oxydation des AA hépatiques et de la production d'urée lors de la diminution de la qualité de la P alimentaire (Deutz *et al.* 1998; Luiking *et al.* 2005; Fouillet *et al.* 2008; Fouillet *et al.* 2009). Par ailleurs, nous avons montré que des modulations des flux inter-organes d'AA, contrairement aux flux intra-organes d'échanges entre AA et P, permettent de reproduire les variations des $\delta^{15}\text{N}$ observées

expérimentalement chez des rats devenus obèses et IR après la consommation d'un régime gras et sucré (ÉTUDE 2). Ces résultats nous permettent de conclure que l'initiation d'un syndrome métabolique s'accompagne surtout d'une altération des flux inter-organes d'AA, et plus particulièrement d'une moindre alimentation du muscle en AA circulants, ce qui est cohérent avec les données de la littérature montrant une diminution du débit sanguin et un moindre recrutement des capillaires au niveau musculaire chez des individus obèses et IR (Rattigan *et al.* 2007; Keske *et al.* 2009; Kubota *et al.* 2011; Baron *et al.* 1991). A l'inverse, si nous avons montré qu'une modulation isolée des différents flux intra-organes (c.-à-d. les cinétiques protéiques et taux de renouvellement tissulaires) ne permet pas de rendre compte des $\delta^{15}\text{N}$ observés chez les rats IR et obèses, nous ne pouvons pas exclure qu'elle vienne néanmoins s'ajouter aux modulations des flux inter-organes lors de l'initiation du syndrome métabolique, les résultats de la littérature à ce sujet étant d'ailleurs assez contradictoires (Guillet *et al.* 2011; Tessari *et al.* 2011). De manière plus générale, notre modèle, de par la complexité de sa représentation des flux métaboliques et du fractionnement isotopique, permet de proposer des mécanismes alternatifs et/ou différents de ceux proposés jusqu'à maintenant par les modèles corporel simple, pour expliquer des variations des $\delta^{15}\text{N}$ observées dans des situations nutritionnelles ou pathologiques particulières. En effet, les modèles représentant les tissus corporels par un unique pool protéique ne peuvent expliquer des variations globales des $\Delta^{15}\text{N}$ que par des variations relatives des quantités d'azote ingérées vs excrétées, et par conséquent sont cantonnés à l'explication de modulations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans des conditions relativement drastiques induisant des modifications du bilan azoté. A l'inverse, notre modèle permet d'envisager des variations des $\delta^{15}\text{N}$ induites par des modulations d'autres voies métaboliques que l'excrétion urinaire, et notamment par des modulations du métabolisme intra-tissulaire des AA et flux d'échanges inter-organes d'AA. Il souligne également que les $\delta^{15}\text{N}$ à l'équilibre isotopique ne peuvent pas donner d'indication sur les cinétiques protéiques (SP et DP) et leurs variations, puisque celles-ci sont sans effet sur les valeurs de $\Delta^{15}\text{N}$ à l'équilibre isotopique, leur étude nécessitant donc le suivi en cinétique des trajectoires des $\delta^{15}\text{N}$ tissulaires, selon une méthode similaire à celle développée dans l'ÉTUDE 3. Pourtant, les cinétiques protéiques tissulaires intra-organes sont potentiellement affectées par l'amplitude et la distribution des flux d'échanges inter-organes, et il serait donc intéressant de pouvoir étudier conjointement l'effet de conditions particulières sur les modulations des flux d'N inter- et intra-organes. Dans cette optique, on pourrait envisager d'obtenir des données longitudinales de $\delta^{15}\text{N}$ dans les différents pools azotés et de les analyser de manière couplée par le modèle complet, développé dans l'ÉTUDE 4, et par l'approche développée dans l'ÉTUDE 3 en utilisant des sous-modèles du renouvellement protéique.

De manière générale, l'ensemble de nos travaux expérimentaux et de modélisation, par la confrontation de nos données expérimentales avec les prédictions du modèle, souligne bien le lien entre les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans les différents pools azotés et les modulations des principaux flux métaboliques azotés. Si notre travail s'est pour l'instant limité à analyser les variations des $\Delta^{15}\text{N}$ dans des situations nutritionnelles ou pathologiques particulières pour en déduire des informations qualitatives sur les modulations des flux azotés dans ces situations, il permet néanmoins d'avoir une vision globale et intégrée de l'ensemble des principaux flux métaboliques, ainsi que de la façon dont ils interagissent et dont les modulations de certains flux affectent les autres voies métaboliques. À terme, l'utilisation d'un tel modèle du métabolisme azoté, avec l'obtention de données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$ plus détaillées,

devrait permettre d'estimer quantitativement et conjointement les différents flux métaboliques azotés. De ce fait, par rapport aux méthodes d'étude du métabolisme azoté existantes, et notamment aux méthodes traceurs, qui ne permettent d'étudier chacune qu'une voie métabolique, le modèle développé présente un intérêt prometteur en tant qu'outil intégré pour l'estimation de l'ensemble des flux azotés et la compréhension de l'homéostasie des échanges azotés inter- et intra-organes et de leurs modulations nutritionnelles et physio-pathologiques.

La vision globale du métabolisme azoté et des phénomènes de fractionnement isotopique proposée par notre modèle constitue cependant une approximation nécessairement réductrice du système. Elle est en effet fondée sur un certain nombre d'hypothèses simplificatrices, comme par exemple l'agrégation, dans un facteur de fractionnement unique sur les flux de synthèse, d'effets isotopiques ayant lieu au cours de différents processus métaboliques mal identifiés, ou l'hypothèse de linéarité des flux d'échanges entre compartiments. Cette simplification du système a été opérée selon le principe de parcimonie, afin de ne conserver que les propriétés du système jugées pertinentes par rapport à notre problématique et en adéquation avec nos données expérimentales. Néanmoins, il serait intéressant, sous réserve de l'obtention de données expérimentales supplémentaires, d'envisager par la suite une complexification du modèle. On pourrait par exemple considérer des taux de transfert, non pas constants, mais au contraire dépendants de la taille des pools, ce qui permettrait de mieux rendre compte de modulations des flux en réponse à des variations quantitatives de l'apport protéique. Globalement, le modèle pourra être amélioré par l'obtention de données supplémentaires et spécifiques, qui permettront de complexifier ses lois de transfert ou de paramétrer plus finement ses coefficients de fractionnement.

Intérêts et limites de l'utilisation des abondances isotopiques naturelles pour l'étude du métabolisme azoté

La principale originalité de notre travail réside dans le fait qu'il exploite les différences d'abondances isotopiques naturellement présentes dans les pools azotés. En effet, alors que les méthodes traceurs classiques utilisent des niveaux artificiellement élevés d'enrichissements pour suivre les flux métaboliques en faisant l'hypothèse que le traceur enrichi en ^{15}N se comporte de la même manière que la substance non marquée qu'il trace (ce qui est en fait légèrement faux, mais sans générer un biais significatif aux niveaux d'enrichissements utilisés dans ces techniques), nous proposons, au contraire, à travers cette nouvelle approche, de mettre à profit les différences de comportement entre les deux isotopes de l'azote naturellement présents dans l'organisme pour en déduire des informations sur le métabolisme azoté. L'existence d'effets isotopiques sur certaines voies métaboliques se traduisant par des différences de $\delta^{15}\text{N}$ à l'état naturel entre les produits azotés issus de voies métaboliques concurrentes et le fait que, au niveau d'embranchements métaboliques, ces différences de $\delta^{15}\text{N}$ varient en fonction des quantités relatives d'azote transitant dans chacune des voies concurrentes, font des $\delta^{15}\text{N}$ et de leur variabilité naturelle un outil particulièrement adapté pour l'étude d'un système fortement compartimenté comme le métabolisme azoté. D'un point de vue pratique, les abondances isotopiques naturelles sont des paramètres intrinsèques des différents pools métaboliques azotés et par conséquent permettent d'étudier le métabolisme azoté dans un état physiologique non perturbé, c'est-à-dire sans perturber le système par l'introduction de traceurs dans des conditions non physiologiques qui

impliquent par exemple l'introduction de larges doses d'AA pouvant affecter les flux (Garlick *et al.* 1994; Davis & Reeds 2001; Rennie *et al.* 1994). De plus, les mesures de $\delta^{15}\text{N}$ réalisées lors de nos différentes expérimentations montrent que celles-ci sont très reproductibles entre individus pour un même pool et pour des conditions nutritionnelles et physiologiques similaires, et qu'elles constituent par conséquent des marqueurs fiables des flux azotés dans des conditions données. Cependant, l'utilisation des abondances isotopiques naturelles présente un certain nombre de limites, essentiellement pratiques. Par exemple, le travail à des niveaux d'abondances naturelles nécessite de s'assurer que les méthodes biochimiques utilisées pour la séparation des différentes fractions azotées (urée, NH_4 , AA) n'induisent pas de fractionnement isotopique. En particulier, au cours de nos travaux, nous avons constaté que les étapes impliquant l'hydrolyse de l'urée (par une uréase) ou l'utilisation de résines échangeuses de cations, pour l'extraction des AA ou de l'ammoniaque, étaient susceptibles d'engendrer un fractionnement isotopique si les processus (réactions ou séparations) étaient incomplets. Si ce fractionnement est négligeable pour des composés ayant des niveaux d'enrichissement élevés, il peut au contraire significativement biaiser les déterminations des $\delta^{15}\text{N}$ naturels. Il est par conséquent indispensable de vérifier le rendement des techniques utilisées pour la séparation des différentes fractions azotées, ce qui a été rigoureusement fait ici lors du développement de nos techniques analytiques de séparation. En effet, si les différences de $\delta^{15}\text{N}$ observées entre tissus ou fractions azotées sont relativement importantes (de l'ordre de quelques ‰), les différences rapportées entre individus, dans des conditions affectant de façon modérée le métabolisme azoté, peuvent être faibles : par exemple, les différences de $\delta^{15}\text{N}$ que nous avons observées dans les pools protéiques entre des rats obèses et IR et des rats non-obèses et insulino-sensibles, bien que significatives, sont de seulement 0,1 ou 0,2‰. Malgré la faible variabilité intra-groupe, la détection de ces faibles différences nécessite des méthodes de séparation fiables et des techniques de mesure très précises, telles que la spectrométrie de masse à ratio isotopique. Une autre limite pratique à l'utilisation des abondances isotopiques naturelles est le problème de l'atteinte de l'équilibre isotopique. En effet, comme nous l'avons montré dans l'ÉTUDE 3, la vitesse à laquelle les tissus incorporent la composition isotopique du régime varie selon les tissus : les tissus avec un taux de renouvellement lent, comme la peau, ont une vitesse d'incorporation très lente et par conséquent leur $\delta^{15}\text{N}$ continue à évoluer pendant une durée relativement longue après un changement de régime. La comparaison des $\delta^{15}\text{N}$ entre différents tissus nécessite donc que les individus aient été maintenus pendant une durée suffisamment longue sous un régime alimentaire constant, afin que l'ensemble des tissus, et notamment ceux ayant un taux de renouvellement lent, aient atteint l'équilibre isotopique et que leurs valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ ne dépendent plus de l'état initial. Cette limite rend impossible l'utilisation des $\delta^{15}\text{N}$ naturels pour l'étude de modulations aiguës du métabolisme azoté mais en fait, au contraire, un outil adapté pour l'étude de modulations métaboliques à moyen ou long termes, telles que celles induites après une adaptation chronique à un régime ou traitement ou celles accompagnant la dérive chronique et progressive vers des conditions pré-pathologiques comme le syndrome métabolique. Cette nouvelle approche ne peut donc se substituer aux approches classiques utilisant des traceurs isotopiques, en particulier pour l'étude des effets aigus et/ou spécifiquement postprandiaux, mais apporte une information complémentaire à des échelles plus larges à la fois au niveau temporel (étude des flux à long terme) et spatial (étude des flux de manière plus intégrée à l'échelle de l'organisme). Néanmoins, l'utilisation encore très limitée en physiologie et en nutrition des

abondances isotopiques naturelles provient vraisemblablement avant tout de limites cognitives, c'est-à-dire du fait que les phénomènes responsables de la variabilité inter et intra-individuelle de ces abondances étaient encore mal compris. L'information contenue dans ces valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ est en effet difficilement interprétable telle qu'elle, et nécessite le recours à des approches mécanistiques de modélisation pour être analysée et comprise. Notre travail, en contribuant à l'identification et la compréhension d'une partie de ces phénomènes, constitue donc une première étape pour l'utilisation des abondances isotopiques naturelles pour l'exploration du métabolisme azoté. Cependant, cette application nécessite d'identifier plus précisément les voies métaboliques induisant un fractionnement isotopique, et par exemple de déterminer si un fractionnement isotopique a lieu sur les voies de protéosynthèse ou de protéolyse, ou au cours de transformations spécifiques impliquées dans le métabolisme des AA au niveau intra-tissulaire. Ces informations seraient particulièrement intéressantes pour étudier plus en détails les variations d'enrichissement dans les pools d'AA tissulaires et par conséquent les transferts d'AA entre tissus, qui semblent être particulièrement impliqués dans l'adaptation à des conditions physiologiques ou pathologiques particulières mais qui sont encore peu étudiés en raison des difficultés et limites méthodologiques de leurs techniques d'investigation (cathétérisme artério-véneux multi-tissus). L'identification plus précise des voies fractionnantes nécessite l'acquisition de données plus détaillées, comme par exemple la mesure des $\delta^{15}\text{N}$ sur les AA individuels dans chaque tissu.

Malgré ces limites, l'ensemble de ce travail met en évidence l'intérêt prometteur des $\delta^{15}\text{N}$ à constituer des biomarqueurs du métabolisme azoté et offre plusieurs pistes d'utilisation possible en nutrition et physiologie. Par exemple, nos données expérimentales (ÉTUDE 1) et les prédictions de notre modèle multi-compartimental (ÉTUDE 4) indiquent que les $\Delta^{15}\text{N}$ sont capables de traduire l'adéquation qualitative et quantitative des apports par rapport aux besoins en N et AA. Sur la base de ces observations et prédictions, nous proposons dans la figure 74 un schéma général des variations de $\Delta^{15}\text{N}$ en fonction des aspects qualitatifs et quantitatifs de l'apport en N, qui intègre l'interprétation métabolique de ces variations. La discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$) entre les tissus corporels et le régime serait minimale pour un apport optimal par rapport aux besoins et augmenterait lorsque que l'apport deviendrait inadéquat d'un point de vue quantitatif (apport azoté insuffisant ou excessif) ou qualitatif (composition en AA déséquilibrée par rapport aux besoins en AA des tissus). Concernant l'aspect qualitatif, nous avons en effet mis en évidence expérimentalement qu'une diminution de la qualité protéique induisait une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ (ÉTUDE 1), ceci étant confirmé par les prédictions de notre modèle (ÉTUDE 4). Au niveau quantitatif, nous avons montré par simulation (ÉTUDE 4) qu'une restriction protéique sévère ou une augmentation des apports protéiques se traduisait également par une augmentation des $\delta^{15}\text{N}$. Dans le cas de la diminution de la qualité protéique ou de l'augmentation de l'apport protéique, notre modèle indique que l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ est due essentiellement à l'augmentation des désaminations et du catabolisme oxydatif des AA, principalement au niveau splanchnique et traduit une diminution de l'efficacité d'utilisation anabolique des AA alimentaires. L'augmentation du catabolisme oxydatif des AA peut, soit être compensée par l'augmentation de l'efficacité du recyclage entéro-hépatique (comme dans le cas d'une diminution de la qualité protéique), soit induire une augmentation de l'excrétion urinaire (dans le cas d'une augmentation de l'apport protéique). Dans le cas d'un apport protéique insuffisant, tel qu'une restriction protéique sévère,

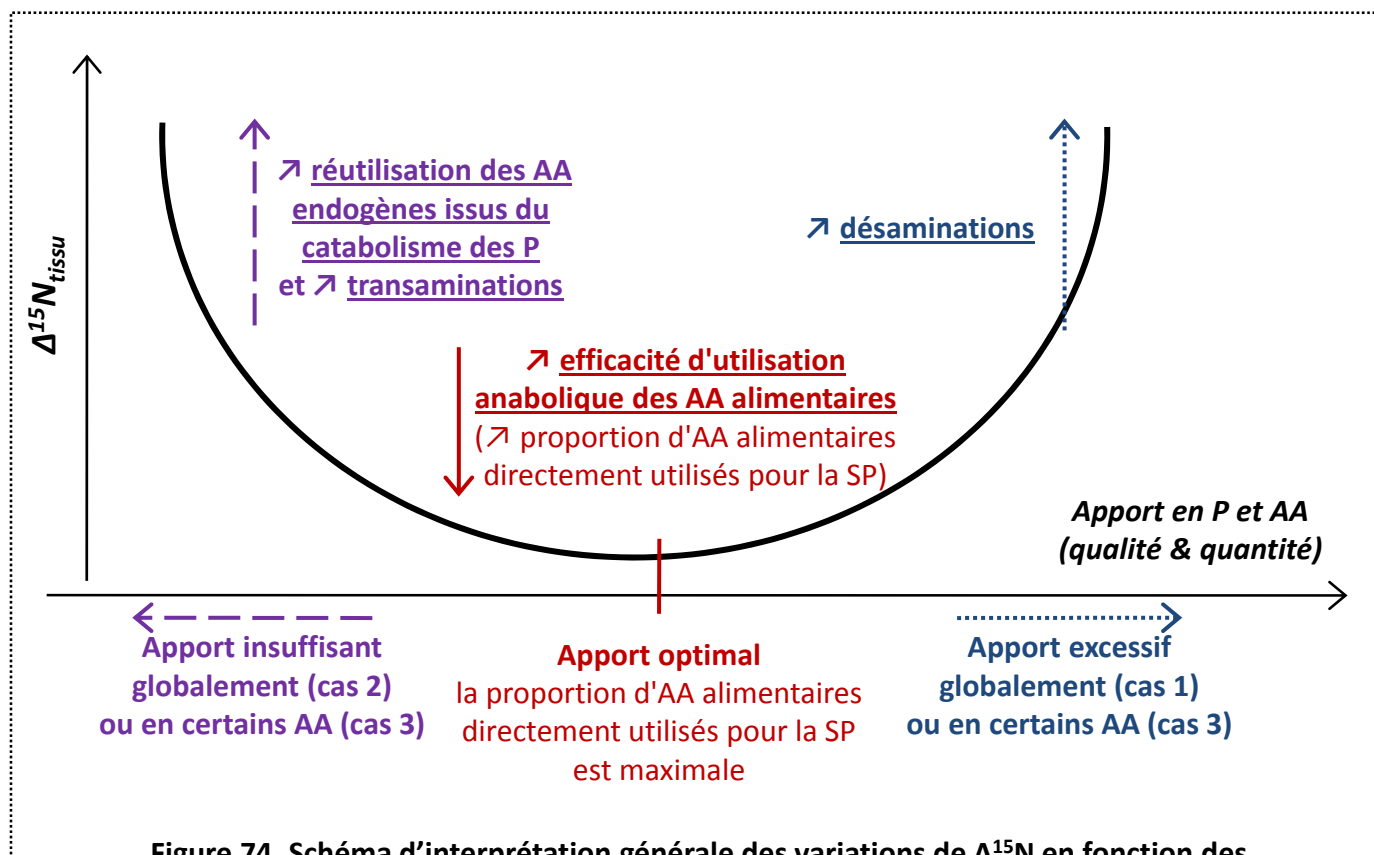


Figure 74. Schéma d'interprétation générale des variations de $\Delta^{15}N$ en fonction des caractéristiques qualitatives et quantitatives de l'apport en P et AA

La discrimination isotopique ($\Delta^{15}N$) observée dans une protéine corporelle ou au niveau de l'organisme est minimale lorsque l'apport azoté est optimal en qualité et en quantité par rapport aux besoins azotés, car alors la proportion des AA alimentaires qui est directement utilisée pour la synthèse protéique (SP) est maximale et la composition isotopique du tissu ou de l'organisme ressemble alors le plus à celle de son régime.

Le $\Delta^{15}N$ augmente (cas 1) lorsque l'apport azoté est globalement excessif, en raison d'une augmentation des désaminations et du catabolisme des AA, ou (cas 2) lorsque l'apport azoté est insuffisant, en raison d'une augmentation de l'utilisation relative pour les synthèses protéiques des AA endogènes issus de la dégradation des P tissulaires et de leurs transaminations, ou encore (cas 3) lorsque l'apport azoté est qualitativement déséquilibré dans son profil en AA individuels, en raison d'une augmentation des désaminations (pour les AA en excès) et des transaminations (pour les AA limitants).

l'augmentation des $\delta^{15}\text{N}$ est liée directement à la forte réduction de l'apport d'azote alimentaire moins riche en ^{15}N et à l'utilisation de l'azote endogène issu du catabolisme des P tissulaires pour les synthèses de P et d'AA. Nos différents résultats suggèrent également que les $\delta^{15}\text{N}$ mesurés dans les fèces dépendent en partie du recyclage entéro-hépatique de l'urée et par conséquent peuvent marquer son efficacité. Cependant, d'autres facteurs, tels que la digestibilité protéique, affectent également les valeurs de $\delta^{15}\text{N}$ des pertes fécales, et il serait par conséquent intéressant d'isoler, dans les fèces et/ou le contenu colique, l'urée et l'ammoniaque dont le $\delta^{15}\text{N}$ devrait signer plus directement l'ampleur du recyclage de l'urée et pourrait permettre d'en estimer l'efficacité, en le comparant au $\delta^{15}\text{N}$ de l'urée corporelle. À l'inverse, les variations de $\delta^{15}\text{N}$ dans l'urée urinaire ne semblent pas constituer un marqueur spécifique de modulations des flux azotés. En effet, l'urée excrétée dans les urines est le produit terminal de l'ensemble des voies cataboliques des composés azotés et par conséquent les variations de son $\delta^{15}\text{N}$ sont la résultante de modulations diverses, concordantes ou divergentes, des flux cataboliques dans les différents tissus et sont, de ce fait, difficilement interprétables. Par ailleurs, alors que chez l'Homme, les quelques études en nutrition s'intéressant aux abondances isotopiques naturelles, ont montré que les $\delta^{15}\text{N}$ des cheveux reflétaient les habitudes alimentaires et le statut physiologique des individus, nos résultats nous amènent à interroger la capacité des $\delta^{15}\text{N}$ des cheveux à constituer des bio-marqueurs d'un état nutritionnel ou physiologique spécifique. D'après les résultats de notre ÉTUDE 3, l'incorporation isotopique est particulièrement lente dans les poils et par conséquent les $\delta^{15}\text{N}$ mesurés dans les poils chez l'animal ou dans les cheveux chez l'Homme ne peuvent constituer un marqueur fidèle des conditions nutritionnelles que si celles-ci ont été maintenues pendant un temps suffisamment long.

