



Impact de la déficience en acides aminés indispensables sur le métabolisme protéique et énergétique, et identification de signatures métaboliques

Joanna Moro

► To cite this version:

Joanna Moro. Impact de la déficience en acides aminés indispensables sur le métabolisme protéique et énergétique, et identification de signatures métaboliques. Alimentation et Nutrition. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB001 . tel-03194231

HAL Id: tel-03194231

<https://pastel.hal.science/tel-03194231>

Submitted on 9 Apr 2021

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

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

Impact de la déficience en acides aminés
indispensables sur le métabolisme protéique
et énergétique, et identification de
signatures métaboliques

*Impact of indispensable amino acid deficiency on
protein and energy metabolism, and identification
of metabolic signatures*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

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

Spécialité de doctorat : Sciences de la nutrition

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

Référent : AgroParisTech

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 27/01/2021, par**

Joanna MORO

Composition du Jury

Claire GAUDICHON

Professeure, AgroParisTech

Présidente

Sophie TESSERAUD

Directrice de recherche, INRAE - Centre Val de Loire

Rapporteur et Examinatrice

Stéphane WALRAND

Directeur de recherche, INRAE - Centre Auvergne-Rhône-Alpes

Rapporteur et Examinateur

Jean DALLONGEVILLE

Directeur de recherche, Institut Pasteur de Lille

Examinateur

Lucile MARTIN

Professeure, Oniris

Examinatrice

Direction de la thèse

Dalila AZZOUT-MARNICHE

Professeure, AgroParisTech

Directrice de thèse

Delphine BOUVERESSE

Chargée de recherche, INRAE – Centre IdF-Jouy-Antony

Invitée

Daniel TOME

Professeur retraité

Invité

Sommaire

Remerciements	6
Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
Contexte de réalisation de la thèse	12
Valorisation scientifique	12
Introduction générale	14
1. Chapitre I. Introduction bibliographique	16
1.1. Le métabolisme protéique et son contrôle	16
1.1.1. Les protéines.....	16
1.1.2. Les acides aminés	16
1.1.3. Digestion et absorption des protéines alimentaires	17
1.1.3.1. Le processus digestif	17
1.1.3.2. Facteurs influençant la digestion et l'absorption des protéines	19
1.1.4. Le contrôle du pool protéique.....	20
1.1.4.1. Renouvellement des protéines corporelles via la synthèse protéique.....	21
1.1.4.2. La dégradation des protéines : la protéolyse	24
1.1.5. Signalisation des acides aminés.....	25
1.1.5.1. Signalisation cellulaire : GCN2, AMPK et mTOR	26
1.1.5.1.1. mTOR.....	26
1.1.5.1.2.GCN2.....	27
1.1.5.1.3.AMPK	29
1.1.5.2. Signalisation extracellulaire : FGF21	31
1.2. Méthodes de détermination du besoin en protéines et acides aminés	32
1.2.1. Besoin en protéines et acides aminés indispensables	32
1.2.2. Qualité des protéines	32
1.2.3. Détermination du besoin en protéines	33
1.2.3.1. Le bilan azoté	34
1.2.3.2. Méthode factorielle.....	35
1.2.4. Détermination du besoin en acides aminés indispensables	36
1.2.4.1. Bilan azoté.....	36
1.2.4.2. Méthode factorielle.....	37
1.2.4.3. Méthodes de traceurs isotopiques.....	38
1.2.4.3.1. Méthode du bilan du traceur.....	38

1.2.4.3.2.Méthode de l'oxydation de l'acide aminé indicateur	40
1.2.5. Utilisation des méthodes « omics » pour déterminer le besoin en protéines et AAI.....	42
1.2.5.1. La métabolomique	42
1.2.5.2. Métabolomique et besoin nutritionnel.....	44
1.3. Impact de la déficience en protéines et acides aminés indispensables sur le métabolisme protéique et énergétique	45
1.3.1. Effet d'une déficience en protéines et acides aminés indispensables sur la prise alimentaire	46
1.3.2. Effet d'une déficience en protéines et acides aminés indispensables sur la dépense énergétique	47
1.3.3. Régulation du métabolisme protéique	48
1.3.4. Organes sensibles à l'apport en protéines et acides aminés indispensables	48
1.3.4.1. Impact de la déficience en protéines et acides aminés indispensables sur le foie	48
1.3.4.2. Impact de la déficience en protéines et acides aminés sur le muscle.....	50
1.3.5. FGF21 et apport protéique.....	52
2. Chapitre II. Travail personnel	55
2.1. Justification et objectifs des travaux.....	55
2.2. Protocole expérimental.....	56
2.3. Conséquences d'une déficience en protéines.....	61
2.3.1. Contexte et objectifs.....	61
2.3.2. Article 1. La déficience sévère en protéines induit l'expression hépatique et plasmatique de FGF21 mais inhibe son expression hypothalamique chez des rats en croissance	62
2.3.2.1. Méthodes	62
2.3.2.2. Résultats principaux et conclusion	62
2.3.2.3. Manuscrit: « Severe protein deficiency induces hepatic expression and systemic level of FGF21 but inhibits its hypothalamic expression in growing rats”	63
2.3.3. Résultats complémentaire: effet de la déficience en protéines sur le métabolisme protéique chez le rat en croissance	89
2.3.3.1. Méthodes	89
2.3.3.2. Résultats	89
2.3.3.3. Discussion	92
2.4. Conséquences d'une déficience en acides aminés indispensables (lysine et thréonine).....	92
2.4.1. Contexte et objectifs.....	92
2.4.2. Article 2. La déficience en lysine et en thréonine induit l'expression hépatique de FGF21 mais affecte différemment la composition corporelle et le métabolisme énergétique chez des rats en croissance.....	93
2.4.2.1. Méthodes	93
2.4.2.2. Résultats et conclusion	93