En conclusion, nos résultats expérimentaux ont confirmé que les $\delta^{15}\text{N}$ différaient selon les tissus et étaient modulés en fonction des conditions nutritionnelles et physiologiques, et nos résultats de modélisation ont démontré le lien entre les modulations des flux azotés et des variations de $\delta^{15}\text{N}$. Ainsi, l'ensemble de notre travail souligne la capacité des $\delta^{15}\text{N}$ à apporter des informations sur les flux métaboliques azotés et la nécessité d'une approche mécaniste de modélisation compartimentale pour les interpréter.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le fonctionnement coordonné des flux azotés de l'organisme et leurs facteurs de modulation, nutritionnels ou physio-pathologiques, sont encore assez méconnus. En effet, la détermination *in vivo* de l'ensemble des flux d'azote inter et intra-organes, bien que d'un intérêt majeur, se heurte à des difficultés méthodologiques et nécessite le développement de nouvelles approches. Dans cette optique, l'objectif de ce travail était d'étudier la capacité des données d'enrichissement isotopique naturel ($\delta^{15}\text{N}$) des tissus à fournir des informations sur le métabolisme azoté et ses modulations sous différentes conditions, et de développer, sur la base de ces données, un modèle multi-compartimental du métabolisme azoté inter-organes permettant de mieux comprendre son fonctionnement intégré.

Les données expérimentales d'abondances isotopiques naturelles collectées chez le rat dans de nombreux pools azotés et sous différentes conditions, ainsi que le travail de modélisation réalisé pour l'interprétation de ces données, nous ont permis (i) de mettre en évidence le lien étroit entre les variations des $\delta^{15}\text{N}$ et les modulations des flux azotés de l'organisme, (ii) d'identifier les phénomènes et flux métaboliques créant la discrimination isotopique et de mieux comprendre le fonctionnement intégré du système des $\delta^{15}\text{N}$ dans l'organisme, et finalement (iii) de démontrer qu'une analyse par modélisation compartimentale permet d'extraire l'information sous-jacente relative aux flux azotés contenue dans les valeurs et variations de $\delta^{15}\text{N}$. Le modèle global du métabolisme azoté que nous avons développé, et qui constitue l'aboutissement de ce travail, intègre l'ensemble de nos données expérimentales et regroupe les données éparses et parcellaires concernant les flux azotés disponibles dans la littérature et obtenues à partir de méthodes diverses. Il constitue ainsi une représentation unique de l'ensemble des flux azotés qui est à la fois globale et intégrée au niveau de l'organisme, et également détaillée et fine, puisqu'elle distingue les différents sous-niveaux tissulaire et intra-tissulaire. De par sa globalité et sa complexité, ce modèle permet d'étudier conjointement les flux azotés inter-organes (flux de transfert entre les AA circulants et les AA tissulaires) et intra-organes (flux de synthèse et de dégradation protéiques tissulaires). La possibilité d'explorer de manière intégrée les flux d'échanges inter-tissus d'AA constitue un apport nouveau et une avancée majeure de ce modèle, d'autant plus que la distribution et les modulations de ces flux apparaissent déterminantes pour expliquer les différences inter-tissulaires de $\delta^{15}\text{N}$, et semblent en outre particulièrement impliquées dans l'adaptation du métabolisme azoté à des perturbations modérées des conditions nutritionnelles ou physiologiques.

L'analyse des données de trajectoires isotopiques dans les AA et P des tissus après un changement du $\delta^{15}\text{N}$ du régime, qui a été menée par une modélisation compartimentale du métabolisme azoté à l'échelle tissulaire, nous a permis d'obtenir des informations qualitatives sur le degré de compartimentation du métabolisme protéique dans les différents tissus, ainsi que des estimations quantitatives des flux de synthèse et dégradation protéiques dans certains tissus. En revanche, en ce qui concerne les variations de $\delta^{15}\text{N}$ observées expérimentalement sous différentes conditions nutritionnelles et physiopathologiques, leur analyse, qui a été menée par modélisation multi-compartimentale du métabolisme azoté au niveau de l'organisme entier, nous a fourni des informations essentiellement qualitatives concernant les modulations des flux azotés. Une première piste intéressante de poursuite de ce travail consiste à utiliser les données de $\delta^{15}\text{N}$ pour estimer numériquement les différents flux azotés

du modèle multi-compartmental grâce à des méthodes sophistiquées d'optimisation. Ceci nécessitera de surmonter les difficultés numériques actuelles concernant l'estimation des paramètres de modèles comportant un grand nombre de compartiments et voies de transfert. Par ailleurs, afin de valider plus rigoureusement le paramétrage et les prédictions du modèle multi-compartmental, il serait intéressant d'acquérir des données expérimentales de $\delta^{15}\text{N}$ dans des conditions plus drastiques d'altération du métabolisme azoté (comme le jeûne ou une restriction sévère), dont on prédit qu'elles affectent à la fois les $\delta^{15}\text{N}$ et les masses protéiques tissulaires. En effet, des variations de $\delta^{15}\text{N}$ plus importantes que celles mises en évidence dans nos travaux expérimentaux (par la modification de la source protéique ou l'induction nutritionnelle d'un syndrome métabolique) faciliteraient l'identification numérique de paramètres du modèle, et les variations conjointes des quantités d'N dans les compartiments tissulaires permettraient de conforter les variations des flux suggérées par les variations des $\delta^{15}\text{N}$. De même, afin de confirmer les modulations des flux d'échanges inter-organes d'AA que nous avons postulées sur la base de nos données expérimentales concernant l'initiation précoce d'un syndrome métabolique, il serait intéressant d'étudier les variations de $\delta^{15}\text{N}$ advenant dans des situations plus établies, par exemple chez des individus diabétiques. Par ailleurs, le modèle développé constitue, comme tous les modèles compartimentaux des systèmes biologiques, une vision simplifiée et nécessairement approximative de la complexité de la structure et du fonctionnement du métabolisme azoté et des phénomènes de fractionnement isotopique. Les résultats obtenus doivent donc être interprétés avec précaution, en gardant à l'esprit les hypothèses simplificatrices posées. Le travail de modélisation pourrait être approfondi par la complexification de la structure du modèle, en distinguant par exemple davantage de composés azotés à l'intérieur des compartiments actuels du modèle et en mesurant parallèlement les $\delta^{15}\text{N}$ de ces différents composés. Par exemple, la distinction (à la fois dans le modèle et dans les mesures de $\delta^{15}\text{N}$) de l'urée et éventuellement de l'ammoniaque dans les compartiments de contenus intestinaux et dans les pools libres du foie et du rein pourrait permettre d'étudier plus précisément l'efficacité du recyclage de l'urée. De même, la mesure plus spécifique des $\delta^{15}\text{N}$ d'AA particuliers dans les pools d'AA libres plasmatiques et tissulaires et la distinction de ces AA dans le modèle pourraient permettre d'identifier plus précisément les facteurs de fractionnement isotopique. Des modulations spécifiques des $\delta^{15}\text{N}$ d'AA individuels, qui sont particulièrement impliqués dans les échanges inter-organes (par exemple la glutamine) ou dont on suspecte le métabolisme d'être plus particulièrement affecté dans certaines conditions physiologiques particulières (par exemple l'arginine dans le cas d'une dysfonction endothéliale), pourraient constituer des marqueurs des modulations des flux azotés potentiellement plus sensibles et spécifiques que les pools totaux d'AA tissulaires ou plasmatiques. Enfin, une perspective à plus long terme de ce travail, consisterait à utiliser les $\delta^{15}\text{N}$ comme bio-marqueurs de dysrégulations métaboliques afin de mettre en place des tests cliniques simples permettant de détecter ou de mieux caractériser métaboliquement certains états (pré)-pathologiques. Cela requiert de pouvoir mettre en évidence que les $\delta^{15}\text{N}$ de certains pools métaboliques dans des compartiments faciles d'accès (sang, urines, fèces) constituent des signatures isotopiques de perturbations métaboliques. Une des difficultés liées à l'utilisation des $\delta^{15}\text{N}$ comme bio-marqueurs d'altérations métaboliques particulières chez l'homme réside dans le fait que les $\delta^{15}\text{N}$ varient principalement en fonction du $\delta^{15}\text{N}$ du régime alimentaire et que c'est donc davantage la discrimination isotopique ($\Delta^{15}\text{N}$, c.-à-d. la différence de $\delta^{15}\text{N}$

entre un pool métabolique et le régime) que l'enrichissement brut ($\delta^{15}\text{N}$) d'un pool qui est informatif d'un point de vue métabolique. Or le $\delta^{15}\text{N}$ du régime alimentaire, et par conséquent les $\Delta^{15}\text{N}$ des pools métaboliques, sont difficiles à évaluer précisément en conditions naturelles non contrôlées sans un suivi nutritionnel contraignant. Cette difficulté pourrait cependant être contournée en remplaçant la discrimination pool-régime par une discrimination de pool à pool, c'est-à-dire en comparant les $\delta^{15}\text{N}$ de deux tissus ou AA individuels dont on sait à priori que seulement l'un des deux est affecté par l'état (pré-)pathologique étudié, ce qui nécessiterait d'avoir identifié, toujours à priori, par expérimentation et/ou modélisation, les $\delta^{15}\text{N}$ susceptibles d'être affectés ou non par l'état considéré.

Ainsi, notre travail souligne l'intérêt prometteur de cette approche nouvelle, qu'on peut qualifier d'isotopomique, et qui couple l'exploration systématique des données de $\delta^{15}\text{N}$ à l'état naturel et leur analyse par modélisation, pour étudier les flux azotés et leurs modulations. Cette approche devrait nous permettre d'acquérir une compréhension intégrée du système complexe du métabolisme azoté inter- et intra-organes et de ses modulations nutritionnelles et physiopathologiques. En particulier, cette approche devrait améliorer notre compréhension de la manière dont le système est régulé pour assurer l'homéostasie protéique en conditions normales, et de la manière dont il se dérégule lors de dérives vers des situations pré-pathologiques comme le syndrome métabolique. Ce travail ouvre donc des perspectives cognitives, afin de mieux comprendre les processus homéostatiques de régulation des flux azotés, mais également appliquées, afin de pouvoir aboutir à la mise en place de tests cliniques permettant de détecter des dérégulations métaboliques. Enfin, ce travail illustre la complémentarité entre expérimentation et modélisation et le caractère itératif de leur apports respectifs, les données acquises expérimentalement permettant de développer des modèles qui génèrent alors de nouvelles hypothèses de recherche et orientent la mise en place de nouvelles expérimentations.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams S.H. (2011). Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. *Adv Nutr* 2(6): 445-56.
- Adechian S., Giardina S., Remond D., Papet I., Buonocore D., Gaudichon C., *et al.* (2009). Excessive energy intake does not modify fed-state tissue protein synthesis rates in adult rats. *Obesity* 17(7): 1348-55.
- Adeva M.M., Calvino J., Souto G. and Donapetry C. (2011). Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids* 43(1): 171-81.
- Adibi S.A. and Mercer D.W. (1973). Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J Clin Invest* 52(7): 1586-94.
- Ahlman B., Charlton M., Fu A., Berg C., O'Brien P. and Nair K.S. (2001). Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis. *Diabetes* 50(5): 947-54.
- Airhart J., Vidrich A. and Khairallah E.A. (1974). Compartmentation of free amino acids for protein synthesis in rat liver. *Biochem J* 140(3): 539-45.
- Ambrose S.H. (1991). Effects of diet, climate and physiology on nitrogen isotope abundances in terrestrial foodwebs. *J Archaeol Sci* 18(3): 293-317.
- Ambrose S.H. and Deniro M.J. (1986). The isotopic ecology of east-african mammals. *Oecologia* 69(3): 395-406.
- Anderson S.R., Gilge D.A., Steiber A.L. and Previs S.F. (2008). Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. *Metabolism* 57(3): 347-54.
- Anthony J.C., Anthony T.G., Kimball S.R., Vary T.C. and Jefferson L.S. (2000a). Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation. *J Nutr* 130(2): 139-45.
- Anthony J.C., Yoshizawa F., Anthony T.G., Vary T.C., Jefferson L.S. and Kimball S.R. (2000b). Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* 130(10): 2413-9.
- Anthony T.G., Anthony J.C., Yoshizawa F., Kimball S.R. and Jefferson L.S. (2001a). Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J Nutr* 131(4): 1171-6.
- Anthony T.G., Reiter A.K., Anthony J.C., Kimball S.R. and Jefferson L.S. (2001b). Deficiency of dietary EAA preferentially inhibits mRNA translation of ribosomal proteins in liver of meal-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(3): E430-9.
- Aoki T.T., Brennan M.F., Muller W.A., Soeldner J.S., Alpert J.S., Saltz S.B., *et al.* (1976). Amino acid levels across normal forearm muscle and splanchnic bed after a protein meal. *Am J Clin Nutr* 29(4): 340-50.
- Arnal M., Obléd C., Attaix D., Patureau-Mirand P. and Bonin D. (1987). Dietary control of protein turnover. *Diabete Metab* 13(6): 630-42.
- Arneson L.S., MacAvoy S. and Basset E. (2006). Metabolic protein replacement drives tissue turnover in adult mice. *Can J Zool* 84(7): 992-1002.
- Arneson L.S. and MacAvoy S.E. (2005). Carbon, nitrogen, and sulfur diet-tissue discrimination in mouse tissues. *Can J Zool* 83(7): 989-995.
- Bada J.L., Schoeninger M.J. and Schimmelmann A. (1989). Isotopic fractionation during peptide-bond hydrolysis. *Geochim Cosmochim Acta* 53(12): 3337-3341.
- Badaloo A., Boyne M., Reid M., Persaud C., Forrester T., Millward D.J., *et al.* (1999). Dietary protein, growth and urea kinetics in severely malnourished children and during recovery. *J Nutr* 129(5): 969-79.
- Baillie A.G. and Garlick P.J. (1991). Protein synthesis in adult skeletal muscle after tenotomy: responses to fasting and insulin infusion. *J Appl Physiol* 71(3): 1020-4.
- Baillie A.G. and Garlick P.J. (1992). Attenuated responses of muscle protein synthesis to fasting and insulin in adult female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 262(1 Pt 1): E1-5.

- Balage M., Averous J., Remond D., Bos C., Pujos-Guillot E., Papet I., *et al.* (2010). Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *J Nutr Biochem* 21(4): 325-31.
- Baldwin R.L., France J. and Gill M. (1987). Metabolism of the lactating cow. I. Animal elements of a mechanistic model. *J Dairy Res* 54(1): 77-105.
- Balter V., Simon L., Fouillet H. and Lecuyer C. (2006). Box-modeling of 15N/14N in mammals. *Oecologia* 147(2): 212-22.
- Banos G., Daniel P.M., Moorhouse S.R. and Pratt O.E. (1973). The movement of amino acids between blood and skeletal muscle in the rat. *J Physiol* 235(2): 459-75.
- Baracos V.E., Samuels S.E. and Adegoke O.A. (2000). Anabolic and catabolic mediators of intestinal protein turnover: a new experimental approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3(3): 183-9.
- Barazzoni R., Kiwanuka E., Zanetti M., Cristini M., Vettore M. and Tessari P. (2003). Insulin acutely increases fibrinogen production in individuals with type 2 diabetes but not in individuals without diabetes. *Diabetes* 52(7): 1851-6.
- Barber M.D., Fearon K.C., McMillan D.C., Slater C., Ross J.A. and Preston T. (2000). Liver export protein synthetic rates are increased by oral meal feeding in weight-losing cancer patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(3): E707-14.
- Barboza P.S. and Parker K.L. (2006). Body protein stores and isotopic indicators of N balance in female reindeer (*Rangifer tarandus*) during winter. *Physiol Biochem Zool* 79(3): 628-44.
- Baron A.D., Laakso M., Brechtel G. and Edelman S.V. (1991). Mechanism of insulin resistance in insulin-dependent diabetes mellitus: a major role for reduced skeletal muscle blood flow. *J Clin Endocrinol Metab* 73(3): 637-43.
- Barrett E.J., Gusberg R., Ferrannini E., Tepler J., Felig P., Jacob R., *et al.* (1986). Amino acid and glucose metabolism in the postabsorptive state and following amino acid ingestion in the dog. *Metabolism* 35(8): 709-17.
- Bastianelli D., Sauvant D. and Rerat A. (1996). Mathematical modeling of digestion and nutrient absorption in pigs. *J Anim Sci* 74(8): 1873-87.
- Bates P.C. and Millward D.J. (1981). Characteristics of skeletal muscle growth and protein turnover in a fast-growing rat strain. *Br J Nutr* 46(1): 7-13.
- Baumann P.Q., Stirewalt W.S., O'Rourke B.D., Howard D. and Nair K.S. (1994). Precursor pools of protein synthesis: a stable isotope study in a swine model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 267(2 Pt 1): E203-9.
- Beliveau Carey G., Cheung C.W., Cohen N.S., Brusilow S. and Rajman L. (1993). Regulation of urea and citrulline synthesis under physiological conditions. *Biochem J* 292(Pt 1): 241-7.
- Beltran M., Fernandez-Borras J., Medale F., Perez-Sanchez J., Kaushik S. and Blasco J. (2009). Natural abundance of N-15 and C-13 in fish tissues and the use of stable isotopes as dietary protein tracers in rainbow trout and gilthead sea bream. *Aquacult Nutr* 15(1): 9-18.
- Benevenga N.J., Gahl M.J. and Blemings K.P. (1993). Role of protein synthesis in amino acid catabolism. *J Nutr* 123(2 Suppl): 332-6.
- Bennet W.M., Connacher A.A., Scrimgeour C.M., Jung R.T. and Rennie M.J. (1990a). Euglycemic hyperinsulinemia augments amino acid uptake by human leg tissues during hyperaminoacidemia. *Am J Physiol* 259(2 Pt 1): E185-94.
- Bennet W.M., Connacher A.A., Scrimgeour C.M. and Rennie M.J. (1990b). The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[¹⁵N]phenylalanine and L-[1-¹³C]leucine exchange. *Eur J Clin Invest* 20(1): 41-50.
- Bergen W.G. (2008). Measuring in vivo intracellular protein degradation rates in animal systems. *J Anim Sci* 86(14 Suppl): E3-E12.
- Berthold H.K., Jahoor F., Klein P.D. and Reeds P.J. (1995). Estimates of the effect of feeding on whole-body protein degradation in women vary with the amino acid used as tracer. *J Nutr* 125(10): 2516-27.
- Bertolo R.F., Chen C.Z., Pencharz P.B. and Ball R.O. (1999). Intestinal atrophy has a greater impact on nitrogen metabolism than liver by-pass in piglets fed identical diets via gastric, central venous or portal venous routes. *J Nutr* 129(5): 1045-52.

- Biggs R.B. and Booth F.W. (1990). Protein synthesis rate is not suppressed in rat heart during senescence. *Am J Physiol* 258(1 Pt 2): H207-11.
- Biolo G., Chinkes D., Zhang X.J. and Wolfe R.R. (1992a). Harry M. Vars Research Award. A new model to determine in vivo the relationship between amino acid transmembrane transport and protein kinetics in muscle. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16(4): 305-15.
- Biolo G., Declan Fleming R.Y. and Wolfe R.R. (1995a). Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 95(2): 811-9.
- Biolo G., Fleming R.Y., Maggi S.P. and Wolfe R.R. (1995b). Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 268(1 Pt 1): E75-84.
- Biolo G. and Tessari P. (1997). Splanchnic versus whole-body production of alpha-ketoisocaproate from leucine in the fed state. *Metabolism* 46(2): 164-7.
- Biolo G., Tessari P., Inchiostro S., Bruttomesso D., Fongher C., Sabadin L., et al. (1992b). Leucine and phenylalanine kinetics during mixed meal ingestion: a multiple tracer approach. *Am J Physiol* 262(4 Pt 1): E455-63.
- Biolo G., Tipton K.D., Klein S. and Wolfe R.R. (1997). An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): E122-9.
- Biolo G., Zhang X.J. and Wolfe R.R. (1995c). Role of membrane transport in interorgan amino acid flow between muscle and small intestine. *Metabolism* 44(6): 719-24.
- Blachier F., Mariotti F., Huneau J.F. and Tome D. (2007). Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33(4): 547-62.
- Bloomgarden Z.T., Liljenquist J., Lacy W. and Rabin D. (1981). Amino acid disposition by liver and gastrointestinal tract after protein and glucose ingestion. *Am J Physiol* 241(1): E90-9.
- Boirie Y., Dangin M., Gachon P., Vasson M.P., Maubois J.L. and Beaufriere B. (1997a). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(26): 14930-5.
- Boirie Y., Gachon P. and Beaufriere B. (1997b). Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* 65(2): 489-95.
- Bolster D.R., Pikosky M.A., Gaine P.C., Martin W., Wolfe R.R., Tipton K.D., et al. (2005). Dietary protein intake impacts human skeletal muscle protein fractional synthetic rates after endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(4): E678-83.
- Bos C., Airinei G., Mariotti F., Benamouzig R., Berot S., Evrard J., et al. (2007). The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *J Nutr* 137(3): 594-600.
- Bos C., Juillet B., Fouillet H.L., Turlan L., Dare S., Luengo C., et al. (2005a). Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *Am J Clin Nutr* 81(1): 87-94.
- Bos C., Mahe S., Gaudichon C., Benamouzig R., Gausseres N., Luengo C., et al. (1999). Assessment of net postprandial protein utilization of N-15-labelled milk nitrogen in human subjects. *Br J Nutr* 81(3): 221-226.
- Bos C., Metges C.C., Gaudichon C., Petze K.J., Pueyo M.E., Morens C., et al. (2003). Postprandial kinetics of dietary amino acids are the main determinant of their metabolism after soy or milk protein ingestion in humans. *J Nutr* 133(5): 1308-1315.
- Bos C., Stoll B., Fouillet H., Gaudichon C., Guan X.F., Grusak M.A., et al. (2005b). Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(2): E436-E446.
- Bosley K.L., Witting D.A., Chambers R.C. and Wainright S.C. (2002). Estimating turnover rates of carbon and nitrogen in recently metamorphosed winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* with stable isotopes. *Mar Ecol Prog Ser* 236: 233-240.
- Bouteloup-Demange C., Boirie Y., Dechelotte P., Gachon P. and Beaufriere B. (1998). Gut mucosal protein synthesis in fed and fasted humans. *Am J Physiol* 274(3 Pt 1): E541-6.

- Boutry C., Fouillet H., Mariotti F., Blachier F., Tome D. and Bos C. (2011). Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab (Lond)* 8(1): 52.
- Broer S. (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev.* 88(1): 249-286.
- Brosnan J.T. (2003). Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr* 133(6 Suppl 1): 2068S-2072S.
- Buraczewska L. (1979). Secretion of nitrogenous compounds in the small intestine of pigs. *Acta Physiol Pol* 30(2): 319-26.
- Burrin D.G., Davis T.A., Fiorotto M.L. and Reeds P.J. (1991). Stage of development and fasting affect protein synthetic activity in the gastrointestinal tissues of suckling rats. *J Nutr* 121(7): 1099-108.
- Butz D.E., Cook M.E., Eghbalnia H.R., Assadi-Porter F. and Porter W.P. (2009). Changes in the natural abundance of $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ in breath due to lipopolysacchride-induced acute phase response. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(23): 3729-35.
- Calloway D.H., Odell A.C. and Margen S. (1971). Sweat and miscellaneous nitrogen losses in human balance studies. *J Nutr* 101(6): 775-86.
- Capaldo B., Gastaldelli A., Antonello S., Auletta M., Pardo F., Ciociaro D., *et al.* (1999). Splanchnic and leg substrate exchange after ingestion of a natural mixed meal in humans. *Diabetes* 48(5): 958-66.
- Carias D., Cioccia A.M. and Hevia P. (1995). Agreement between the protein digestibility of animal and vegetable proteins measured in-vivo and in-vitro and its effect on the chemical score *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* 45(2): 111-116.
- Carleton S.A. and Del Rio C.M. (2010). Growth and catabolism in isotopic incorporation: a new formulation and experimental data. *Funct Ecol* 24(4): 805-812.
- Carleton S.A. and Martinez del Rio C. (2005). The effect of cold-induced increased metabolic rate on the rate of ^{13}C and ^{15}N incorporation in house sparrows (*Passer domesticus*). *Oecologia* 144(2): 226-32.
- Carraro F., Rosenblatt J. and Wolfe R.R. (1991). Isotopic determination of fibronectin synthesis in humans. *Metabolism* 40(6): 553-61.
- Carroll C.C., Fluckey J.D., Williams R.H., Sullivan D.H. and Trappe T.A. (2005). Human soleus and vastus lateralis muscle protein metabolism with an amino acid infusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(3): E479-85.
- Castillo L.P. and Hatch K.A. (2007). Fasting increases delta ^{15}N -values in the uric acid of *Anolis carolinensis* and *Uta stansburiana* as measured by nondestructive sampling. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(24): 4125-8.
- Caut S., Angulo E. and Courchamp F. (2008). Discrimination factors (Delta N-15 and Delta C-13) in an omnivorous consumer: effect of diet isotopic ratio. *Funct Ecol* 22(2): 255-263.
- Caut S., Angulo E. and Courchamp F. (2009). Variation in discrimination factors (Delta N-15 and Delta C-13): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *J Appl Ecol* 46(2): 443-453.
- Cayol M., Boirie Y., Rambourdin F., Prugnaud J., Gachon P., Beaufrere B., *et al.* (1997). Influence of protein intake on whole body and splanchnic leucine kinetics in humans. *Am J Physiol* 272(4 Pt 1): E584-91.
- Chanseume E., Giraudet C., Gryson C., Walrand S., Rousset P., Boirie Y., *et al.* (2007). Enhanced muscle mixed and mitochondrial protein synthesis rates after a high-fat or high-sucrose diet. *Obesity* 15(4): 853-9.
- Cheng K.N., Pacy P.J., Dworzak F., Ford G.C. and Halliday D. (1987). Influence of fasting on leucine and muscle protein metabolism across the human forearm determined using L-[1- ^{13}C , ^{15}N]leucine as the tracer. *Clin Sci (Lond)* 73(3): 241-6.
- Cheng L., Kim E.J., Merry R.J. and Dewhurst R.J. (2011). Nitrogen partitioning and isotopic fractionation in dairy cows consuming diets based on a range of contrasting forages. *J Dairy Sci* 94(4): 2031-41.

- Cherel Y., Attaix D., Rosolowska-Huszcz D., Belkhou R., Robin J.P., Arnal M., *et al.* (1991). Whole-body and tissue protein synthesis during brief and prolonged fasting in the rat. *Clin Sci (Colch)* 81(5): 611-9.
- Cherel Y., Hobson K.A., Bailleul F.R. and Groscolas R. (2005). Nutrition, physiology, and stable isotopes: New information from fasting and molting penguins. *Ecology* 86(11): 2881-2888.
- Chevalier L., Bos C., Azzout-Marniche D., Dardevet D., Tome D. and Gaudichon C. (2010). Dietary protein regulates hepatic constitutive protein anabolism in rats in a dose-dependent manner and independently of energy nutrient composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299(6): R1720-30.
- Chevalier L., Bos C., Gryson C., Luengo C., Walrand S., Tome D., *et al.* (2009). High-protein diets differentially modulate protein content and protein synthesis in visceral and peripheral tissues in rats. *Nutrition* 25(9): 932-939.
- Chevalier S., Marliss E.B., Morais J.A., Lamarche M. and Gougeon R. (2005). Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *Am J Clin Nutr* 82(2): 355-65.
- Chikenji T., Elwyn D.H. and Kinney J.M. (1983). Protein synthesis rates in rat muscle and skin based on Lysyl-tRNA radioactivity. *J Surg Res* 34(1): 68-82.
- Child S.C., Soares M.J., Reid M., Persaud C., Forrester T. and Jackson A.A. (1997). Urea kinetics varies in Jamaican women and men in relation to adiposity, lean body mass and protein intake. *Eur J Clin Nutr* 51(2): 107-15.
- Clerk L.H. (2006). Obesity Blunts Insulin-Mediated Microvascular Recruitment in Human Forearm Muscle. *Diabetes* 55(5): 1436-1442.
- Cobelli C., Saccomani M.P., Tessari P., Biolo G., Luzi L. and Matthews D.E. (1991). Compartmental model of leucine kinetics in humans. *Am J Physiol* 261(4 Pt 1): E539-50.
- Collin-Vidal C., Cayol M., Obled C., Ziegler F., Bommelaer G. and Beaufrere B. (1994). Leucine kinetics are different during feeding with whole protein or oligopeptides. *Am J Physiol* 267(6 Pt 1): E907-14.
- Corring T., Souffrant W.B., Darcy-Vrillon B., Gebhardt G., Laplace J.P. and Rerat A. (1990). Exogenous and endogenous contribution to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. I. Contributions of nitrogen from the exocrine pancreatic secretion and the bile. *Reprod Nutr Dev* 30(6): 717-22.
- Dangin M., Boirie Y., Garcia-Rodenas C., Gachon P., Fauquant J., Callier P., *et al.* (2001). The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol* 280(2): E340-348.
- Danicke S., Nieto R., Lobley G.E., Fuller M.F., Brown D.S., Milne E., *et al.* (1999). Responses in the absorptive phase in muscle and liver protein synthesis rates of growing rats. *Arch Tierernahr* 52(1): 41-52.
- Daniel H. (2004). Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66: 361-84.
- Danielsen M. and Jackson A.A. (1992). Limits of adaptation to a diet low in protein in normal man: urea kinetics. *Clin Sci (Lond)* 83(1): 103-8.
- Darcy-Vrillon B., Souffrant W.B., Laplace J.P., Rerat A., Corring T., Vaugelade P., *et al.* (1991). Exogenous and endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. II. Ileal and faecal digestibilities and absorption of amino acids. *Reprod Nutr Dev* 31(5): 561-73.
- Dardevet D., Kimball S.R., Jefferson L.S., Cherrington A.D., Remond D., DiCostanzo C.A., *et al.* (2008). Portal infusion of amino acids is more efficient than peripheral infusion in stimulating liver protein synthesis at the same hepatic amino acid load in dogs. *Am J Clin Nutr* 88(4): 986-96.
- Davis T.A., Fiorotto M.L., Nguyen H.V. and Burrin D.G. (1999). Aminoacyl-tRNA and tissue free amino acid pools are equilibrated after a flooding dose of phenylalanine. *Am J Physiol* 277(1 Pt 1): E103-9.

- Davis T.A. and Reeds P.J. (2001). Of flux and flooding: the advantages and problems of different isotopic methods for quantifying protein turnover in vivo : II. Methods based on the incorporation of a tracer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 4(1): 51-6.
- De Feo P. (1998). Fed state protein metabolism in diabetes mellitus. *J Nutr* 128(2 Suppl): 328S-332S.
- De Feo P., Gaisano M.G. and Haymond M.W. (1991). Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. *J Clin Invest* 88(3): 833-40.
- De Feo P., Volpi E., Lucidi P., Cruciani G., Reboldi G., Siepi D., et al. (1993). Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes* 42(7): 995-1002.
- Deglaire A., Bos C., Tome D. and Moughan P.J. (2009). Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *Br J Nutr* 102(12): 1752-9.
- Deglaire A., Moughan P.J., Bos C., Petzke K., Rutherford S.M. and Tome D. (2008). A casein hydrolysate does not enhance gut endogenous protein flows compared with intact casein when fed to growing rats. *J Nutr* 138(3): 556-61.
- del Rio C.M. and Carleton S.A. How fast and how faithful: the dynamics of isotopic incorporation into animal tissues. *J Mammal* 93(2): 353-359.
- DeNiro M.J. and Epstein S. (1981). Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta* 45(3): 341-351.
- Denne S.C., Brechtel G., Johnson A., Liechty E.A. and Baron A.D. (1995). Skeletal muscle proteolysis is reduced in noninsulin-dependent diabetes mellitus and is unaltered by euglycemic hyperinsulinemia or intensive insulin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 80(8): 2371-7.
- Deschner T., Fuller B.T., Oelze V.M., Boesch C., Hublin J.J., Mundry R., et al. (2012). Identification of energy consumption and nutritional stress by isotopic and elemental analysis of urine in bonobos (*Pan paniscus*). *Rapid Commun Mass Spectrom* 26(1): 69-77.
- Deutz N.E., Bruins M.J. and Soeters P.B. (1998). Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *J Nutr* 128(12): 2435-45.
- Dudley M.A., Wykes L.J., Dudley A.W., Jr., Burrin D.G., Nichols B.L., Rosenberger J., et al. (1998). Parenteral nutrition selectively decreases protein synthesis in the small intestine. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1): G131-7.
- Eklou-Lawson M., Bernard F., Neveux N., Chaumontet C., Bos C., Davila-Gay A.M., et al. (2009). Colonic luminal ammonia and portal blood L-glutamine and L-arginine concentrations: a possible link between colon mucosa and liver ureagenesis. *Amino Acids* 37(4): 751-60.
- El-Khoury A.E., Ajami A.M., Fukagawa N.K., Chapman T.E. and Young V.R. (1996). Diurnal pattern of the interrelationships among leucine oxidation, urea production, and hydrolysis in humans. *Am J Physiol* 271(3 Pt 1): E563-73.
- El-Khoury A.E., Fukagawa N.K., Sanchez M., Tsay R.H., Gleason R.E., Chapman T.E., et al. (1994). Validation of the tracer-balance concept with reference to leucine: 24-h intravenous tracer studies with L-[1-¹³C]leucine and [15N-15N]urea. *Am J Clin Nutr* 59(5): 1000-11.
- El-Khoury A.E., Sanchez M., Fukagawa N.K., Gleason R.E., Tsay R.H. and Young V.R. (1995). The 24-h kinetics of leucine oxidation in healthy adults receiving a generous leucine intake via three discrete meals. *Am J Clin Nutr* 62(3): 579-90.
- El Yousfi M., Breuille D., Papet I., Blum S., Andre M., Mosoni L., et al. (2003). Increased tissue protein synthesis during spontaneous inflammatory bowel disease in HLA-B27 rats. *Clin Sci (Lond)* 105(4): 437-46.
- Elia M. (1991). The inter-organ flux of substrates in fed and fasted man, as indicated by arterio-venous balance studies. *Nutr Res Rev* 4: 3-31.
- Elia M., Folmer P., Schlatmann A., Goren A. and Austin S. (1989). Amino acid metabolism in muscle and in the whole body of man before and after ingestion of a single mixed meal. *Am J Clin Nutr* 49(6): 1203-10.
- Erickson R.H. and Kim Y.S. (1990). Digestion and absorption of dietary protein. *Annu Rev Med* 41: 133-9.

- Estornell E., Barber T. and Cabo J. (1994). Protein synthesis in vivo in rats fed on lipid-rich liquid diets. *Br J Nutr* 72(4): 509-17.
- Estornell E., Cabo J. and Barber T. (1995). Protein synthesis is stimulated in nutritionally obese rats. *J Nutr* 125(5): 1309-15.
- Faber P., Johnstone A.M., Gibney E.R., Elia M., Stubbs R.J., Roger P.L., *et al.* (2003). The effect of rate and extent of weight loss on urea salvage in obese male subjects. *Br J Nutr* 90(1): 221-31.
- Fantle M.S., Dittel A.I., Schwalm S.M., Epifanio C.E. and Fogel M.L. (1999). A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* 120(3): 416-426.
- FAO/WHO (1991). Protein quality evaluation. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome: Food and Agriculture Organization
- Faure M., Chone F., Mettraux C., Godin J.P., Bechereau F., Vuichoud J., *et al.* (2007). Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. *J Nutr* 137(7): 1802-7.
- Faure M., Moennoz D., Montigon F., Fay L.B., Breuille D., Finot P.A., *et al.* (2002). Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Anal Biochem* 307(2): 244-51.
- Faure M., Moennoz D., Montigon F., Mettraux C., Breuille D. and Balleve O. (2005). Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *J Nutr* 135(3): 486-91.
- Felig P. (1975). Amino acid metabolism in man. *Annu Rev Biochem* 44: 933-55.
- Fern E.B. and Garlick P.J. (1973). The specific radioactivity of the precursor pool for estimates of the rate of protein synthesis. *Biochem J* 134(4): 1127-30.
- Fern E.B. and Garlick P.J. (1974). The specific radioactivity of the tissue free amino acid pool as a basis for measuring the rate of protein synthesis in the rat in vivo. *Biochem J* 142(2): 413-9.
- Fleming T.H., Nunez R.A. and Sternberg L.S. (1993). Seasonal-changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia* 94(1): 72-75.
- Fluckey J.D., Pohnert S.C., Boyd S.G., Cortright R.N., Trappe T.A. and Dohm G.L. (2000). Insulin stimulation of muscle protein synthesis in obese Zucker rats is not via a rapamycin-sensitive pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E182-7.
- Focken U. (2001). Stable isotopes in animal ecology: The effect of ration size on the trophic shift of C and N isotopes between feed and carcass. *Isot Environ Health Stud* 37(3): 199-211.
- Forslund A.H., El-Khoury A.E., Olsson R.M., Sjodin A.M., Hambraeus L. and Young V.R. (1999). Effect of protein intake and physical activity on 24-h pattern and rate of macronutrient utilization. *Am J Physiol* 276(5 Pt 1): E964-76.
- Forslund A.H., Hambraeus L., Olsson R.M., El-Khoury A.E., Yu Y.M. and Young V.R. (1998). The 24-h whole body leucine and urea kinetics at normal and high protein intakes with exercise in healthy adults. *Am J Physiol* 275(2 Pt 1): E310-20.
- Fouillet H., Bos C., Gaudichon C. and Tome D. (2002a). Approaches to quantifying protein metabolism in response to nutrient ingestion. *J Nutr*.
- Fouillet H., Gaudichon C., Bos C., Mariotti F. and Tome D. (2003). Contribution of plasma proteins to splanchnic and total anabolic utilization of dietary nitrogen in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E88-97.
- Fouillet H., Gaudichon C., Mariotti F., Bos C., Huneau J.F. and Tome D. (2001). Energy nutrients modulate the splanchnic sequestration of dietary nitrogen in humans: a compartmental analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(2): E248-60.
- Fouillet H., Gaudichon C., Mariotti F., Mahe S., Lescoat P., Huneau J.F., *et al.* (2000). Compartmental modeling of postprandial dietary nitrogen distribution in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E161-75.
- Fouillet H., Juillet B., Bos C., Mariotti F., Gaudichon C., Benamouzig R., *et al.* (2008). Urea-nitrogen production and salvage are modulated by protein intake in fed humans: results of an oral stable-isotope-tracer protocol and compartmental modeling. *Am J Clin Nutr* 87(6): 1702-14.

- Fouillet H., Juillet B., Gaudichon C., Mariotti F., Tome D. and Bos C. (2009). Absorption kinetics are a key factor regulating postprandial protein metabolism in response to qualitative and quantitative variations in protein intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297(6): R1691-705.
- Fouillet H., Mariotti F., Gaudichon C., Bos C. and Tome D. (2002b). Peripheral and splanchnic metabolism of dietary nitrogen are differently affected by the protein source in humans as assessed by compartmental modeling. *J Nutr* 132(1): 125-33.
- Frank J.W., Escobar J., Suryawan A., Kimball S.R., Nguyen H.V., Jefferson L.S., et al. (2005). Protein synthesis and translation initiation factor activation in neonatal pigs fed increasing levels of dietary protein. *J Nutr* 135(6): 1374-81.
- Frayn K.N., Khan K., Coppack S.W. and Elia M. (1991). Amino acid metabolism in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Clin Sci (Lond)* 80(5): 471-4.
- Frazer T.K., Ross R.M., Quetin L.B. and Montoya J.P. (1997). Turnover of carbon and nitrogen during growth of larval krill, *Euphausia superba* Dana: A stable isotope approach. *J Exp Mar Bio Ecol* 212(2): 259-275.
- Fry B. and Arnold C. (1982). Rapid $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ turnover during growth of brown shrimp (*penaeus-aztecus*). *Oecologia* 54(2): 200-204.
- Fryburg D.A., Jahn L.A., Hill S.A., Oliveras D.M. and Barrett E.J. (1995). Insulin and insulin-like growth factor-I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. *J Clin Invest* 96(4): 1722-9.
- Fujita S., Rasmussen B.B., Cadenas J.G., Grady J.J. and Volpi E. (2006). Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(4): E745-54.
- Fuller B.T., Fuller J.L., Sage N.E., Harris D.A., O'Connell T.C. and Hedges R.E. (2004). Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18(23): 2889-96.
- Fuller B.T., Fuller J.L., Sage N.E., Harris D.A., O'Connell T.C. and Hedges R.E. (2005). Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(18): 2497-506.
- Fuller M.F. and Garlick P.J. (1994). Human amino acid requirements: can the controversy be resolved? *Annu Rev Nutr* 14: 217-41.
- Fuller M.F. and Reeds P.J. (1998). Nitrogen cycling in the gut. *Annu Rev Nutr* 18: 385-411.
- Gaebler O.H., Vitti T.G. and Vukmirovich R. (1966). Isotope effects in metabolism of ^{14}N and ^{15}N from unlabeled dietary proteins. *Can J Biochem* 44(9): 1249-57.
- Gannes L.Z., Martinez del Rio C. and Koch P. (1998). Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 119(3): 725-37.
- Gannes L.Z., O'Brien D.M. and delRio C.M. (1997). Stable isotopes in animal ecology: Assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78(4): 1271-1276.
- Garlick P.J. (1972). Measurement of liver protein-synthetic rate. *Biochem J* 126(3): 23P.
- Garlick P.J., Clugston G.A., McNurlan M.A., Preedy V.R. and Fern E.B. (1982). Nutrition and protein turnover. *Biochem Soc Trans* 10(4): 290-1.
- Garlick P.J., Clugston G.A., Swick R.W. and Waterlow J.C. (1980). Diurnal pattern of protein and energy metabolism in man. *Am J Clin Nutr* 33(9): 1983-6.
- Garlick P.J., Fern M. and Preedy V.R. (1983). The effect of insulin infusion and food intake on muscle protein synthesis in postabsorptive rats. *Biochem J* 210(3): 669-76.
- Garlick P.J., McNurlan M.A., Essen P. and Wernerman J. (1994). Measurement of tissue protein synthesis rates in vivo: a critical analysis of contrasting methods. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): E287-97.
- Garlick P.J., Millward D.J. and James W.P. (1973). The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats. *Biochem J* 136(4): 935-45.