2.4.2.3. Manuscrit : « Lysine or threonine deficiency induce liver FGF-21 but differently affect body composition and energy metabolism in growing rats	94
2.4.3. Résultats complémentaires: effet de la déficience en acides aminés indispensables (lysine et thréonine) sur le métabolisme protéique chez le rat en croissance.....	118
2.4.3.1. Méthodes	118
2.4.3.2. Résultats principaux	118
2.4.3.3. Discussion	123
2.5. Recherches de biomarqueurs du besoin en protéines et acides aminés indispensables.....	123
2.5.1. Contexte et objectifs	123
2.5.2. Article 3. Identification de biomarqueurs du besoin en protéines et AA.....	124
2.5.2.1. Méthodes	124
2.5.2.2. Résultats principaux et conclusion	125
2.5.2.3. Manuscrit : « Identification of biomarkers of protein and amino acid deficiency	125
2.5.3. Article 4. Le pipecolate et la taurine signe, respectivement, la déficience en lysine et thréonine.....	154
2.5.3.1. Méthodes	154
2.5.3.2. Résultats principaux et conclusion	154
2.5.3.3. Manuscrit : « Pipecolate and taurine sign lysine and threonine deficiency, respectively »	155
3. Chapitre III.Discussion générale et conclusion.....	188
3.1. Effet de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur le métabolisme énergétique	188
3.2. Effet de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur le métabolisme protéique.....	192
3.3. Besoin en protéines et acides aminés indispensables du rat en croissance.....	195
3.4. Biomarqueurs de la déficience en acides aminés indispensables, lysine et thréonine.....	195
3.5. Conclusion.....	199
Références	200
Annexes	226
Abstract.....	255

Remerciements

Ce projet de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide de différentes personnes que je tiens à remercier chaleureusement.

Tout d'abord, je tiens à remercier Sophie Tesseraud (INRAE) et Stéphane Walrand (INRAE) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Jean Dallongeville (Institut Pasteur de Lille), Lucile Martin (Oniris) et Claire Gaudichon (AgroParisTech), d'avoir accepté d'en être les examinateurs, et enfin Daniel Tomé et Delphine Bouveresse d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'invités.

Je remercie Claire Gaudichon de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et d'être la présidente de ce jury de thèse.

Je remercie Daniel Tomé de m'avoir accueilli dans ce laboratoire il y a 3 ans et je le remercie pour ses nombreux conseils lors de la relecture de mes articles et de ce manuscrit.

Je souhaite remercier chaleureusement Dalila Azzout-Marniche de m'avoir fait confiance il y a 4 ans pour défendre ce projet de thèse auprès de l'école doctorale ABIES. Je la remercie pour son encadrement tout au long de cette thèse, pour son aide et son implication dans ce projet. Un grand merci pour tous vos conseils et le partage de votre savoir scientifique.

Je remercie Julien Piedcoq pour son aide à la paillasse, et pour ses conseils avisés sur mes tenues vestimentaires. Après ces 3 années, j'espère avoir réussi à obtenir, enfin, le statut d'être humain.

Je tiens également à remercier Catherine Chaumontet pour l'aide qu'elle m'a apporté durant toutes mes manipulations. Je la remercie pour son énergie et la transmission de ces connaissances notamment pratiques et techniques. Grâce à toi, la notice du Trizol n'a plus de secret pour moi !

Je remercie Patrick Even, sans qui les analyses de calorimétrie indirecte n'auraient pas été possibles. Un grand merci pour sa patience et son aide dans le traitement de ces données. Je le remercie d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions.

Je tiens à remercier Delphine Bouveresse pour son aide dans le traitement des données de métabolomique, et pour sa gentillesse et sa présence. Un grand merci à Anne pour son aide à l'animalerie et pour les dosages. Merci à Nadezda Khodorova pour l'aide technique qu'elle m'a apporté durant les analyses de spectrométrie de masse. Merci à Julianne Calvez pour son aide à l'UPLC. Merci à Morgane Dufay pour tout le travail accompli à l'animalerie pour que nos animaux s'y sentent bien. Une pensée pour mes petits rats. Merci à Angélique Foucault pour son aide pour les PCR. Merci à Vanessa Hudry pour son aide à l'animalerie. Je remercie également Tristan Chalvon-Demersay avec qui l'aventure à PNCA a commencé. Merci pour tes conseils durant cette thèse. Et enfin un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire que je n'ai pas cités. Je garderai un très bon souvenir de mon passage à PNCA.

Merci à Julien Averous et Fabien Jourdan d'avoir participé à mon comité de thèse. Merci pour vos discussions enrichissantes.

Merci à Pierre Fafournoux de m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Nutrition Humaine de l'INRAE de Theix.

Je remercie la plateforme BioMet et l'équipe de Jean-Charles Martin qui a permis la réalisation des analyses de métabolomique.

Je remercie Nicolas Delhay pour son aide technique durant ces 3 années. Et je remercie chaleureusement tous les stagiaires qui ont contribué à faire avancer ce projet : Ana, Yeshna, Gaëtan, Yohan, Maëva et Hugo.

Un immense merci à tous les doctorants avec qui j'ai partagé cette aventure : Alya, Alison, Armelle, Chloé, Erwan, Florence, Gabrielle, Joséphine, Laurianne, Marion, Moufidath, Nathalie, Olivier, Sandra, Simon, Trenton. Ces trois années n'auraient pas été aussi belles sans vous. Merci pour ces discussions sans fin, ces fous rires, votre bienveillance et votre soutien durant cette thèse. Tous ces moments passés ensemble étaient précieux et j'espère qu'ils continueront encore. De belles amitiés ce sont créées. Je garderai de très bons souvenirs de tous ces moments passés ensemble.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis. Je suis chanceuse de tous vous avoir dans ma vie.

Et enfin, je tiens à remercier mes parents. Un immense merci pour votre amour et votre bienveillance. Merci de m'avoir toujours soutenu et encouragé à aller toujours plus loin. Je n'y serai jamais arrivé sans vous.

Je terminerai par remercier mon amoureux. Merci à toi de m'accompagner depuis 12 ans maintenant. Merci pour ton soutien sans failles dans les moments de doutes. Merci de me transmettre ta force, de m'encourager et de me pousser à me surpasser.

Liste des figures

Figure 1. Les 20 acides aminés protéinogènes	17
Figure 2. Digestion des protéines	19
Figure 3. Renouvellement protéique	20
Figure 4. Optimisation de la synthèse protéique (tiré de Gaudichon 2019, FFAS)	21
Figure 5. Schéma de la traduction protéique	23
Figure 6. Activation et assemblage de mTORC1 sur la membrane du lysosome [70]	27
Figure 7. Activation de la voie de signalisation GCN2/ATF4 [86]	28
Figure 8. Régulation de mTORC1 via l'AMPK [92]	30
Figure 9. Les voies de signalisation impliquées dans la réponse à un déficit en acides aminés	30
Figure 10. Effets métaboliques de FGF21 chez la souris et l'homme [100]	31
Figure 11. Modèle du métabolisme protéique chez l'homme [116]	34
Figure 12. Détermination du besoin en AAI par la méthode du bilan du traceur	39
Figure 13. Niveau d'oxydation de l'AA indicateur en réponse à l'apport en AA [134]	41
Figure 14. Les « Omics » [138]	43
Figure 15. Métabolisme hépatique des acides aminés [215]	49
Figure 16. Effet d'une restriction protéique via FGF21 [281]	52
Figure 17. Protocole expérimental	58
Figure 18. Modèle à deux compartiments utilisés pour les mesures in vivo des taux de synthèse protéique	59
Figure 19. Voie de dégradation de la lysine [286]	197
Figure 20. Métabolisme de la thréonine et de la taurine [286]	198

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des enzymes intervenant dans la digestion des protéines et peptides	18
Tableau 2. Besoin d'entretien et besoin de croissance en fonction de l'âge chez l'enfant [116]	36
Tableau 3. Besoin en acides aminés indispensables chez l'enfant [28]	38
Tableau 4. Estimation des besoins en acides aminés indispensables chez l'adulte selon différentes méthodes [116]	41
Tableau 5. Effets de la déficience sévère et modérée en protéines, lysine, ou thréonine sur le métabolisme énergétique, par rapport au groupe contrôle, P20	189
Tableau 6. Effets de la déficience sévère et modérée en protéines, lysine, ou thréonine sur le métabolisme protéique, par rapport au groupe contrôle, P20.	193