- Garlick P.J., Millward D.J., James W.P. and Waterlow J.C. (1975). The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 414(1): 71-84.
- Garlick P.J., Wernerman J., McNurlan M.A., Essen P., Lobley G.E., Milne E., *et al.* (1989). Measurement of the rate of protein synthesis in muscle of postabsorptive young men by injection of a 'flooding dose' of [1-¹³C]leucine. *Clin Sci (Colch)* 77(3): 329-36.
- Garlick P.J., Wernerman J., McNurlan M.A. and Heys S.D. (1991). Organ-specific measurements of protein turnover in man. *Proc Nutr Soc* 50(2): 217-25.
- Gasier H.G., Fluckey J.D. and Previs S.F. (2010). The application of 2H₂O to measure skeletal muscle protein synthesis. *Nutr Metab (Lond)* 7: 31.
- Gaudichon C., Mahe S., Benamouzig R., Luengo C., Fouillet H., Dare S., *et al.* (1999). Net postprandial utilization of [N-15]-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *J Nutr* 129(4): 890-895.
- Gaudichon C., Roos N., Mahe S., Sick H., Bouley C. and Tome D. (1994). Gastric emptying regulates the kinetics of nitrogen absorption from ¹⁵N-labeled milk and ¹⁵N-labeled yogurt in miniature pigs. *J Nutr* 124(10): 1970-7.
- Gaye-Siessegger J., Focken U., Abel H. and Becker K. (2004a). Individual protein balance strongly influences delta N-15 and delta C-13 values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* 91(2): 90-93.
- Gaye-Siessegger J., Focken U., Abel H. and Becker K. (2007). Starvation and low feeding levels result in an enrichment of ¹³C in lipids and ¹⁵N in protein of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *J Fish Biol* 71(1): 90-100.
- Gaye-Siessegger J., Focken U., Muetzel S., Abel H. and Becker K. (2004b). Feeding level and individual metabolic rate affect delta ¹³C and delta ¹⁵N values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 138(2): 175-83.
- Gelfand R.A. and Barrett E.J. (1987). Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J Clin Invest* 80(1): 1-6.
- Gerrits W.J., Dijkstra J. and France J. (1997). Description of a model integrating protein and energy metabolism in preruminant calves. *J Nutr* 127(6): 1229-42.
- Gill M., France J., Summers M., McBride B.W. and Milligan L.P. (1989). Mathematical integration of protein metabolism in growing lambs. *J Nutr* 119(9): 1269-86.
- Glick Z., McNurlan M.A. and Garlick P.J. (1982). Protein synthesis rate in liver and muscle of rats following four days of overfeeding. *J Nutr* 112(2): 391-7.
- Goldspink D.F. and Kelly F.J. (1984). Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from the foetus to senility. *Biochem J* 217(2): 507-16.
- Goodman M.N., McElaney M.A. and Ruderman N.B. (1981). Adaptation to prolonged starvation in the rat: curtailment of skeletal muscle proteolysis. *Am J Physiol* 241(4): E321-7.
- Gougeon R., Morais J.A., Chevalier S., Pereira S., Lamarche M. and Marliss E.B. (2008). Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31(1): 128-33.
- Grizard J., Dardevet D., Papet I., Mosoni L., Mirand P.P., Attaix D., *et al.* (1995). Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. The involvement of hormones and substrates. *Nutr Res Rev* 8(1): 67-91.
- Gu S., Villegas C.J. and Jiang J.X. (2005). Differential regulation of amino acid transporter SNAT3 by insulin in hepatocytes. *J Biol Chem* 280(28): 26055-62.
- Guillet C., Delcourt I., Rance M., Giraudet C., Walrand S., Bedu M., *et al.* (2009). Changes in basal and insulin and amino acid response of whole body and skeletal muscle proteins in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 94(8): 3044-50.
- Guillet C., Masgrau A. and Boirie Y. (2011). Is protein metabolism changed with obesity? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(1): 89-92.
- Gustine D.D., Barboza P.S., Adams L.G., Farnell R.G. and Parker K.L. (2011). An isotopic approach to measuring nitrogen balance in caribou. *J Wildl Manage* 75(1): 178-188.

- Haider M. and Tarver H. (1969). Effect of diet on protein synthesis and nucleic acid levels in rat liver. *J Nutr* 99(4): 433-45.
- Halas V., Dijkstra J., Babinszky L., Verstegen M.W. and Gerrits W.J. (2004). Modelling of nutrient partitioning in growing pigs to predict their anatomical body composition. 2. Model evaluation. *Br J Nutr* 92(4): 725-34.
- Halvatsiotis P., Short K.R., Bigelow M. and Nair K.S. (2002). Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetes* 51(8): 2395-404.
- Handley L.L. and Raven J.A. (1992). The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant Cell Environ* 15(9): 965-985.
- Hanigan M.D., Reynolds C.K., Humphries D.J., Lupoli B. and Sutton J.D. (2004). A model of net amino acid absorption and utilization by the portal-drained viscera of the lactating dairy cow. *J Dairy Sci* 87(12): 4247-68.
- Hara H., Nishikawa H. and Kiriyama S. (1992). Different effects of casein and soyabean protein on gastric emptying of protein and small intestinal transit after spontaneous feeding of diets in rats. *Br J Nutr* 68(1): 59-66.
- Harber M.P., Schenk S., Barkan A.L. and Horowitz J.F. (2005). Effects of dietary carbohydrate restriction with high protein intake on protein metabolism and the somatotrophic axis. *J Clin Endocrinol Metab* 90(9): 5175-81.
- Hare P.E., Fogel M.L., Stafford T.W., Mitchell A.D. and Hoering T.C. (1991). The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino-acids isolated from modern and fossil proteins *J Archaeol Sci* 18(3): 277-292.
- Hartman W.J. and Prior R.L. (1992). Dietary arginine deficiency alters flux of glutamine and urea cycle intermediates across the portal-drained viscera and liver of rats. *J Nutr* 122(7): 1472-82.
- Hayase K., Yokogoshi H. and Yoshida A. (1980). Effect of dietary proteins and amino acid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *J Nutr* 110(7): 1327-37.
- Hayes J.M. (2001). Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Stable Isotope Geochemistry* 43: 225-277.
- Hayes J.M. (2002). Practice and principles of isotopic measurements in organic geochemistry.
- Herrera E., Knopp R.H. and Freinkel N. (1969). Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *J Clin Invest* 48(12): 2260-72.
- Herzka S.Z. and Holt G.J. (2000). Changes in isotopic composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae in response to dietary shifts: potential applications to settlement studies. *Can J Fish Aquat Sci* 57(1): 137-147.
- Hess V., Thibault J.N. and Seve B. (1998). The ¹⁵N amino acid dilution method allows the determination of the real digestibility and of the ileal endogenous losses of the respective amino acid in pigs. *J Nutr* 128(11): 1969-77.
- Hesslein R.H., Hallard K.A. and Ramlal P. (1993). Replacement of sulfur, carbon, and nitrogen in tissue of growing broad whitefish (*Coregonus-Nasus*) in response to a change in diet traced by delta-S-34, delta-C-13 and delta-N-15. *Can J Fish Aquat Sci* 50(10): 2071-2076.
- Hiller D.A., Singh V., Zhong M. and Strobel S.A. (2011). A two-step chemical mechanism for ribosome-catalysed peptide bond formation. *Nature* 476(7359): 236-9.
- Hillier T.A., Fryburg D.A., Jahn L.A. and Barrett E.J. (1998). Extreme hyperinsulinemia unmasks insulin's effect to stimulate protein synthesis in the human forearm. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): E1067-74.
- Hobson K.A. (1999). Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120(3): 314-326.
- Hobson K.A., Alisauskas R.T. and Clark R.G. (1993). Stable-nitrogen isotope enrichment in avian-tissues due to fasting and nutritional stress - Implications for isotopic analyses of diet. *Condor* 95(2): 388-394.
- Hobson K.A. and Clark R.G. (1992). Assessing avian diets using stable isotopes II: factors influencing diet-tissue fractionation. *Condor* 94(1): 189-197.

- Hobson K.A., Schell D.M., Renouf D. and Noseworthy E. (1996). Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissues of captive seals: Implications for dietary reconstructions involving marine mammals. *Can J Fish Aquat Sci* 53(3): 528-533.
- Hod Y. and Hershko A. (1976). Relationship of the pool of intracellular valine to protein synthesis and degradation in cultured cells. *J Biol Chem* 251(14): 4458-7.
- Hoerr R.A., Matthews D.E., Bier D.M. and Young V.R. (1991). Leucine kinetics from [2H₃]- and [13C]leucine infused simultaneously by gut and vein. *Am J Physiol* 260(1 Pt 1): E111-7.
- Hoerr R.A., Matthews D.E., Bier D.M. and Young V.R. (1993). Effects of protein restriction and acute refeeding on leucine and lysine kinetics in young men. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1): E567-75.
- Holecek M. and Kovarik M. (2011). Alterations in protein metabolism and amino acid concentrations in rats fed by a high-protein (casein-enriched) diet - effect of starvation. *Food Chem Toxicol* 49(12): 3336-42.
- Hunter K.A., Ballmer P.E., Anderson S.E., Broom J., Garlick P.J. and McNurlan M.A. (1995). Acute stimulation of albumin synthesis rate with oral meal feeding in healthy subjects measured with [ring-²H₅]phenylalanine. *Clin Sci (Colch)* 88(2): 235-42.
- Hwang Y.T., Millar J.S. and Longstaffe F.J. (2007). Do $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of feces reflect the isotopic composition of diets in small mammals? *Can J Zool* 85(3): 388-396.
- Hyde R., Peyrollier K. and Hundal H.S. (2002). Insulin promotes the cell surface recruitment of the SAT2/ATA2 system A amino acid transporter from an endosomal compartment in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 277(16): 13628-34.
- Jackson A.A. (1995). Salvage of urea-nitrogen and protein requirements. *Proc Nutr Soc* 54(2): 535-47.
- Jackson A.A. (1998). Salvage of urea-nitrogen in the large bowel: functional significance in metabolic control and adaptation. *Biochem Soc Trans* 26(2): 231-6.
- Jackson A.A. (1999). Limits of adaptation to high dietary protein intakes. *Eur J Clin Nutr* 53 Suppl 1: S44-52.
- Jackson A.A., Danielsen M.S. and Boyes S. (1993). A noninvasive method for measuring urea kinetics with a single dose of [15N¹⁵N]urea in free-living humans. *J Nutr* 123(12): 2129-36.
- Jackson A.A., Doherty J., de Benoist M.H., Hibbert J. and Persaud C. (1990). The effect of the level of dietary protein, carbohydrate and fat on urea kinetics in young children during rapid catch-up weight gain. *Br J Nutr* 64(2): 371-85.
- Jackson A.A., Picou D. and Landman J. (1984). The non-invasive measurement of urea kinetics in normal man by a constant infusion of ¹⁵N¹⁵N-urea. *Hum Nutr Clin Nutr* 38(5): 339-54.
- Jahoor F., Zhang X.J., Baba H., Sakurai Y. and Wolfe R.R. (1992). Comparison of constant infusion and flooding dose techniques to measure muscle protein synthesis rate in dogs. *J Nutr* 122(4): 878-87.
- Jeejeebhoy K.N., Bruce-Robertson A., Ho J. and Sodtke U. (1972). The effect of cortisol on the synthesis of rat plasma albumin, fibrinogen and transferrin. *Biochem J* 130(2): 533-8.
- Jensen M.D. and Haymond M.W. (1991). Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *Am J Clin Nutr* 53(1): 172-6.
- Jepson M.M., Bates P.C. and Millward D.J. (1988). The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *Br J Nutr* 59(3): 397-415.
- Jepson M.M., Pell J.M., Bates P.C. and Millward D.J. (1986). The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *Biochem J* 235(2): 329-36.
- Jian R., Ruskone A., Filali A., Ducrot F., Rain J.D. and Bernier J.J. (1986). [Effect of the increase of the caloric load of a meal on gastric emptying of its solid and liquid phases]. *Gastroenterol Clin Biol* 10(12): 831-6.
- Johnson H.A., Baldwin R.L., France J. and Calvert C.C. (1999a). A model of whole-body protein turnover based on leucine kinetics in rodents. *J Nutr* 129(3): 728-39.
- Johnson H.A., Baldwin R.L., France J. and Calvert C.C. (1999b). Recycling, channeling and heterogeneous protein turnover estimation using a model of whole-body protein turnover based on leucine kinetics in rodents. *J Nutr* 129(3): 740-50.

- Johnson H.A., Baldwin R.L., Klasing K.C. and Calvert C.C. (2001). Impact of separating amino acids between plasma, extracellular and intracellular compartments on estimating protein synthesis in rodents. *Amino Acids* 20(4): 389-400.
- Johnson H.A., Baldwin R.L., Klasing K.C., France J. and Calvert C.C. (2000). A rodent model of protein turnover used to design an experiment for measuring the rates of channeling, recycling and protein synthesis. *J Nutr* 130(12): 3097-102.
- Juillet B., Fouillet H., Bos C., Mariotti F., Gausseres N., Benamouzig R., *et al.* (2008). Increasing habitual protein intake results in reduced postprandial efficiency of peripheral, anabolic wheat protein nitrogen use in humans. *Am J Clin Nutr* 87(3): 666-78.
- Kadowaki M., Harada N., Takahashi S., Noguchi T. and Naito H. (1989). Differential regulation of the degradation of myofibrillar and total proteins in skeletal muscle of rats: effects of streptozotocin-induced diabetes, dietary protein and starvation. *J Nutr* 119(3): 471-7.
- Kalhan S.C. (2000). Protein metabolism in pregnancy. *Am J Clin Nutr* 71(5 Suppl): 1249S-55S.
- Kempster B., Zanette L., Longstaffe F.J., MacDougall-Shackleton S.A., Wingfield J.C. and Clinchy M. (2007). Do stable isotopes reflect nutritional stress? Results from a laboratory experiment on song sparrows. *Oecologia* 151(3): 365-71.
- Keske M.A., Clerk L.H., Price W.J., Jahn L.A. and Barrett E.J. (2009). Obesity blunts microvascular recruitment in human forearm muscle after a mixed meal. *Diabetes Care* 32(9): 1672-7.
- Kim S.C. and Raushel F.M. (1986). The determination of enzyme-substrate dissociation rates by dynamic isotope exchange enhancement experiments. *J Biol Chem* 261(18): 8163-8166.
- Kimball S.R., Farrell P.A. and Jefferson L.S. (2002). Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol* 93(3): 1168-80.
- Krawielitzki K., Zebrowska T., Schadereit R., Kowalczyk J., Hennig U., Wunsche J., *et al.* (1990). Determining of nitrogen absorption and nitrogen secretion in different sections of the pig's intestine by digesta exchange between ¹⁵N labelled and unlabelled animals. *Arch Tierernahr* 40(1-2): 25-37.
- Kubota T., Kubota N., Kumagai H., Yamaguchi S., Kozono H., Takahashi T., *et al.* (2011). Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab* 13(3): 294-307.
- Kuhnle G.G., Joosen A.M., Kneale C.J. and O'Connell T.C. (2012). Carbon and nitrogen isotopic ratios of urine and faeces as novel nutritional biomarkers of meat and fish intake. *Eur J Nutr*.
- Kuo T.C., Wang C.H., Lin H.C., Lin Y.H., Lin M., Lin C.M., *et al.* (2012). Assessment of renal function by the stable oxygen and hydrogen isotopes in human blood plasma. *PLoS One* 7(2): e32137.
- Kurle C.M. (2009). Interpreting temporal variation in omnivore foraging ecology via stable isotope modelling. *Funct Ecol* 23(4): 733-744.
- Lacroix M., Bos C., Leonil J., Airinei G., Luengo C., Dare S., *et al.* (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *Am J Clin Nutr* 84(5): 1070-1079.
- Lacroix M., Gaudichon C., Martin A., Morens C., Mathe V., Tome D., *et al.* (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(4): R934-R942.
- Langran M., Moran B.J., Murphy J.L. and Jackson A.A. (1992). Adaptation to a diet low in protein: effect of complex carbohydrate upon urea kinetics in normal man. *Clin Sci (Lond)* 82(2): 191-8.
- Laurent B.C., Moldawer L.L., Young V.R., Bistrain B.R. and Blackburn G.L. (1984). Whole-body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 246(5 Pt 1): E444-51.
- Lecavalier L., De Feo P. and Haymond M.W. (1991). Isolated hypoisoleucinemia impairs whole body but not hepatic protein synthesis in humans. *Am J Physiol* 261(5 Pt 1): E578-86.
- Lee B., Yu H., Jahoor F., O'Brien W., Beaudet A.L. and Reeds P. (2000). In vivo urea cycle flux distinguishes and correlates with phenotypic severity in disorders of the urea cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 8021-6.

- Lee T.N., Buck C.L., Barnes B.M. and O'Brien D.M. (2012). A test of alternative models for increased tissue nitrogen isotope ratios during fasting in hibernating arctic ground squirrels. *J Exp Biol* 215(Pt 19): 3354-61.
- Leterme P., Thewis A., Francois E., Van Leeuwen P., Wathélet B. and Huisman J. (1996). The use of ¹⁵N-labeled dietary proteins for determining true ileal amino acid digestibilities is limited by their rapid recycling in the endogenous secretions of pigs. *J Nutr* 126(9): 2188-98.
- Lin C.P. and Huang P.-C. (1986). Comparison of Control Diets Containing Various Protein Levels for Determining Net Protein Utilization by Rats. *J Nutr* 116(2): 216-222.
- Ljungqvist O.H., Persson M., Ford G.C. and Nair K.S. (1997). Functional heterogeneity of leucine pools in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273(3 Pt 1): E564-70.
- Lohrke B., Saggau E., Schadereit R., Beyer M., Bellmann O., Kuhla S., et al. (2001). Activation of skeletal muscle protein breakdown following consumption of soyabean protein in pigs. *Br J Nutr* 85(04): 447-457.
- Long C.L., Jeevanandam M., Kim B.M. and Kinney J.M. (1977). Whole body protein synthesis and catabolism in septic man. *Am J Clin Nutr* 30(8): 1340-4.
- Long C.L., Jeevanandam M. and Kinney J.M. (1978). Metabolism and recycling of urea in man. *Am J Clin Nutr* 31(8): 1367-82.
- Luiking Y.C., Deutz N.E., Jakel M. and Soeters P.B. (2005). Casein and soy protein meals differentially affect whole-body and splanchnic protein metabolism in healthy humans. *J Nutr* 135(5): 1080-7.
- Luiking Y.C., Engelen M.P., Soeters P.B., Boirie Y. and Deutz N.E. (2011). Differential metabolic effects of casein and soy protein meals on skeletal muscle in healthy volunteers. *Clin Nutr* 30(1): 65-72.
- Luzi L., Castellino P. and DeFronzo R.A. (1996). Insulin and hyperaminoacidemia regulate by a different mechanism leucine turnover and oxidation in obesity. *Am J Physiol* 270(2 Pt 1): E273-81.
- Luzi L., Petrides A.S. and De Fronzo R.A. (1993). Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. *Diabetes* 42(12): 1868-77.
- MacAvoy S.E., Arneson L.S. and Bassett E. (2006). Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* 150(2): 190-201.
- MacAvoy S.E., Macko S.A. and Arneson L.S. (2005). Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Can J Zool* 83(5): 631-641.
- Macko S.A., Estep M.L.F., Engel M.H. and Hare P.E. (1986). Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino-acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta* 50(10): 2143-2146.
- MacNeil M.A., Drouillard K.G. and Fisk A.T. (2006). Variable uptake and elimination of stable nitrogen isotopes between tissues in fish. *Can J Fish Aquat Sci* 63(2): 345-353.
- Maes B.D., Ghos Y.F., Geypens B.J., Hiele M.I. and Rutgeerts P.J. (1995). Relation between gastric emptying rate and energy intake in children compared with adults. *Gut* 36(2): 183-8.
- Mahe S., Fauquant J., Gaudichon C., Roos N., Maubois J.L. and Tome D. (1994). [¹⁵N] labelling and preparation of milk, casein and whey proteins. *Le Lait* 74(4): 307-12.
- Mahe S., Huneau J.F., Marteau P., Thuillier F. and Tome D. (1992). Gastroileal nitrogen and electrolyte movements after bovine milk ingestion in humans. *Am J Clin Nutr* 56(2): 410-6.
- Manders R.J., Koopman R., Beelen M., Gijzen A.P., Wodzig W.K., Saris W.H., et al. (2008). The muscle protein synthetic response to carbohydrate and protein ingestion is not impaired in men with longstanding type 2 diabetes. *J Nutr* 138(6): 1079-85.
- Mariotti F., Mahe S., Benamouzig R., Luengo C., Dare S., Gaudichon C., et al. (1999). Nutritional value of [¹⁵N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. *J Nutr* 129(11): 1992-7.
- Mariotti F., Mahe S., Luengo C., Benamouzig R. and Tome D. (2000). Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen utilization by carbohydrates in humans. *Am J Clin Nutr* 72(4): 954-62.

- Mariotti F., Pueyo M.E., Tome D., Benamouzig R. and Mahe S. (2001a). Guar gum does not impair the absorption and utilization of dietary nitrogen but affects early endogenous urea kinetics in humans. *Am J Clin Nutr* 74(4): 487-93.
- Mariotti F., Pueyo M.E., Tome D., Berot S., Benamouzig R. and Mahe S. (2001b). The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. *J Nutr* 131: 1706-13.
- Marliss E.B. and Gougeon R. (2002). Diabetes mellitus, lipidus et. proteinus! *Diabetes Care* 25(8): 1474-6.
- Martinez del Rio C. and Wolf B.O. (2005). Mass-balance models for animal isotopic ecology. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. J. M. Starck and T. Wang, Science Publishers, Inc.: 141-174.
- Martinez del Rio C., Wolf N., Carleton S.A. and Gannes L.Z. (2009). Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews* 84(1): 91-111.
- Martinez J.A., Goena M., Santidrian S. and Larralde J. (1987). Response of muscle, liver and whole-body protein turnover to two different sources of protein in growing rats. *Ann Nutr Metab* 31(3): 146-53.
- Masanés R., Fernández-López J.A., Alemany M., Remesar X. and Rafecas I. (1999). Effect of dietary protein content on tissue protein synthesis rates in Zucker lean rats. *Nutr Res* 19(7): 1017-1026.
- Matthews D.E., Marano M.A. and Campbell R.G. (1993a). Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamic acid in humans. *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): E848-54.
- Matthews D.E., Marano M.A. and Campbell R.G. (1993b). Splanchnic bed utilization of leucine and phenylalanine in humans. *Am J Physiol* 264(1 Pt 1): E109-18.
- Matthews D.E., Motil K.J., Rohrbach D.K., Burke J.F., Young V.R. and Bier D.M. (1980). Measurement of leucine metabolism in man from a primed, continuous infusion of L-[1-³C]leucine. *Am J Physiol* 238(5): E473-9.
- McClelland I.S. and Jackson A.A. (1996). Urea kinetics in healthy young women: minimal effect of stage of menstrual cycle, contraceptive pill and protein intake. *Br J Nutr* 76(2): 199-209.
- McClelland I.S.M., Persaud C. and Jackson A.A. (2007). Urea kinetics in healthy women during normal pregnancy. *Br J Nutr* 77(02): 165.
- McCue M.D. and Pollock E.D. (2008). Stable isotopes may provide evidence for starvation in reptiles. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22(15): 2307-14.
- McIntyre P.B. and Flecker A.S. (2006). Rapid turnover of tissue nitrogen of primary consumers in tropical freshwaters. *Oecologia* 148(1): 12-21.
- McNurlan M.A., Essen P., Heys S.D., Buchan V., Garlick P.J. and Wernerman J. (1991). Measurement of protein synthesis in human skeletal muscle: further investigation of the flooding technique. *Clin Sci (Lond)* 81(4): 557-64.
- McNurlan M.A., Essen P., Milne E., Vinnars E., Garlick P.J. and Wernerman J. (1993). Temporal responses of protein synthesis in human skeletal muscle to feeding. *Br J Nutr* 69(1): 117-26.
- McNurlan M.A., Essen P., Thorell A., Calder A.G., Anderson S.E., Ljungqvist O., et al. (1994). Response of protein synthesis in human skeletal muscle to insulin: an investigation with L-[²H₃]phenylalanine. *Am J Physiol* 267(1 Pt 1): E102-8.
- McNurlan M.A., Fern E.B. and Garlick P.J. (1982). Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo. *Biochem J* 204(3): 831-8.
- McNurlan M.A. and Garlick P.J. (1980). Contribution of rat liver and gastrointestinal tract to whole-body protein synthesis in the rat. *Biochem J* 186(1): 381-3.
- McNurlan M.A. and Garlick P.J. (1981). Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes. *Am J Physiol* 241(3): E238-45.
- McNurlan M.A. and Garlick P.J. (1989). Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetes Metab Rev* 5(2): 165-89.
- McNurlan M.A., Tomkins A.M. and Garlick P.J. (1979). The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochem J* 178(2): 373-9.

- Meakins T.S. and Jackson A.A. (1996). Salvage of exogenous urea nitrogen enhances nitrogen balance in normal men consuming marginally inadequate protein diets. *Clin Sci (Lond)* 90(3): 215-25.
- Meakins T.S., Persaud C. and Jackson A.A. (1998). Dietary supplementation with L-methionine impairs the utilization of urea-nitrogen and increases 5-L-oxoprolinuria in normal women consuming a low protein diet. *J Nutr* 128(4): 720-7.
- Medina R. and Schmidt H.-L. (1982). Nitrogen isotope ratio variations in biological material, indicator for metabolic considerations? *Stable isotopes*. H.-L. Schmidt, H. Förstel and H. Keinoingen. Amsterdam, Elsevier: 465-473.
- Meek S.E., Persson M., Ford G.C. and Nair K.S. (1998). Differential regulation of amino acid exchange and protein dynamics across splanchnic and skeletal muscle beds by insulin in healthy human subjects. *Diabetes* 47(12): 1824-35.
- Meguid M.M., Collier M.D. and Howard L.J. (1981). Uncomplicated and stressed starvation. *Surg Clin North Am* 61(3): 529-43.
- Mekota A.M., Grupe G., Ufer S. and Cuntz U. (2006). Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(10): 1604-10.
- Melville S., McNurlan M.A., McHardy K.C., Broom J., Milne E., Calder A.G., *et al.* (1989). The role of degradation in the acute control of protein balance in adult man: failure of feeding to stimulate protein synthesis as assessed by L-[1-13C]leucin infusion. *Metabolism* 38(3): 248-55.
- Mercier S., Breuille D., Mosoni L., Obled C. and Patureau Mirand P. (2002). Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J Nutr* 132(7): 1921-8.
- Metges C.C. (2000). Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr* 130(7): 1857S-64S.
- Metges C.C., El-Khoury A.E., Henneman L., Petzke K.J., Grant I., Bedri S., *et al.* (1999a). Availability of intestinal microbial lysine for whole body lysine homeostasis in human subjects. *Am J Physiol* 277(4 Pt 1): E597-607.
- Metges C.C., Petzke K.J., El-Khoury A.E., Henneman L., Grant I., Bedri S., *et al.* (1999b). Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *Am J Clin Nutr* 70(6): 1046-58.
- Miller D.S. and Bender A.E. (1955). The determination of the net utilization of proteins by a shortened method. *Br J Nutr* 9(4): 382-8.
- Miller J.F., Millar J.S. and Longstaffe F.J. (2008). Carbon- and nitrogen-isotope tissue–diet discrimination and turnover rates in deer mice, *Peromyscus maniculatus*. *Can J Zool* 86(7): 685-691.
- Millward D.J. (1979). Protein deficiency, starvation and protein metabolism. *Proc Nutr Soc* 38(1): 77-88.
- Millward D.J. (2000). Postprandial protein utilization: implications for clinical nutrition. *Proteins, peptides and amino acids in enteral nutrition*. P. Fürst and V. R. Young, Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme. 3: 135-52.
- Millward D.J., Forrester T., Ah-Sing E., Yeboah N., Gibson N., Badaloo A., *et al.* (2000). The transfer of ¹⁵N from urea to lysine in the human infant. *Br J Nutr* 83(5): 505-12.
- Millward D.J., Garlick P.J., Nnanyelugo D.O. and Waterlow J.C. (1976). The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *Biochem J* 156(1): 185-8.
- Millward D.J., Garlick P.J., Stewart R.J., Nnanyelugo D.O. and Waterlow J.C. (1975). Skeletal-muscle growth and protein turnover. *Biochem J* 150(2): 235-43.
- Millward D.J., Layman D.K., Tome D. and Schaafsma G. (2008). Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. *Am J Clin Nutr* 87(5): 1576S-1581S.
- Millward D.J., Odedra B. and Bates P.C. (1983). The role of insulin, corticosterone and other factors in the acute recovery of muscle protein synthesis on refeeding food-deprived rats. *Biochem J* 216(3): 583-7.

- Minagawa M. and Wada E. (1984). Stepwise enrichment of ^{15}N along food-chains - further evidence and relation between delta- N-^{15} and animal age. *Geochim Cosmochim Acta* 48(5): 1135-1140.
- Miron M L.L., Herrera M L.G., Ramirez P N. and Hobson K.A. (2006). Effect of diet quality on carbon and nitrogen turnover and isotopic discrimination in blood of a New World nectarivorous bat. *J Exp Biol* 209(3): 541-548.
- Mitchell H.H. (1924). The biological value of proteins at different levels of intake. *J Biol Chem* 58(3): 905-922.
- Mokady S., Vila S. and Zimmermann G. (1969). A new biological method for estimating food protein nutritive value. *Br J Nutr* 23(03): 491-495.
- Monson K.D. and Hayes J.M. (1980). Biosynthetic control of the natural abundance of carbon 13 at specific positions within fatty acids in *Escherichia coli*. Evidence regarding the coupling of fatty acid and phospholipid synthesis. *J Biol Chem* 255(23): 11435-41.
- Moran B.J. and Jackson A.A. (1990). Metabolism of ^{15}N -labelled urea in the functioning and defunctioned human colon. *Clin Sci (Colch)* 79(3): 253-8.
- Morens C., Bos C., Pueyo M.E., Benamouzig R., Gausseres N., Luengo C., et al. (2003). Increasing habitual protein intake accentuates differences in postprandial dietary nitrogen utilization between protein sources in humans. *J Nutr* 133(9): 2733-2740.
- Morens C., Gaudichon C., Fromentin G., Marsset-Baglieri A., Bensaid A., Larue-Achagiots C., et al. (2001). Daily delivery of dietary nitrogen to the periphery is stable in rats adapted to increased protein intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(4): E826-36.
- Morens C., Gaudichon C., Metges C.C., Fromentin G., Baglieri A., Even P.C., et al. (2000). A high-protein meal exceeds anabolic and catabolic capacities in rats adapted to a normal protein diet. *J Nutr* 130(9): 2312-21.
- Morgan E.H. and Peters T., Jr. (1971). The biosynthesis of rat serum albumin. V. Effect of protein depletion and refeeding on albumin and transferrin synthesis. *J Biol Chem* 246(11): 3500-7.
- Mortimore G.E., Poso A.R., Kadowaki M. and Wert J.J., Jr. (1987). Multiphasic control of hepatic protein degradation by regulatory amino acids. General features and hormonal modulation. *J Biol Chem* 262(34): 16322-7.
- Mortimore G.E., Woodside K.H. and Henry J.E. (1972). Compartmentation of free valine and its relation to protein turnover in perfused rat liver. *J Biol Chem* 247(9): 2776-84.
- Mosoni L., Houlier M.L., Patureau-Mirand P., Bayle G. and Grizard J. (1993). Effect of amino acids alone or with insulin on muscle and liver protein synthesis in adult and old rats. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1): E614-20.
- Mosoni L., Malmezat T., Valluy M.C., Houlier M.L. and Mirand P.P. (1996). Muscle and liver protein synthesis adapt efficiently to food deprivation and refeeding in 12-month-old rats. *J Nutr* 126(2): 516-22.
- Mosoni L., Valluy M.C., Serrurier B., Prugnaud J., Obled C., Guezennec C.Y., et al. (1995). Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol* 268(2 Pt 1): E328-35.
- Motil K.J., Matthews D.E., Bier D.M., Burke J.F., Munro H.N. and Young V.R. (1981). Whole-body leucine and lysine metabolism: response to dietary protein intake in young men. *Am J Physiol* 240(6): E712-21.
- Munro H.N. (1964). General aspects of the regulation of protein metabolism by diet and by hormones. *Mammalian Protein Metabolism*. H. N. Munro and J. B. Allison. New York, NY, USA, Academic Press. 1: 381-481.
- Nagasawa T., Kido T., Yoshizawa F., Ito Y. and Nishizawa N. (2002). Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *J Nutr Biochem* 13(2): 121-127.
- Nair K.S., Ford G.C., Ekberg K., Fernqvist-Forbes E. and Wahren J. (1995). Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type I diabetic patients. *J Clin Invest* 95(6): 2926-37.
- Newgard C.B., An J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Stevens R.D., Lien L.F., et al. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* 9(4): 311-26.

- Nissen S. and Haymond M.W. (1986). Changes in leucine kinetics during meal absorption: effects of dietary leucine availability. *Am J Physiol* 250(6 Pt 1): E695-701.
- O'Brien D.M., Kristal A.R., Jeannet M.A., Wilkinson M.J., Bersamin A. and Luick B. (2009). Red blood cell delta¹⁵N: a novel biomarker of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid intake. *Am J Clin Nutr* 89(3): 913-9.
- O'Grady S.P., Wende A.R., Remien C.H., Valenzuela L.O., Enright L.E., Chesson L.A., *et al.* (2010). Aberrant water homeostasis detected by stable isotope analysis. *PLoS One* 5(7): e11699.
- Obled C. and Arnal M. (1992). Contribution of skin to whole-body protein synthesis in rats at different stages of maturity. *J Nutr* 122(11): 2167-73.
- Obled C., Papet I. and Breuille D. (2002). Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(2): 189-97.
- Ogden L.J.E., Hobson K.A. and Lank D.B. (2004). Blood isotopic (delta C-13 and delta N-15) turnover and diet-tissue fractionation factors in captive Dunlin (*Calidris alpina pacifica*). *Auk* 121(1): 170-177.
- Oppel S. and Powell A.N. (2010). Carbon isotope turnover in blood as a measure of arrival time in migratory birds using isotopically distinct environments. *J Ornithol* 151(1): 123-131.
- Pacy P.J., Nair K.S., Ford C. and Halliday D. (1989). Failure of insulin infusion to stimulate fractional muscle protein synthesis in type I diabetic patients. Anabolic effect of insulin and decreased proteolysis. *Diabetes* 38(5): 618-24.
- Pacy P.J., Price G.M., Halliday D., Quevedo M.R. and Millward D.J. (1994). Nitrogen homeostasis in man: the diurnal responses of protein synthesis and degradation and amino acid oxidation to diets with increasing protein intakes. *Clin Sci (Colch)* 86(1): 103-16.
- Pain V.M., Clemens M.J. and Garlick P.J. (1978). The effect of dietary protein deficiency on albumin synthesis and on the concentration of active albumin messenger ribonucleic acid in rat liver. *Biochem J* 172(1): 129-35.
- Papet I., Dardevet D., Sornet C., Bechereau F., Prugnaud J., Pouyet C., *et al.* (2003). Acute phase protein levels and thymus, spleen and plasma protein synthesis rates differ in adult and old rats. *J Nutr* 133(1): 215-9.
- Parker K.L., Barboza P.S. and Stephenson T.R. (2005). Protein conservation in female caribou (*Rangifer tarandus*): Effects of decreasing diet quality during winter. *J Mammal* 86(3): 610-622.
- Patterson B.W., Horowitz J.F., Wu G., Watford M., Coppack S.W. and Klein S. (2002). Regional muscle and adipose tissue amino acid metabolism in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4): E931-6.
- Pearson S.F., Levey D.J., Greenberg C.H. and Martinez Del Rio C. (2003). Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* 135(4): 516-23.
- Pennings B., Boirie Y., Senden J.M., Gijsen A.P., Kuipers H. and van Loon L.J. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr* 93(5): 997-1005.
- Peraino C., Rogers Q.R., Yoshida M., Chen M.L. and Harper A.E. (1959). Observations on protein digestion in vivo. II. Dietary factors affecting the rate of disappearance of casein from the gastrointestinal tract. *Can J Biochem Physiol* 37: 1475-91.
- Pereira S., Marliss E.B., Morais J.A., Chevalier S. and Gougeon R. (2008). Insulin resistance of protein metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* 57(1): 56-63.
- Pettigrew J.E., Gill M., France J. and Close W.H. (1992). A mathematical integration of energy and amino acid metabolism of lactating sows. *J Anim Sci* 70(12): 3742-61.
- Petzke K.J., Boeing H., Klaus S. and Metges C.C. (2005a). Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *J Nutr* 135(6): 1515-20.
- Petzke K.J., Boeing H. and Metges C.C. (2005b). Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein ¹³C and ¹⁵N abundance. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(11): 1392-400.

- Petzke K.J., Feist T., Fleig W.E. and Metges C.C. (2006). Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20(19): 2973-8.
- Petzke K.J., Fuller B.T. and Metges C.C. (2010). Advances in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(5): 532-540.
- Petzke K.J. and Lemke S. (2009). Hair protein and amino acid ^{13}C and ^{15}N abundances take more than 4 weeks to clearly prove influences of animal protein intake in young women with a habitual daily protein consumption of more than 1 g per kg body weight. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(16): 2411-20.
- Phillips D.L. and Eldridge P.M. (2006). Estimating the timing of diet shifts using stable isotopes. *Oecologia* 147(2): 195-203.
- Phromphetcharat V., Jackson A., Dass P.D. and Welbourne T.C. (1981). Ammonia partitioning between glutamine and urea: interorgan participation in metabolic acidosis. *Kidney Int* 20(5): 598-605.
- Podlesak D.W. and McWilliams S.R. (2006). Metabolic routing of dietary nutrients in birds: effects of diet quality and macronutrient composition revealed using stable isotopes. *Physiol Biochem Zool* 79(3): 534-49.
- Pomposelli J.J., Palombo J.D., Hamawy K.J., Bistrrian B.R., Blackburn G.L. and Moldawer L.L. (1985). Comparison of different techniques for estimating rates of protein synthesis in vivo in healthy and bacteriaemic rats. *Biochem J* 226(1): 37-42.
- Ponsard S. and Averbuch P. (1999). Should growing and adult animals fed on the same diet show different $\delta^{15}\text{N}$ values? *Rapid Commun Mass Spectrom* 13(13): 1305-10.
- Post D.M. (2002). Using stable isotopes to estimate trophic position: Models, methods, and assumptions. *Ecology* 83(3): 703-718.
- Preedy V.R. and Garlick P.J. (1983). Protein synthesis in skeletal muscle of the perfused rat hemicorpus compared with rates in the intact animal. *Biochem J* 214(2): 433-42.
- Preedy V.R., McNurlan M.A. and Garlick P.J. (1983). Protein synthesis in skin and bone of the young rat. *Br J Nutr* 49(3): 517-23.
- Preedy V.R., Paska L., Sugden P.H., Schofield P.S. and Sugden M.C. (1988). The effects of surgical stress and short-term fasting on protein synthesis in vivo in diverse tissues of the mature rat. *Biochem J* 250(1): 179-88.
- Price G.M., Halliday D., Pacy P.J., Quevedo M.R. and Millward D.J. (1994). Nitrogen homeostasis in man: influence of protein intake on the amplitude of diurnal cycling of body nitrogen. *Clin Sci (Lond)* 86(1): 91-102.
- Quevedo M.R., Price G.M., Halliday D., Pacy P.J. and Millward D.J. (1994). Nitrogen homeostasis in man: diurnal changes in nitrogen excretion, leucine oxidation and whole body leucine kinetics during a reduction from a high to a moderate protein intake. *Clin Sci (Colch)* 86(2): 185-93.
- Rand W.M., Pellett P.L. and Young V.R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 77(1): 109-27.
- Rattigan S., Bussey C.T., Ross R.M. and Richards S.M. (2007). Obesity, insulin resistance, and capillary recruitment. *Microcirculation* 14(4-5): 299-309.
- Reeds P.J., Burrin D.G., Davis T.A. and Fiorotto M.L. (1993). Postnatal growth of gut and muscle: competitors or collaborators. *Proc Nutr Soc* 52(1): 57-67.
- Reeds P.J., Palmer R.M., Hay S.M. and McMillan D.N. (1986). Protein synthesis in skeletal muscle measured at different times during a 24 hour period. *Biosci Rep* 6(2): 209-13.
- Reich K.J., Bjorndal K.A. and Martinez Del Rio C. (2008). Effects of growth and tissue type on the kinetics of ^{13}C and ^{15}N incorporation in a rapidly growing ectotherm. *Oecologia* 155(4): 651-63.
- Remesy C., Moundras C., Morand C. and Demigne C. (1997). Glutamine or glutamate release by the liver constitutes a major mechanism for nitrogen salvage. *Am J Physiol* 272(2 Pt 1): G257-64.
- Remond D., Buffiere C., Pouyet C., Papet I., Dardevet D., Savary-Auzeloux I., et al. (2011). Cysteine fluxes across the portal-drained viscera of enterally fed minipigs: effect of an acute intestinal inflammation. *Amino Acids* 40(2): 543-52.

- Rennie M.J., Edwards R.H., Halliday D., Matthews D.E., Wolman S.L. and Millward D.J. (1982). Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in man: the effects of feeding and fasting. *Clin Sci* 63(6): 519-23.
- Rennie M.J., Smith K. and Watt P.W. (1994). Measurement of human tissue protein synthesis: an optimal approach. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): E298-307.
- Rerat A., Simoes-Nunes C., Mendy F., Vaissade P. and Vaugelade P. (1992). Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *Br J Nutr* 68(1): 111-38.
- Rieu I., Balage M., Sornet C., Debras E., Ripes S., Rochon-Bonhomme C., et al. (2007). Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition* 23(4): 323-31.
- Rivest J., Bernier J.F. and Pomar C. (2000). A dynamic model of protein digestion in the small intestine of pigs. *J Anim Sci* 78(2): 328-40.
- Robbins C.T., Felicetti L.A. and Florin S.T. (2009). The impact of protein quality on stable nitrogen isotope ratio discrimination and assimilated diet estimation. *Oecologia* 162(3): 571-579.
- Robbins C.T., Felicetti L.A. and Sponheimer M. (2005). The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* 144(4): 534-40.
- Rooyackers O.E. and Nair K.S. (1997). Hormonal regulation of human muscle protein metabolism. *Annu Rev Nutr* 17: 457-85.
- Roth J.D. and Hobson K.A. (2000). Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Can J Zool* 78: 848-852.
- Ruot B., Bechereau F., Bayle G., Breuille D. and Obled C. (2002). The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process. *Clin Sci (Lond)* 102(1): 107-14.
- Russell K., Lobley G.E., Rawlings J., Millward D.J. and Harper E.J. (2000). Urea kinetics of a carnivore, *Felis silvestris catus*. *Br J Nutr* 84(5): 597-604.
- Samuels S.E. and Attaix D. (2000). Fasting does not increase mRNA levels of proteolytic systems in small intestinal mucosa of the rat. *J Nutr Biochem* 11(10): 496-9.
- Samuels S.E., Taillandier D., Aourousseau E., Cherel Y., Le Maho Y., Arnal M., et al. (1996). Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): E232-8.
- Sare D.T.J., Millar J.S. and Longstaffe F.J. (2005). Tracing dietary protein in red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*) using stable isotopes of nitrogen and carbon. *Can J Zool* 83(5): 717-725.
- Sarwar G. (1997). The protein digestibility-corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. *J Nutr* 127(5): 758-64.
- Schaart M.W., Schierbeek H., van der Schoor S.R., Stoll B., Burrin D.G., Reeds P.J., et al. (2005). Threonine utilization is high in the intestine of piglets. *J Nutr* 135(4): 765-70.
- Schadereit R., Klein M. and Krawielitzki K. (1999). Whole body protein turnover of growing rats in response to different dietary proteins--soy protein or casein. *Arch Tierernahr* 52(4): 311-21.
- Schimke R.T. (1962). Differential effects of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J Biol Chem* 237: 1921-4.
- Schoeller D.A. (1999). Isotope fractionation: Why aren't we what we eat? *J Archaeol Sci* 26(6): 667-673.
- Scornik O.A., Howell S.K. and Botbol E. (1997). Protein depletion and replenishment in mice: different roles of muscle and liver. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1): E1158-67.
- Sears J., Hatch S.A. and O'Brien D.M. (2009). Disentangling effects of growth and nutritional status on seabird stable isotope ratios. *Oecologia* 159(1): 41-8.
- Seila A.C., Okuda K., Nunez S., Seila A.F. and Strobel S.A. (2005). Kinetic isotope effect analysis of the ribosomal peptidyl transferase reaction. *Biochemistry* 44(10): 4018-27.

- Shah O.J., Antonetti D.A., Kimball S.R. and Jefferson L.S. (1999). Leucine, glutamine, and tyrosine reciprocally modulate the translation initiation factors eIF4F and eIF2B in perfused rat liver. *J Biol Chem* 274(51): 36168-75.
- Shaham O., Wei R., Wang T.J., Ricciardi C., Lewis G.D., Vasan R.S., *et al.* (2008). Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Mol Syst Biol* 4: 214.
- She P., Van Horn C., Reid T., Hutson S.M., Cooney R.N. and Lynch C.J. (2007). Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(6): E1552-63.
- Sheffield-Moore M., Wolfe R.R., Gore D.C., Wolf S.E., Ferrer D.M. and Ferrando A.A. (2000). Combined effects of hyperaminoacidemia and oxandrolone on skeletal muscle protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278(2): E273-9.
- Sick H., Roos N., Saggau E., Haas K., Meyn V., Walch B., *et al.* (1997). Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. *Z Ernahrungswiss* 36(4): 340-6.
- Sidransky H. and Verney E. (1965). Chemical pathology of acute amino acids deficiency. VIII. Influence of amino acid intake on the morphologic and biochemical changes in young rats force-fed a threonine-devoid diet. *J Nutr* 86: 73-80.
- Silfer J.A., Engel M.H. and Macko S.A. (1992). Kinetic fractionation of stable carbon and nitrogen isotopes during peptide-bond hydrolysis - experimental-evidence and geochemical implications. *Chemical Geology* 101(3-4): 211-221.
- Smith C.B. and Sun Y. (1995). Influence of valine flooding on channeling of valine into tissue pools and on protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268(4 Pt 1): E735-44.
- Smith K., Barua J.M., Watt P.W., Scrimgeour C.M. and Rennie M.J. (1992). Flooding with L-[1-¹³C]leucine stimulates human muscle protein incorporation of continuously infused L-[1-¹³C]valine. *Am J Physiol* 262(3 Pt 1): E372-6.
- Smith K., Reynolds N., Downie S., Patel A. and Rennie M.J. (1998). Effects of flooding amino acids on incorporation of labeled amino acids into human muscle protein. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): E73-8.
- Solini A., Bonora E., Bonadonna R., Castellino P. and DeFronzo R.A. (1997). Protein metabolism in human obesity: relationship with glucose and lipid metabolism and with visceral adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 82(8): 2552-8.
- Sotelo-Lopez A. and Lucas-Florentino B. (1978). Determination of Net Protein Utilization Using Whole Carcass, Hind Leg or Liver of the Rat and its Relationship with Protein Efficiency Ratio Determination. *J Nutr* 108(1): 61-66.
- Souffrant W.B., Rerat A., Laplace J.P., Darcy-Vrillon B., Kohler R., Corring T., *et al.* (1993). Exogenous and endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. III. Recycling of endogenous nitrogen. *Reprod Nutr Dev* 33(4): 373-82.
- Sponheimer M., Robinson T.F., Roeder B.L., Passey B.H., Ayliffe L.K., Cerling T.E., *et al.* (2003). An experimental study of nitrogen flux in llamas: is ¹⁴N preferentially excreted? *J Archaeol Sci* 30(12): 1649-1655.
- Staten M.A., Matthews D.E. and Bier D.M. (1986). Leucine metabolism in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 35(11): 1249-53.
- Steele K.W. and Daniel R.M. (1978). Fractionation of nitrogen isotopes by animals - a further complication to use of variations in natural abundance of n-¹⁵ for tracer studies. *J Agric Sci* 90(FEB): 7-9.
- Stoll B., Burrin D.G., Henry J., Jahoor F. and Reeds P.J. (1997). Phenylalanine utilization by the gut and liver measured with intravenous and intragastric tracers in pigs. *Am J Physiol* 273(6 Pt 1): G1208-17.
- Stoll B., Burrin D.G., Henry J., Yu H., Jahoor F. and Reeds P.J. (1998a). Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets. *J Nutr* 128(9): 1517-24.

- Stoll B., Burrin D.G., Henry J.F., Jahoor F. and Reeds P.J. (1999). Dietary and systemic phenylalanine utilization for mucosal and hepatic constitutive protein synthesis in pigs. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1): G49-57.
- Stoll B., Henry J., Reeds P.J., Yu H., Jahoor F. and Burrin D.G. (1998b). Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* 128(3): 606-14.
- Sutoh M., Koyama T. and Yoneyama T. (1987). Variations of natural nitrogen-15 abundances in the tissues and digesta of domestic animals. *Radioisotopes* 36(2): 74-77.
- Sutoh M., Obara Y. and Yoneyama T. (1993). The effects of feeding regimen and dietary sucrose supplementation on natural abundance of n-15 in some components of ruminal fluid and plasma of sheep. *J Anim Sci* 71(1): 226-231.
- Taillandier D., Guezennec C.Y., Patureau-Mirand P., Bigard X., Arnal M. and Attaix D. (1996). A high protein diet does not improve protein synthesis in the nonweight-bearing rat tibialis anterior muscle. *J Nutr* 126(1): 266-72.
- Tarboush R.A., MacAvoy S.E., Macko S.A. and Connaughton V. (2006). Contribution of catabolic tissue replacement to the turnover of stable isotopes in *Danio rerio*. *Can J Zool* 84(10): 1453-1460.
- Tessari P. (2000). Regulation of splanchnic protein synthesis by enteral feeding. *Proteins, peptides and amino acids in enteral nutrition*. P. Fürst and V. R. Young, Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme. 3: 47-58; discussion 58-61.
- Tessari P., Barazzoni R., Zanetti M., Kiwanuka E. and Tiengo A. (1996a). The role of substrates in the regulation of protein metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10(4): 511-32.
- Tessari P., Cecchet D., Cosma A., Puricelli L., Millioni R., Vedovato M., et al. (2011). Insulin resistance of amino acid and protein metabolism in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 30(3): 267-72.
- Tessari P., Coracina A., Kiwanuka E., Vedovato M., Vettore M., Valerio A., et al. (2005). Effects of insulin on methionine and homocysteine kinetics in type 2 diabetes with nephropathy. *Diabetes* 54(10): 2968-76.
- Tessari P. and Garibotto G. (2000). Interorgan amino acid exchange. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3(1): 51-7.
- Tessari P., Garibotto G., Inchiostro S., Robaudo C., Saffioti S., Vettore M., et al. (1996b). Kidney, splanchnic, and leg protein turnover in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. *J Clin Invest* 98(6): 1481-92.
- Tessari P., Inchiostro S., Biolo G., Vincenti E. and Sabaadin L. (1991). Effects of acute systemic hyperinsulinemia on forearm muscle proteolysis in healthy man. *J Clin Invest* 88(1): 27-33.
- Tessari P., Inchiostro S., Zanetti M. and Barazzoni R. (1995). A model of skeletal muscle leucine kinetics measured across the human forearm. *Am J Physiol* 269(1 Pt 1): E127-36.
- Thompson G.N., Pacy P.J., Merritt H., Ford G.C., Read M.A., Cheng K.N., et al. (1989). Rapid measurement of whole body and forearm protein turnover using a [2H5]phenylalanine model. *Am J Physiol* 256(5 Pt 1): E631-9.
- Tieszen L.L., Boutton T.W., Tesdahl K.G. and Slade N.A. (1983). Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues - implications for delta-C-13 analysis of diet. *Oecologia* 57(1-2): 32-37.
- Timmerman K.L., Lee J.L., Dreyer H.C., Dhanani S., Glynn E.L., Fry C.S., et al. (2010). Insulin stimulates human skeletal muscle protein synthesis via an indirect mechanism involving endothelial-dependent vasodilation and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling. *J Clin Endocrinol Metab* 95(8): 3848-57.
- Tipton K.D., Ferrando A.A., Phillips S.M., Doyle D., Jr. and Wolfe R.R. (1999). Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *Am J Physiol* 276(4 Pt 1): E628-34.
- Toffolo G., Albright R., Joyner M., Dietz N., Cobelli C. and Nair K.S. (2003). Model to assess muscle protein turnover: domain of validity using amino acyl-tRNA vs. surrogate measures of precursor pool. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(5): E1142-9.
- Tome D. (2012). Criteria and markers for protein quality assessment - a review. *Br J Nutr* 108 Suppl 2: S222-9.

- Tome D. and Bos C. (2007). Lysine requirement through the human life cycle. *J Nutr* 137(6 Suppl 2): 1642S-1645S.
- Torrallardona D., Harris C.I., Coates M.E. and Fuller M.F. (1996). Microbial amino acid synthesis and utilization in rats: incorporation of ^{15}N from $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ into lysine in the tissues of germ-free and conventional rats. *Br J Nutr* 76(5): 689-700.
- Torrallardona D., Harris C.I. and Fuller M.F. (2003a). Lysine synthesized by the gastrointestinal microflora of pigs is absorbed, mostly in the small intestine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(6): E1177-80.
- Torrallardona D., Harris C.I. and Fuller M.F. (2003b). Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. *J Nutr* 133(4): 1127-31.
- Trueman C.N., McGill R.A. and Guyard P.H. (2005). The effect of growth rate on tissue-diet isotopic spacing in rapidly growing animals. An experimental study with Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Rapid Commun Mass Spectrom* 19(22): 3239-47.
- Tsahar E., Wolf N., Izhaki I., Arad Z. and Del Rio C.M. (2008). Dietary protein influences the rate of ^{15}N incorporation in blood cells and plasma of Yellow-vented bulbuls (*Pycnonotus xanthopygos*). *J Exp Biol* 211(Pt 3): 459-65.
- Twombly J. and Meyer J.H. (1961). Endogenous Nitrogen Secretions into the Digestive Tract. *J Nutr* 74(4): 453-460.
- Vander Zanden M.J. and Rasmussen J.B. (2001). Variation in delta N-15 and delta C-13 trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography* 46(8): 2061-2066.
- Vanderklift M.A. and Ponsard S. (2003). Sources of variation in consumer-diet delta ^{15}N enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 136(2): 169-82.
- Vidrich A., Airhart J., Bruno M.K. and Khairallah E.A. (1977). Compartmentation of free amino acids for protein biosynthesis. Influence of diurnal changes in hepatic amino acid concentrations of the composition of the precursor pool charging aminoacyl-transfer ribonucleic acid. *Biochem J* 162(2): 257-66.
- Volpi E., Ferrando A.A., Yeckel C.W., Tipton K.D. and Wolfe R.R. (1998). Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J Clin Invest* 101(9): 2000-7.
- Volpi E., Lucidi P., Cruciani G., Monacchia F., Reboldi G., Brunetti P., et al. (1996). Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. *Diabetes* 45(9): 1245-52.
- Volpi E., Mittendorfer B., Wolf S.E. and Wolfe R.R. (1999). Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol* 277(3 Pt 1): E513-E520.
- Wagenmakers A.J. (1999). Tracers to investigate protein and amino acid metabolism in human subjects. *Proc Nutr Soc* 58(4): 987-1000.
- Wahren J., Felig P. and Hagenfeldt L. (1976). Effect of protein ingestion on splanchnic and leg metabolism in normal man and in patients with diabetes mellitus. *J Clin Invest* 57(4): 987-99.
- Wallin G. and Aqvist J. The transition state for peptide bond formation reveals the ribosome as a water trap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(5): 1888-1893.
- Wallis M.G., Wheatley C.M., Rattigan S., Barrett E.J., Clark A.D. and Clark M.G. (2002). Insulin-mediated hemodynamic changes are impaired in muscle of Zucker obese rats. *Diabetes* 51(12): 3492-8.
- Waterlow J.C. (1999). The mysteries of nitrogen balance. *Nutr Res Rev* 12: 25-54.
- Waterlow J.C. (2006). Protein turnover. Wallingford UK, Cabi.
- Waterlow J.C., Garlick P.J. and Millward D.J. (1978). Protein Turnover in Mammalian Tissues and in the Whole Body. Amsterdam, North-Holland.
- Watt P.W., Lindsay Y., Scrimgeour C.M., Chien P.A., Gibson J.N., Taylor D.J., et al. (1991). Isolation of aminoacyl-tRNA and its labeling with stable-isotope tracers: Use in studies of human tissue protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13): 5892-6.
- Wattiaux M.A. and Reed J.D. (1995). Fractionation of nitrogen isotopes by mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci* 73(1): 257-66.

- Webb S.C., Hedges R.E.M. and Simpson S.J. (1998). Diet quality influences the delta C-13 and delta N-15 of locusts and their biochemical components. *J Exp Biol* 201(20): 2903-2911.
- Weiss P.M., Chen C.Y., Cleland W.W. and Cook P.F. (1988). Use of primary deuterium and N-15 isotope effects to deduce the relative rates of steps in the mechanisms of alanine and glutamate-dehydrogenases. *Biochemistry* 27(13): 4814-4822.
- Werner R.A. and Schmidt H.L. (2002). The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry* 61(5): 465-484.
- White C.D. and Armelagos G.J. (1997). Osteopenia and stable isotope ratios in bone collagen of Nubian female mummies. *Am J Phys Anthropol* 103(2): 185-199.
- Wijekoon E.P., Skinner C., Brosnan M.E. and Brosnan J.T. (2004). Amino acid metabolism in the Zucker diabetic fatty rat: effects of insulin resistance and of type 2 diabetes. *Can J Physiol Pharmacol* 82(7): 506-14.
- Williams C.T., Buck C.L., Sears J. and Kitaysky A.S. (2007). Effects of nutritional restriction on nitrogen and carbon stable isotopes in growing seabirds. *Oecologia* 153(1): 11-8.
- Wolf N., Carleton S.A. and del Rio C.M. (2009). Ten years of experimental animal isotopic ecology. *Funct Ecol* 23(1): 17-26.
- Wolfe R.R. and Chinkes D.L. (2005). Isotope tracers in metabolic research: principles and practice of kinetic analysis, Hoboken, Wiley-Liss.
- Wolpert E., Hofmann A.F. and Summerskill W.H. (1971). Synthesis and metabolism of labeled acetohydroxamic acid, a urease inhibitor. *Proc Soc Exp Biol Med* 136(2): 592-6.
- Wrong O.M. and Vince A. (1984). Urea and ammonia metabolism in the human large intestine. *Proc Nutr Soc* 43(1): 77-86.
- Yamamoto S., Korin T., Anzai M., Wang M.F., Hosoi A., Abe A., et al. (1985). Comparative effects of protein, protein hydrolysate and amino acid diets on nitrogen metabolism of normal, protein-deficient, gastrectomized or hepatectomized rats. *J Nutr* 115(11): 1436-46.
- Yoneyama T., Ohta Y. and Ohtani T. (1983). Variations of natural carbon-13 and nitrogen-15 abundances in rat tissues and their correlation. *Radioisotopes* 32(7): 330-332.
- Yoshizawa F., Kimball S.R., Vary T.C. and Jefferson L.S. (1998). Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): E814-20.
- Younes H., Demigne C. and Remesy C. (1996). Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *Br J Nutr* 75(2): 301-14.
- Younes H., Garleb K., Behr S., Remesy C. and Demigne C. (1995). Fermentable fibers or oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. *J Nutr* 125(4): 1010-6.
- Younes H., Garleb K.A., Behr S.R., Demigne C. and Remesy C. (1998). Dietary fiber stimulates the extra-renal route of nitrogen excretion in partially nephrectomized rats. *J Nutr Biochem* 9(11): 613-620.
- Young V.R., El-Khoury A.E., Raguso C.A., Forslund A.H. and Hambraeus L. (2000). Rates of urea production and hydrolysis and leucine oxidation change linearly over widely varying protein intakes in healthy adults. *J Nutr* 130(4): 761-6.
- Yu Y.M., Wagner D.A., Tredget E.E., Walaszewski J.A., Burke J.F. and Young V.R. (1990). Quantitative role of splanchnic region in leucine metabolism: L-[1-¹³C, ¹⁵N]leucine and substrate balance studies. *Am J Physiol* 259(1 Pt 1): E36-51.
- Yuan C.L., Sharma N., Gilge D.A., Stanley W.C., Li Y., Hatzoglou M., et al. (2008). Preserved protein synthesis in the heart in response to acute fasting and chronic food restriction despite reductions in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(1): E216-22.
- Zanetti M., Barazzoni R., Kiwanuka E. and Tessari P. (1999). Effects of branched-chain-enriched amino acids and insulin on forearm leucine kinetics. *Clin Sci (Colch)* 97(4): 437-48.
- Zhang X.J., Chinkes D.L., Doyle D. and Wolfe R.R. (1998). Metabolism of skin and muscle protein is regulated differently in response to nutrition. *Am J Physiol* 274(3 Pt 1): E484-92.
- Zhang X.J., Chinkes D.L., Herndon D.N. and Wolfe R.R. (2009). Measurement of protein fractional synthesis and breakdown rates in the skin of rabbits using a subflooding dose method. *Metabolism* 58(9): 1239-47.

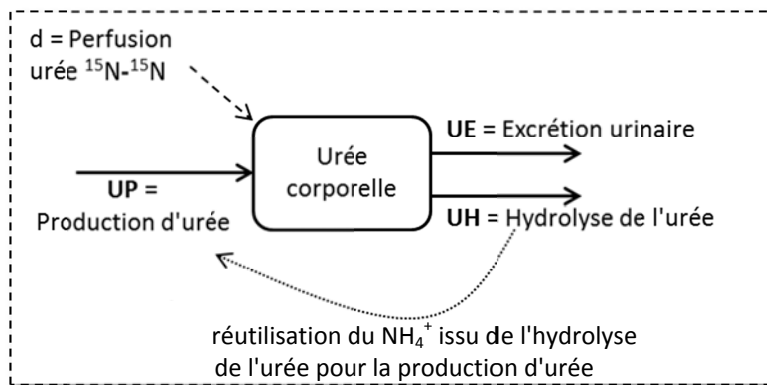
- Zhang X.J., Chinkes D.L., Sakurai Y. and Wolfe R.R. (1996). An isotopic method for measurement of muscle protein fractional breakdown rate in vivo. *Am J Physiol* 270(5 Pt 1): E759-67.
- Zhang X.J., Chinkes D.L. and Wolfe R.R. (2002). Measurement of muscle protein fractional synthesis and breakdown rates from a pulse tracer injection. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(4): E753-64.
- Zhang X.J., Chinkes D.L. and Wolfe R.R. (2003). Measurement of protein metabolism in epidermis and dermis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(6): E1191-201.
- Zhao L., Schell D.M. and Castellini M.A. (2006). Dietary macronutrients influence ¹³C and ¹⁵N signatures of pinnipeds: captive feeding studies with harbor seals (*Phoca vitulina*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 143(4): 469-78.

ANNEXES

DÉTERMINATION DES FLUX DE PRODUCTION, D'EXCRÉTION ET DE RECYCLAGE DE L'URÉE PAR PERFUSION D'URÉE DOUBLEMENT MARQUÉE

L'approche proposée par le groupe de Jackson consiste à administrer l'urée marquée uniformément sur ses deux atomes d'azote (urée ^{15}N - ^{15}N) par voie orale sous la forme d'une large dose (Jackson *et al.*, 1993 ; Jackson *et al.*, 1984) ou d'une dose amorce suivie de doses répétées toutes les 3h pendant 15 à 18h (Meakins *et al.*, 1998) de manière à atteindre l'équilibre isotopique dans le pool urinaire. Les différents flux d'urée sont estimés à partir des teneurs des différents isotopomères de l'urée (urée ^{15}N - ^{15}N , urée ^{15}N - ^{14}N et urée ^{14}N - ^{14}N) dans le pool d'excrétion urinaire une fois l'équilibre isotopique atteint (en général après 48h).

Le modèle sous-jacent considéré dans cette approche consiste en un compartiment unique d'urée corporelle avec un flux d'entrée correspondant à la production d'urée (UP) et deux flux de sortie correspondant respectivement à l'excrétion d'urée (UE) dans les urines et à l'hydrolyse (UH) dans le colon de la part d'urée non excrétée.



Modèle des cinétiques de l'urée utilisé pour le calcul des flux
(d'après Meakins *et al.*, 1998)

➤ La production endogène d'urée est estimée à partir de la dilution de l'urée ^{15}N - ^{15}N par l'urée ^{14}N - ^{14}N dans l'urine, c'est-à-dire comme le rapport entre le flux d'urée ^{15}N - ^{15}N administrée oralement (d) et l'enrichissement en ^{15}N - ^{15}N de l'urée urinaire (E^{30}_{urine}) :

$$UP = \frac{d}{E^{30}_{\text{urine}}}, \text{ avec : } E^{30}_{\text{urine}} = \frac{\text{urée } ^{15}\text{N}^{15}\text{N}}{\text{urée } ^{14}\text{N}^{14}\text{N}}$$

➤ La quantité d'urée hydrolysée (UH) est calculée comme la différence entre les quantités d'urée produite et excrétée : $UH = UP - UE$

Une partie de l'urée hydrolysée est réutilisée pour produire de l'urée (R), l'autre partie étant disponible pour la synthèse d'AA ou de protéines et correspond à une épargne azotée (S). L'urée qui est transférée vers le colon est doublement marquée et produit par conséquent de l'ammoniaque marqué. Une partie de l'ammoniaque issu de l'hydrolyse de l'urée est utilisé pour produire à nouveau de l'urée, et l'urée ainsi formée est marquée avec une seule molécule de ^{15}N (urée ^{14}N - ^{15}N).

➤ La quantité d'urée hydrolysée réorientée vers la production d'urée (R) est estimée par la mesure de la teneur relative en urée ^{14}N - ^{15}N dans l'urine (E^{29}_{urine}) :

$$R = \frac{E^{29}_{\text{urine}}}{d}, \text{ avec : } E^{29}_{\text{urine}} = \frac{\text{urée } ^{14}\text{N}^{15}\text{N}}{\text{urée } ^{14}\text{N}^{14}\text{N}}$$

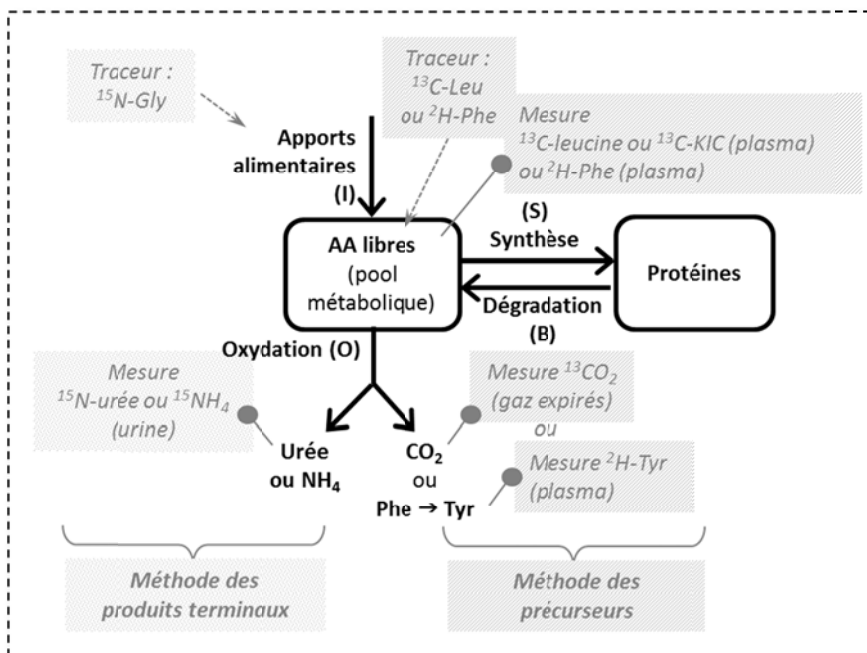
➤ La partie de l'urée hydrolysée qui est épargnée et qui reste disponible pour la synthèse d'AA ou de protéines (S) est calculée par différence, soit : $S = UH - R$.

ESTIMATION DU RENOUVELLEMENT PROTÉIQUE À L'ÉCHELLE CORPS ENTIER PAR L'UTILISATION D'AA TRACEURS

1. Principe général

Les méthodes d'estimation du renouvellement protéique corporel global impliquant l'utilisation d'acides aminés traceurs, reposent sur le principe de la dilution isotopique, selon lequel le rapport de dilution d'un acide aminé marqué introduit dans l'organisme est inversement proportionnel au débit de production de l'acide aminé dans l'organisme.

Les données de traceurs isotopiques sont classiquement analysées à l'aide d'un modèle à 2 compartiments, constitué d'un pool d'acides aminés libres (pool métabolique) et d'un pool protéique. Selon ce modèle, l'acide aminé marqué, administré par voie orale ou intraveineuse, entre dans le pool d'acides aminés libres à partir duquel il est ensuite soit incorporé dans le pool protéique par les synthèses protéiques soit oxydé formant du CO₂ et de l'urée excrétée dans l'urine.



↻ Le **renouvellement protéique global** est défini comme le flux total, noté **Q**, d'acides aminés entrant ou sortant du pool.

↻ Le **flux d'entrée des acides aminés dans le pool métabolique** est composé des acides aminés provenant de l'**apport alimentaire (I)** et des acides aminés provenant de la **protéolyse (B)**.

↻ Le **flux de sortie** correspond à l'utilisation des acides aminés pour **les synthèses protéiques (S)** et à l'**oxydation des acides aminés (O)**.

↻ Sous l'hypothèse d'état stationnaire du pool métabolique, les flux azotés d'entrée et de sortie sont égaux, et par conséquent : **Q = I + B = S + O**.

Q est estimé par le principe de dilution isotopique et S et B sont déduits par différences, connaissant O et I.

2. Méthode des produits terminaux :

Cette méthode consiste à administrer un acide aminé marqué, généralement la glycine-¹⁵N, par voie intragastrique de manière continue jusqu'à ce que l'enrichissement dans l'urée ou l'ammoniaque urinaire soit à l'équilibre isotopique.

↻ Le **renouvellement protéique** est alors estimé par le rapport de la vitesse d'infusion de l'AA marqué (i) sur l'enrichissement en ¹⁵N dans le produit terminal choisi, i.e. l'urée ou l'ammoniaque (E_{EP}) mesuré à l'équilibre isotopique (Waterlow *et al.*, 1978) :

$$Q = i/E_{EP}$$

⇒ **L'oxydation (O)** est estimée par la mesure de l'excrétion urinaire azotée (E).

⇒ Par conséquent, selon l'équation $Q = B + I = S + O$, le taux de dégradation protéique est déduit par la mesure de l'apport alimentaire : $B = Q - I$, et le taux de synthèse protéique S est estimé par la mesure de l'excrétion urinaire : $S = Q - E$. (Wagenmakers, 1999)

Pour l'urée, le temps nécessaire pour que l'enrichissement atteigne un plateau est de 2 à 3 jours, alors qu'il est de seulement 24h en moyenne pour l'ammoniaque et par conséquent l'utilisation de l'ammoniaque au lieu de l'urée a l'avantage de permettre des mesures sur des périodes de temps plus courtes.

L'estimation de Q par la mesure de l'enrichissement dans les produits terminaux repose sur les hypothèses théoriques sous-jacentes suivantes, qui sont questionnables :

- la proportion d'isotope excrété dans le produit terminal reflète la proportion d'isotope dans le pool d'acides aminés libres et donc la proportion d'azote incorporé dans le pool protéique;
- il n'y a pas de recyclage de l'acide aminé marqué;
- les flux sont constants sur la période d'étude.

Des méthodes alternatives consistent à suivre l'évolution de l'enrichissement dans les produits terminaux urinaires à différents temps après l'administration d'une simple dose d'acide aminé marqué (Long *et al.*, 1977) ou à mesurer l'excrétion cumulée de d'isotope après l'administration d'une simple dose d'acide aminé marqué.

3. Méthode des précurseurs :

Un acide aminé marqué au ^{13}C , généralement la leucine, est administré par une perfusion intraveineuse continue (2 à 3h) jusqu'à ce que l'enrichissement en ^{13}C dans le pool de leucine plasmatique atteigne un plateau.

⇒ **Le flux d'apparition (Ra)** de la leucine dans le pool métabolique est calculé par la dilution du traceur à l'équilibre isotopique selon l'équation (Matthews *et al.*, 1980):

$$\mathbf{Ra} = i \times \left(\frac{E_i}{E_p} - 1 \right)$$

avec i , la vitesse d'infusion du traceur,

E_i , l'enrichissement du traceur et

E_p , l'enrichissement mesuré dans le pool précurseur (AA plasmatiques ou KIC).

⇒ Sous l'hypothèse d'état stationnaire du pool métabolique, le flux d'apparition de leucine est égal au flux de d'utilisation de leucine, tel que $Q = Ra = Rd$, avec, selon le modèle à 2 compartiments, $Ra = I + B$ et $Rd = S + O$.

⇒ La quantité de leucine oxydée est estimée par la mesure de l'enrichissement en ^{13}C du CO_2 dans les gaz expirés et de la production totale de CO_2 et par l'application d'un facteur de correction tenant compte de la perte de CO_2 entre le site d'oxydation de la leucine et l'apparition du CO_2 dans les gaz expirés.

⇒ Le flux d'utilisation de la leucine pour **les synthèses protéiques (S)** qui correspond à l'utilisation non oxydative de la leucine est calculée par la différence entre le flux total d'utilisation de la leucine et le flux d'oxydation : $S = Rd - O$.

⇒ Le flux de leucine issue de la **protéolyse (B)** est estimé par la différence entre le flux d'apparition et l'apport (I) : $B = Ra - I$

⇒ Les flux d'acides aminés peuvent être convertis en flux de protéines sur la base du contenu moyen de l'acide aminé choisi dans les protéines totales de l'organisme (par exemple 8% pour la leucine).

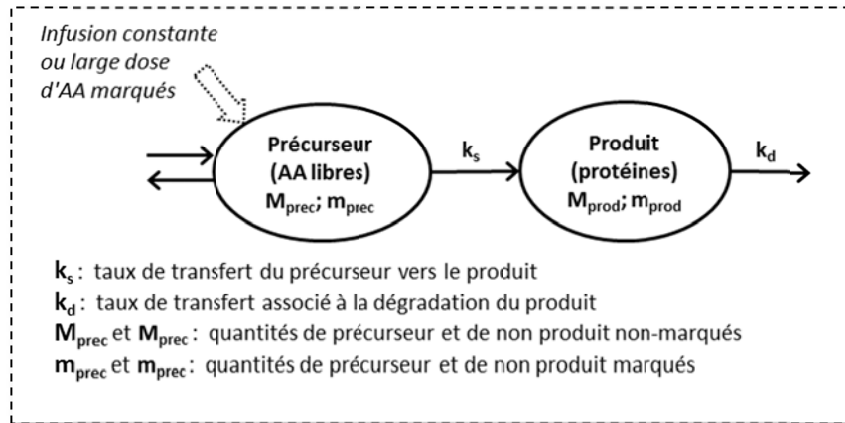
L'enrichissement du KIC plasmatique est considéré comme un meilleur estimateur de l'enrichissement du pool précurseur des synthèses protéiques que l'enrichissement de la leucine plasmatique. En effet, il a été montré que l'enrichissement de la leucine intracellulaire était inférieur à celui de la leucine plasmatique du fait de la dilution par la leucine non marquée issue de la protéolyse, alors que le KIC est produit rapidement par transamination à partir de la leucine intracellulaire et par conséquent le pool de KIC plasmatique s'équilibre rapidement avec le pool de leucine intracellulaire.

Une méthode alternative consiste à administrer par perfusion continue intraveineuse de la phenylalanine marquée au ^{15}N . De la même manière, le flux de renouvellement protéique Q est estimé par la mesure de la dilution de l'enrichissement en ^{15}N dans le pool plasmatique. La première étape de l'oxydation de la phenylalanine correspondant à l'hydroxylation de la phenylalanine en tyrosine, la quantité de phenylalanine oxydée peut être estimée par la mesure de l'enrichissement de la $^2\text{H}_4$ -tyrosine à l'équilibre isotopique (Thompson *et al.*, 1989).

Annexe n°3

MESURE DU TAUX FRACTIONNAIRE DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE (FSR) À PARTIR DE DONNÉES CINÉTIQUES DE TRACEURS

Les méthodes de mesure des taux de synthèse protéique tissulaire par l'utilisation d'AA traceurs consistent à marquer le pool précurseur des synthèses protéiques par l'administration d'un AA marqué et à suivre l'incorporation de ce marqueur dans le pool protéique tissulaire. Les quantités relatives d'AA traceur sont mesurées dans le pool d'AA précurseurs et dans le pool protéique à différents temps. L'estimation du FSR à partir de ces données cinétiques suppose un modèle précurseur-produit simple, avec les AA libres comme précurseurs et les protéines (AA liés aux protéines) comme produits (Waterlow, 2006).



La formule courante pour le calcul du FSR après l'administration d'un AA marqué par infusion à vitesse constante ou par une large dose ponctuelle est la suivante :

$$FSR = \frac{E_{prot}(t_2) - E_{prot}(t_1)}{\int_{t_1}^{t_2} E_{prec}(t) \cdot dt}$$

où E_{prec} et E_{prot} sont respectivement les enrichissements isotopiques (ou rapports traceur sur tracé) dans le pool précurseur et dans le pool produit.

Cette équation et la représentation du métabolisme protéique par un modèle précurseur-produit simple reposent sur plusieurs hypothèses :

- (1) les pools de précurseurs (AA libres) et produits (protéines) non marqués sont à l'état stationnaire, c'est-à-dire que leurs tailles (ou masses) sont constantes;
- (2) l'AA traceur a le même comportement que les AA non marqués du système et ne modifie pas l'état stationnaire;
- (3) le taux de synthèse protéique est constant pendant la période d'incorporation de l'AA traceur, et par conséquent les cinétiques du système sont décrites par des lois linéaires et des constantes de vitesses (k_s et k_d , fig 1) supposées constantes;
- (4) le précurseur échantillonné est le "vrai" précurseur des synthèses protéiques;
- (5) le retour vers le pool précurseur du traceur incorporé dans le pool protéique du fait de la dégradation protéique est considéré inexistant sur la période expérimentale (c'est-à-dire absence de recyclage du traceur).

La formule générale d'estimation du FSR dérive du raisonnement suivant :

Par définition et sous l'hypothèse (3), le FSR est défini par :

$$FSR = \frac{k_s \times M_{prec}}{M_{prot}}$$

Par ailleurs, en appliquant le principe de conservation de la masse au produit non marqué (tracé) et en considérant des lois linéaires pour la description des cinétiques de transfert du précurseur vers le produit et de perte de précurseur, l'évolution de la quantité de produit non-marqué est décrite par l'équation suivante :

Sous l'hypothèse (1) d'état stationnaire, cette équation se simplifie telle que :

$$k_s \times M_{\text{prec}} = k_d \times M_{\text{prot}} \quad \text{ou} \quad k_d = \frac{k_s \times M_{\text{prec}}}{M_{\text{prot}}} = \text{FSR} \quad (\text{E1})$$

Par ailleurs, l'application du principe de conservation de la masse au produit marqué (traceur) permet d'exprimer l'évolution de quantité de produit marqué par l'équation suivante :

$$\frac{dm_{\text{prot}}(t)}{dt} = k_s \times m_{\text{prec}}(t) - k_d \times m_{\text{prot}}(t) \quad (\text{E2})$$

Par intégration de l'équation (E1) entre 2 temps t1 et t2 :

$$\int_{t1}^{t2} dm_{\text{prot}} = m_{\text{prot}}(t2) - m_{\text{prot}}(t1) = \int_{t1}^{t2} [k_s \times m_{\text{prec}}(t) - k_d \times m_{\text{prot}}(t)] \times dt \quad (\text{E3})$$

En divisant l'équation (E3) par M_{prot} et en utilisant la relation (E1), on obtient l'équation suivante :

$$\int_{t1}^{t2} \frac{m_{\text{prot}}}{M_{\text{prot}}} = \frac{m_{\text{prot}}(t2)}{M_{\text{prot}}} - \frac{m_{\text{prot}}(t1)}{M_{\text{prot}}} = k_d \times \int_{t1}^{t2} \left[\frac{m_{\text{prec}}(t)}{M_{\text{prec}}} - \frac{m_{\text{prot}}(t)}{M_{\text{prot}}} \right] \times dt$$

Etant donné que $k_d = \text{FSR}$, on en déduit l'équation suivante pour FSR :

$$\text{FSR} = \frac{\frac{m_{\text{prot}}(t2)}{M_{\text{prot}}} - \frac{m_{\text{prot}}(t1)}{M_{\text{prot}}}}{\int_{t1}^{t2} \left[\frac{m_{\text{prec}}(t)}{M_{\text{prec}}} - \frac{m_{\text{prot}}(t)}{M_{\text{prot}}} \right] \times dt} \quad (\text{E4})$$

Pour chaque pool, la quantité relative de traceur peut être exprimée par l'enrichissement isotopique E qui correspond au rapport entre la quantité de traceur et de tracé, soit :

$$E_{\text{prec}}(t) = \frac{m_{\text{prec}}(t)}{M_{\text{prec}}} \quad \text{et} \quad E_{\text{prot}}(t) = \frac{m_{\text{prot}}(t)}{M_{\text{prot}}}$$

On obtient ainsi l'équation générale suivante pour l'estimation du FSR :

$$\text{FSR} = \frac{E_{\text{prot}}(t2) - E_{\text{prot}}(t1)}{\int_{t1}^{t2} [E_{\text{prec}}(t) - E_{\text{prot}}(t)] \times dt} \quad (\text{E5})$$

Cette équation générale peut être simplifiée dans les conditions suivantes :

- (1) si l'on considère que la perte de produit marqué est très faible et négligeable pendant la période expérimentale, i.e. $k_d \times m_{\text{prot}}(t) \approx 0$:

L'équation (E2) s'écrit alors :

$$\frac{dm_{\text{prot}}(t)}{dt} = k_s \times m_{\text{prec}}(t)$$

L'équation d'estimation du FSR peut être exprimée sous la forme simplifiée :

$$\text{FSR} = \frac{E_{\text{prot}}(t2) - E_{\text{prot}}(t1)}{\int_{t1}^{t2} E_{\text{prec}}(t) \times dt} \quad (\text{E6})$$

- (2) si l'on fait l'hypothèse que l'enrichissement isotopique dans le pool précurseur est stable sur la période de mesure du FSR, l'intégrale entre les temps t1 et t2 est égale au produit de l'enrichissement par la différence de temps :

$$\int_{t1}^{t2} E_{\text{prec}}(t) \times dt = E_{\text{prec}} \times (t2 - t1)$$

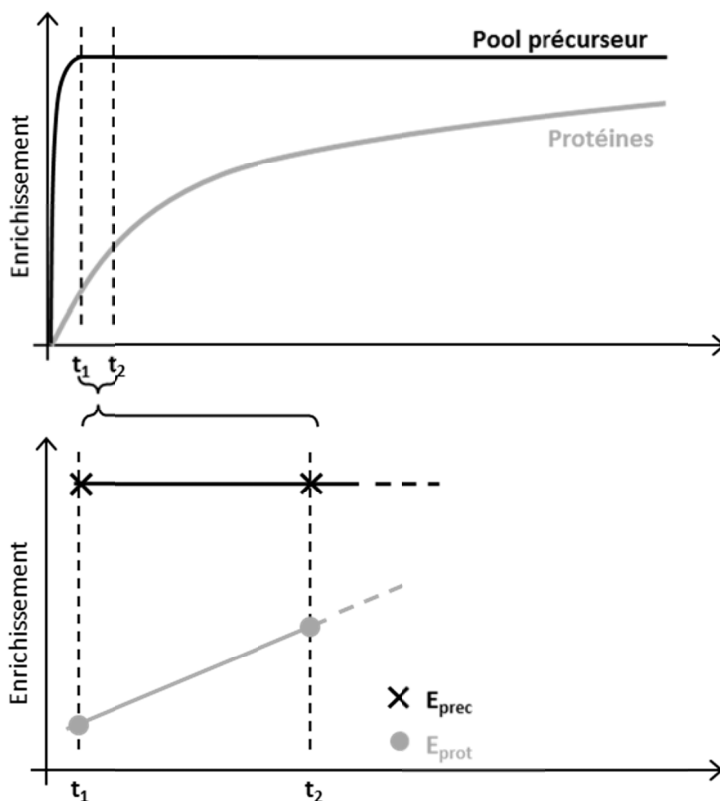
L'équation (E6) se simplifie de la manière suivante :

$$\text{FSR} = \frac{E_{\text{prot}}(t2) - E_{\text{prot}}(t1)}{E_{\text{prec}} \times (t2 - t1)}$$

Cas de l'administration du traceur par une infusion continue :

La mesure du FSR par la méthode de l'infusion constante consiste à administrer un AA traceur avec une faible dose mais de façon continue sur plusieurs heures, de manière à atteindre et maintenir un enrichissement isotopique stable dans le pool précurseur. Lorsque l'enrichissement dans le pool précurseur est constant, l'enrichissement isotopique dans le pool protéique augmente selon une courbe exponentielle. La valeur de l'enrichissement isotopique au plateau dans le pool protéique est égale à l'enrichissement isotopique dans le pool précurseur. Cependant, en pratique, l'atteinte du plateau isotopique dans le pool protéique (notamment pour les tissus ayant un taux de renouvellement lent tels que le muscle) nécessite des durées d'infusion très longues et par conséquent le FSR est généralement estimé sur une période de temps [t1-t2] plus courte pendant laquelle l'enrichissement isotopique du pool précurseur est constant et celui du pool protéique évolue linéairement (fig. 2), selon la formule suivante :

$$FSR = \frac{E_{prot}(t_2) - E_{prot}(t_1)}{E_{prec} \times (t_2 - t_1)}$$



Cas de l'administration du traceur sous la forme d'une large dose :

Lorsqu'une large dose d'AA marqués est administrée, l'enrichissement isotopique dans le pool précurseur augmente et atteint très rapidement (après quelques minutes) un état stationnaire. Les enrichissements isotopiques sont alors mesurés à un temps unique t, quelques minutes après l'administration du tracé, et le FSR est estimé selon la formule suivante :

$$FSR = \frac{E_{prot}(t)}{E_{prec} \times t}$$

MESURE DU TAUX FRACTIONNAIRE DE DÉGRADATION PROTÉIQUE (FBR) À PARTIR DE DONNÉES CINÉTIQUES DE TRACEURS

1. Estimation du FBR par la mesure de la décroissance de l'enrichissement isotopique dans le pool protéique

Le taux de dégradation protéique peut être déterminé directement *in vivo* en marquant le pool protéique et en mesurant la diminution de l'enrichissement isotopique dans ce pool au cours du temps (Bergen, 2008). En faisant l'hypothèse que la cinétique d'évolution de l'enrichissement isotopique dans le pool protéique est décrite par une fonction exponentielle décroissante, le FBR est calculé selon l'équation :

$$\frac{E(t)}{E_0} = e^{-FBR \times t}$$

où $E(t)$ est l'enrichissement isotopique dans la fraction P du tissu considéré à un temps t et E_0 son enrichissement isotopique initial, c'est-à-dire à l'équilibre isotopique.

Cette méthode présente plusieurs limites :

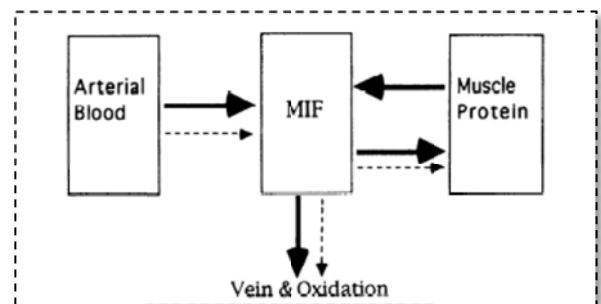
- elle nécessite la réalisation de plusieurs biopsies tissulaires;
- la réutilisation du traceur libéré par la protéolyse pour la synthèse protéique (recyclage du traceur) conduit à une sous-estimation des taux de dégradation protéique;
- la cinétique de diminution de l'enrichissement isotopique dans le pool protéique n'est pas toujours décrite par une seule fonction exponentielle, mais peut prendre la forme d'une somme d'exponentielles si le pool est constitué de protéines ayant des taux de renouvellement différents.

2. Estimation du FBR par une adaptation de la méthode "précurseur-produit"

La méthode développée par l'équipe de Zhang (Zhang *et al.*, 1996) propose d'utiliser le principe général des méthodes précurseur-produit, mais en considérant le pool protéique comme précurseur et les AA intracellulaires libres comme produits pour mesurer le taux de dégradation protéique dans le muscle.

Un acide aminé traceur (généralement la leucine ou la phenylalanine) est infusé de manière continue pendant plusieurs heures jusqu'à l'atteinte d'un état d'équilibre isotopique dans les pools d'AA artériels et d'AA libres intracellulaires.

Les AA intracellulaires proviennent de 2 sources : les AA artériels ("arterial blood") captés par le muscle, qui sont constitués d'AA marqués et non marqués, et les AA issus de la protéolyse des protéines musculaires ("Muscle Protein"), qui sont uniquement des AA non marqués.



La différence d'enrichissement isotopique entre les AA artériels et les AA intracellulaires à l'équilibre isotopique reflète la contribution relative de ces 2 sources. Après l'arrêt de l'infusion du traceur la courbe de diminution de l'enrichissement isotopique dans le pool produit d'AA intracellulaires est déterminée par la vitesse à laquelle des AA sont libérés par la dégradation protéique et diluent l'enrichissement intracellulaire et par l'évolution de l'enrichissement dans le pool artériel. Le FBR peut donc être calculé en utilisant l'équation suivante :

$$FBR = \frac{E_M(t_1) - E_M(t_2)}{P \cdot \int_{t_1}^{t_2} E_A(t) dt - (1 + P) \cdot \int_{t_1}^{t_2} E_M(t) dt} \times \frac{Q_M}{T}$$

- où
- E_A et E_M sont les enrichissements isotopiques dans les pools d'AA artériels et d'AA musculaires intracellulaires respectivement ;
 - P représente le rapport entre le flux d'AA provenant du pool artériel et l'apport d'AA par la protéolyse et est calculé au plateau isotopique par le ratio $E_M/(E_A - E_M)$;
 - Q_M/T est le rapport entre la taille du pool d'AA intracellulaires et la taille du pool protéique dans le muscle.

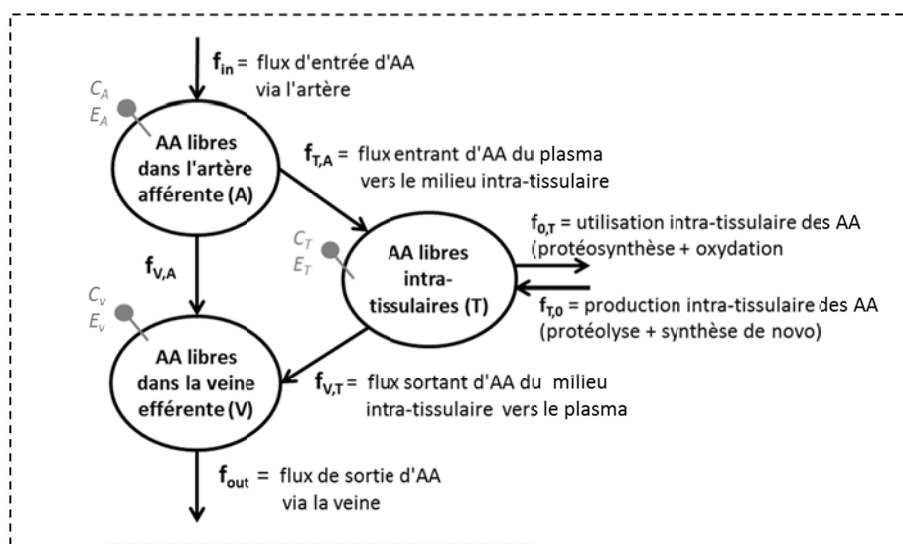
Cette équation est une version adaptée de l'équation précurseur produit classique, où la variation d'enrichissement dans le pool produit (AA libres intracellulaires) est divisée par l'aire sous la courbe de l'enrichissement dans le pool précurseur : les 2 facteurs supplémentaires P et Q_M/T permettant respectivement de tenir compte du fait que le pool intracellulaire a deux précurseurs et d'exprimer le taux de dégradation en proportion de la taille du pool protéique (Zhang *et al.*, 1996 ; Wolfe & Chinkes, 2005). La nécessité de mesurer les enrichissements dans les AA artériels et intracellulaires à l'équilibre isotopique peut être contournée en mesurant les enrichissements isotopiques artériel et intracellulaire à trois temps distincts après une administration pulsée d'AA marqué (Zhang *et al.*, 2002).

Cette méthode d'estimation du FBR, basée sur le principe précurseur-produit, repose sur les hypothèses suivantes :

- les flux et les tailles des différents pools sont constants,
- l'AA utilisé comme traceur n'est pas synthétisé de novo dans le tissu,
- le pool d'AA intracellulaire est homogène.

DÉTERMINATION DES CINÉTIQUES DES AA AU NIVEAU TISSULAIRE :
ANALYSE PAR UN MODÈLE À 3 COMPARTIMENTS
DES DONNÉES DE BILANS D'ORGANES ET DE TRACEURS ISOTOPIQUES

La méthode consiste à perfuser de façon continue dans la circulation systémique un AA traceur marqué, et à mesurer l'enrichissement et la concentration de cet AA dans les pools plasmatiques artériel et veineux et dans l'eau intracellulaire du tissu, par la technique de cathétérisme artério-veineux et la réalisation de biopsies tissulaires (Biolo *et al.*, 1992a).



- Les bilans nets d'AA non marqués (NB) et d'AA traceurs (nb) sont estimés par :

$$\mathbf{NB} = f_{in} - f_{out} = f_{T,A} - f_{V,T} = f_{0,T} - f_{T,0} \quad \text{et} \quad \mathbf{nb} = (C_A \times E_A - C_V \times E_V) \times \text{BF} = f_{T,A} \times E_A - f_{V,T} \times E_V$$

- Le flux entrant d'AA dans le compartiment intracellulaire depuis le plasma ($f_{T,A}$) et le flux sortant d'AA vers le plasma ($f_{V,T}$) sont calculés à partir des mesures du débit sanguin (BF) et des bilans d'AA marqués et non-marqués à travers le tissu :

$$f_{T,A} = \left(\frac{(E_T - E_V)}{(E_A - E_T)} \times C_V + C_A \right) \times \text{BF}$$

$$f_{V,T} = \left(\frac{(E_T - E_V)}{(E_A - E_T)} \times C_V + C_V \right) \times \text{BF}$$

- Le flux d'utilisation des AA dans le tissu ($f_{0,T}$) est calculé en divisant le bilan net du traceur (nb) par l'enrichissement du pool précurseur qui est considéré être le pool d'AA libres intra-tissulaires (ET) :

$$f_{0,T} = \frac{\mathbf{nb}}{E_T}$$

- Le flux de production d'AA intracellulaires ($f_{T,0}$) est estimé par la différence entre le bilan net d'AA non marqués (NB) et le flux d'utilisation des AA :

$$f_{T,0} = f_{T,0} - \mathbf{NB}$$

- Les taux de synthèse et dégradation protéiques peuvent être directement estimés à partir des flux de production et d'utilisation des AA intracellulaires si les AA traceurs utilisés ne sont ni métabolisés ni synthétisés dans le tissu.

- Les flux totaux d'apparition (R_{aT}) et d'utilisation (R_{dT}) d'AA intracellulaires peuvent être exprimés selon les équations suivantes :

$$R_{aT} = f_{T,0} + f_{T,A} \quad \text{et} \quad R_{dT} = f_{0,T} + f_{V,T}$$

PRINCIPALES MESURES UTILISÉES POUR ÉVALUER LA QUALITÉ NUTRITIONNELLE DES PROTÉINES

La qualité d'une protéine alimentaire est généralement définie par sa capacité à satisfaire les besoins en AA et en azote pour la croissance et/ou le maintien de la masse protéique. Chez l'homme, la méthode officielle d'évaluation de la qualité ou valeur nutritionnelle d'une protéine alimentaire, recommandée par la FAO, est la méthode du PD-CAAS (Protein Digestibility Corrected AA Score).

L'indice **PD-CAAS** mesure la capacité d'une P à satisfaire les besoins en AA indispensable, tout en tenant compte de sa digestibilité. Il consiste à comparer la composition en AA indispensables de la P étudiée à celle d'une P de référence et est calculé comme la quantité de l'AA le plus limitant dans la P considérée en pourcentage de sa quantité dans la P de référence, pondéré par la digestibilité de la P. La principale limite de ce score est qu'il dépend fortement de la protéine définie comme référence par rapport au profil d'AA requis. (FAO/WHO, 1991)

Deux mesures alternatives sont également utilisées pour évaluer la qualité protéique chez l'homme : la valeur biologique (VB) et l'indice d'utilisation (postprandiale) protéique nette (NP(P)U). Ces indices mesurent la qualité d'une P par sa capacité à assurer le renouvellement et le gain protéiques (Bos *et al.*, 2005). Leur calcul est basé sur la mesure des quantités d'azote ingérées et excrétées sous formes fécale et urinaire en distinguant l'azote endogène de l'azote alimentaire, grâce à des méthodes de bilan azoté et l'utilisation d'isotopes stables pour le marquage des protéines endogènes ou alimentaires (Bos *et al.*, 1999; Bos *et al.*, 2005).

- Les indices UPN et UPPN mesurent la proportion d'N alimentaire ingéré qui est réellement retenu dans l'organisme et prennent en compte à la fois la disponibilité digestive et la disponibilité métabolique des P :

- l'**UPN** est largement utilisé chez l'animal et est déterminé par la différence entre la quantité d'azote corporelle totale mesurée chez des animaux nourris avec la P test par rapport à des animaux sous régime protéoprive (Miller & Bender, 1955).

$$\text{UPN} = \frac{N - (N_{PP} - I_{PP})}{I}$$

où N (ou I) et N_{PP} (ou I_{PP}), représentent les quantités corporelles (ou ingérées) d'azote chez les animaux nourris avec la P testée et chez les animaux sous régime protéoprive, respectivement.

- l'**UPPN** est utilisé chez l'homme et mesure la proportion de l'azote ingéré qui n'est pas excrétée mais retenue dans l'organisme en phase postprandiale (Bos *et al.*, 2005).

$$\text{UPPN} = \frac{I - (F + U)}{I}$$

où F et U représentent les quantités d'N alimentaire excrétées respectivement par voie fécale et par voie urinaire.

- La VB d'une protéine représente plus spécifiquement la proportion de l'azoté absorbé (azoté ingéré non excrété par voie fécale) qui est retenue dans l'organisme. Elle équivaut à l'UPPN divisé par la digestibilité (D), et correspond à la disponibilité métabolique des protéines (Bos *et al.*, 2005).

$$\text{VB} = \frac{I - (F + U)}{I - F} = \frac{\text{UPPN}}{D} \quad \text{avec} \quad D = \frac{I - F}{I}$$

où D représente la digestibilité de la protéine alimentaire considérée.

PRINCIPE DE LA MESURE DES $\delta^{15}\text{N}$ PAR EA-IRMS

Les mesures de $\delta^{15}\text{N}$ sont couramment réalisées à l'aide d'un analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse de rapports isotopiques (EA-IRMS). L'ensemble fonctionne en flux continu d'hélium, qui constitue le gaz vecteur.

× Principe de l'analyseur élémentaire :

Les échantillons (solides et préalablement séchés), prélevés et pesés dans des capsules en étain, sont introduits dans l'analyseur élémentaire où ils subissent en présence d'oxygène purifié une combustion catalytique à 950°C avec effet flash. Toutes les molécules de l'échantillon sont transformées en CO_2 , O_2 , H_2O , NO_x , SO_2 , SO_3 et en composés halogénés volatiles. Ces différents gaz sont dirigés vers un tube de réduction rempli de cuivre II qui réduit les oxydes d'azote en N_2 , les composés soufrés en SO_2 et qui piège l' O_2 résiduel sous forme de CuO_2 à 550°C. Les composés halogénés sont quant à eux piégés par la laine d'argent en sortie du tube de réduction. Les molécules de H_2O sont piégées sur du perchlorate de magnésium tandis que les molécules de CO_2 sont piégées sur un filtre d'hydroxyde de sodium (ascarite). Les molécules de N_2 sont introduites dans un détecteur à conductibilité thermique pour la mesure du pourcentage d'azote par rapport à un standard élémentaire connu (étalon élémentaire utilisé : Atropine à 4,7%), puis sont dirigées vers le spectromètre de masse isotopique pour la mesure du rapport isotopique $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$.

× Principe du spectromètre de masse à ratio isotopique :

L'analyse de l'enrichissement isotopique en ^{15}N nécessite l'ionisation des différentes espèces moléculaires du N_2 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ pour la masse 28, $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ pour la masse 29, $^{15}\text{N}^{15}\text{N}$ pour la masse 30) qui est obtenue par collision avec des électrons. Les différentes molécules ionisées, formées par la perte d'un électron, sont accélérées dans un champ électrostatique et séparées dans un champ magnétique en fonction de leur rapport masse/charge ($m/z = 28, 29$ et 30 pour l'azote). En effet, un ion de masse M e de charge A , qui acquiert une énergie dans un champ électrique V , décrit une trajectoire circulaire de rayon R lorsqu'il est soumis à un champ magnétique B , et son mouvement est défini par l'équation suivante : $M / Z = (B^2 \times R^2) / (2 \times V)$. La valeur Z est égale à 1 car l'ionisation ne cause le départ que d'un seul électron. Lorsque B et V sont imposés, le rayon R , et par conséquent la trajectoire, de l'atome sont fonction uniquement de sa masse M . Les molécules ionisées sont donc ainsi séparées selon leur masse et réceptionnées sur des collecteurs réglés, dans le cas de l'azote, sur les masses 28, 29 et 30. L'intégration des courants issus de ces collecteurs permet de déterminer la proportion relative des isotopes 15 et 14 dans l'échantillon. La comparaison avec une référence calibrée par rapport à l'étalon international (N_2 atmosphérique) permet de calculer la teneur en ^{15}N sur une échelle relative en $\delta^{15}\text{N}\%$.

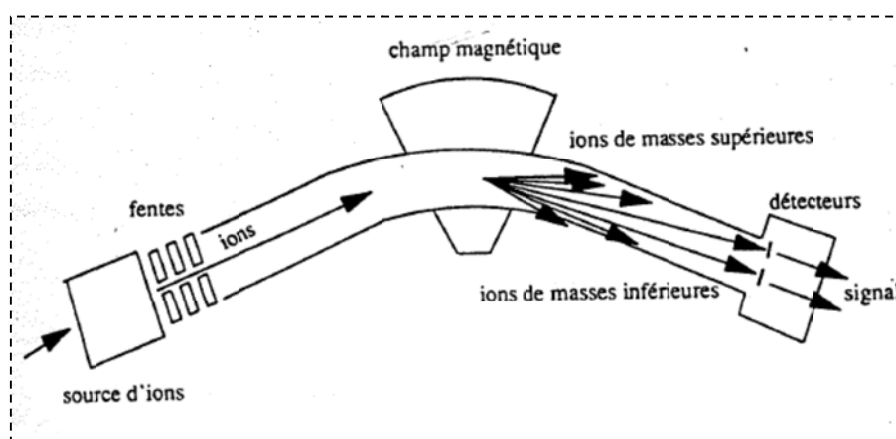


Schéma d'un spectromètre de masse isotopique

DÉFINITION ET CALCUL DU FACTEUR DE FRACTIONNEMENT ISOTOPIQUE**× Définition générale du facteur de fractionnement isotopique**

L'effet isotopique associé à une réaction chimique ou un processus physique, et qui conduit à un fractionnement isotopique, est généralement exprimé et quantifié par un **facteur de fractionnement isotopique** noté α ou ϵ . Pour toute transformation d'un substrat S en un produit P, le facteur de fractionnement isotopique $\alpha_{P/S}$ est défini comme le rapport entre le ratio isotopique du produit instantané de la transformation (R_{Pi}) et le ratio isotopique du substrat (S) :

$$\alpha_{P/S} = \frac{R_{Pi}}{R_S}$$

Dans le cas d'un effet isotopique cinétique (i.e. associé à une réaction irréversible), le facteur de fractionnement est aussi égal au rapport entre les constantes de vitesse de chacun des isotopes au cours de la réaction, alors que pour un effet isotopique d'équilibre (i.e. associé à une réaction réversible), le facteur de fractionnement est défini par la constante d'équilibre de la réaction (Hayes, 2002).

× Définitions du facteur de fractionnement isotopique dans le cas de réactions irréversibles

Dans le métabolisme protéique, les principales réactions auxquelles est susceptible d'être associé un effet isotopique sont les réactions enzymatiques. Par conséquent, l'ensemble des réactions "fractionnantes" ayant lieu sur une voie métabolique peut être approximé par une unique réaction non réversible et suivant une loi linéaire de premier ordre. Dans ce cas, le facteur de fractionnement est aussi égal au rapport entre les constantes de vitesse de chacun des isotopes au cours de la réaction :

$$\alpha_{P/S} = \frac{{}^{15}k_{P/S}}{{}^{14}k_{P/S}}$$

où ${}^{14}k_{P/S}$ et ${}^{15}k_{P/S}$ sont les constantes de vitesse des réactions impliquant l'isotope léger et l'isotope lourd.

De manière usuelle, le facteur de fractionnement associé à la transformation du substrat S en produit P est exprimé par la notation ϵ et approximé par la relation suivante :

$$\epsilon_{P/S} = \delta^{15}N_{Pi} - \delta^{15}N_S$$

où $\delta^{15}N_{Pi}$ et $\delta^{15}N_S$ sont les ratios isotopiques du produit instantané Pi et du substrat S de la réaction.

× Démonstration des relations utilisées pour définir le facteur de fractionnement :

La quantité de ${}^{14}N$ produite pendant un intervalle de temps infiniment petit ($d^{14}N_P$) au cours d'une réaction suivant une loi linéaire est proportionnelle à la quantité de ${}^{14}N$ dans le substrat, soit :

$$d^{14}N_P = {}^{14}k_{P/S} \times {}^{14}N_S$$

Il en est de même pour la quantité de ${}^{15}N$ produite instantanément :

$$d^{15}N_P = {}^{15}k_{P/S} \times {}^{15}N_S$$

Par conséquent, le ratio isotopique du produit instantané de cette réaction peut être exprimé sous la forme :

$$R_{Pi} = \frac{d^{15}N_P}{d^{14}N_P} = \frac{{}^{14}k_{P/S} \times {}^{14}N_S}{{}^{15}k_{P/S} \times {}^{15}N_S}$$

Le facteur de fractionnement associé à la réaction est donc défini par la relation suivante :

$$\alpha_{P/S} = \frac{R_{Pi}}{R_S} = \frac{({}^{14}k_{P/S} \times {}^{14}N_S) / ({}^{15}k_{P/S} \times {}^{15}N_S)}{({}^{14}N_S / {}^{15}N_S)} = \frac{{}^{15}k_{P/S}}{{}^{14}k_{P/S}}$$

Par ailleurs, les compositions isotopiques dans le produit et le réactif peuvent être exprimées en termes d'enrichissement isotopique δ , selon la transformation suivante (qui provient de la définition même de l'enrichissement isotopique) :

$$R_{Pi} = R_{standard} \times \left(\frac{\delta^{15}N_{Pi}}{1000} + 1 \right) \quad R_S = R_{standard} \times \left(\frac{\delta^{15}N_S}{1000} + 1 \right)$$

Le facteur de fractionnement isotopique peut donc également être exprimé en utilisant la notation δ selon la relation :

$$\alpha_{P/S} = \frac{R_{Pi}}{R_S} = \frac{(\delta^{15}N_{Pi} + 1000)}{(\delta^{15}N_S + 1000)}$$

Par définition, les notations α et ϵ sont liées par l'équation :

$$\alpha_{P/S} = 1 + \frac{\epsilon_{P/S}}{1000}$$

En utilisant cette relation, on en déduit :

$$\delta^{15}N_{Pi} = \delta^{15}N_S \times \left(1 + \frac{\epsilon_{P/S}}{1000} \right) + \epsilon_{P/S}$$

$\epsilon_{P/S}$ étant généralement très inférieur à 1000, on peut faire l'approximation suivante :

$$\delta^{15}N_{Pi} = \delta^{15}N_S + \epsilon_{P/S}$$

qui correspond finalement à la définition couramment utilisée pour $\epsilon_{P/S}$.

NB : Dans nos modèles, nous avons approximé le facteur de fractionnement $\alpha_{P/S}$ par le rapport entre les constantes de vitesse de l'isotope lourd de l'azote et de l'azote total au cours de la réaction, soit

$$\alpha_{P/S} = \frac{{}^{15}k_{P/S}}{k_{P/S}}$$

Ce qui équivaut à faire l'approximation suivante :

$$\alpha_{P/S} = \frac{F_{Pi}}{F_S}$$