Liste des abréviations

4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
¹³C	Carbone 13
AA	Acides aminés
ACP	Analyse en composante principale
AAI	Acides aminés indispensables
AACR	AA à chaînes ramifiées
AARE	Amino Acid Regulatory Element
AMPK	AMP-activated Kinase
aPC	Cortex Piriforme antérieur
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ASNS	Asparagine Synthase
ATF	Activating Transcription Factor
ATG13	AuTophagy-related protein 13
CASTOR1	Cytosolic Arginine Sensor For mTORC1 Subunit 1
CHOP	C/EBP homologous protein
ChREBP	Carbohydrate Response Element Binding Protein
CTD	HisRS-like et C-terminal domain
DAAO	Direct Amino Acid Oxidation
DAPI	Death Associated Protein 1
DIAAS	Digestible Indispensable Amino Acid Score
DEA	Dépense énergétique d'activité
Deptor	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DER	Dépense énergétique de repos
DET	Dépense énergétique totale
eIF	eukaryotic Initiation Factor
eEF	eukaryotic Elongation Factor
eEF2k	eukaryotic elongation factor-2-kinase
EFSA	European Food Safety Authority
eRF	eukaryotic Release Factor
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin-protein ligase
FGF21	Fibroblast Growth Factor 21
FGFR	Récepteurs FGF
FIP200	Family Interacting Protein of 200 kD
FLCN-FNIP	Folliculin-FLCN-interacting protein
GATOR	Gap Activity TOward Rags
GCN2	General Control Nonderepressible 2
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse
GluR1	Glutamate Receptor 1

ICDA	Independent Component-Discriminant Analysis
ICV	Intracérébroventriculaire
IGFBP-1	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1
JNK2	c-Jun NH ₂ -terminal kinase 2
KICSTOR	KPTN ITFG2 C12orf66 and SZT2-containing regulator of mTORC1
KLB	β-klotho
LAMP2A	Lysosome-Associated Membrane Protein Type 2A
LC-MS	Chromatographie en phase liquide
MS	Mass Spectrometry
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
N	Pseudokinase domain
P70S6K	P70S6 kinase
PEMT	PhosphatidylEthanolamine-N-MéthylTransférase
PD-CAAS	Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score
PLS	Partial Least Square
PPARα	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
PRAS40	Proline-Rich Akt Substrate de 40KDa
PK	Protein kinase
Rag	Ragulator
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RMN	Résonnance Magnétique Nucléaire
S6	Ribosomal protein S6
SAMTOR	S-adenosylmethionine sensor for the mTORC1
SESN	Sestrin
SLC	Solute carrier
SLC38A9	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SNC	Système Nerveux Central
SNS	Système nerveux sympathique
TAB	Tissu adipeux brun
Trb3	Tribbles 3
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
ULK1	Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1
WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2

Contexte de réalisation de la thèse

Cette thèse a été réalisée au sein de l'UMR 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA) affiliée à AgroParisTech, à l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE), et à l'Université Paris-Saclay. Ce laboratoire a été dirigé par le Pr Daniel Tomé puis par le Pr Claire Gaudichon, depuis 2018. L'objectif des recherches de l'UMR 914 est de contribuer à l'analyse de l'efficacité nutritionnelle de la composante en protéines de l'apport énergétique dans différentes situations physiologiques ou physiopathologiques. Ce travail de thèse a été dirigé par la Pr Dalila Azzout-Marniche, au sein de l'équipe « Apport Protéique et Régulation de Métabolisme » (APReM) dont les recherches portent sur l'évaluation des conséquences des variations de l'apport protéino-énergétique sur le métabolisme et la physiologie, dans différentes situations physiologiques et pathologiques.

Cette thèse a été financée par une bourse de l'école doctorale ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé) et les travaux de recherche par l'action prioritaire du département AlimH de l'INRAE.

Valorisation scientifique

Articles scientifiques

▪ Publiés

J. Moro, D. Tomé, P. Schmidely, T. Chalvon-Demersay, D. Azzout-Marniche. **Histidine: a systematic review on metabolism and physiological effects in human and different animal species.** *Nutrients*. 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12051414>

T. Chalvon-Demersay, J. Moro, P.C. Even, C. Chaumontet, D. Tomé, J. Averous, J. Piedcoq, C. Gaudichon, A.C. Maurin, P. Fournoux, D. Azzout-Marniche. **Liver GCN2 controls hepatic FGF21 secretion and modulates whole body postprandial oxidation profile under a low-protein diet.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*: 2019. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00022.2019>

▪ Soumis

J. Moro, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Severe protein deficiency induces hepatic expression and systemic level of FGF21 but inhibits its hypothalamic expression in growing rats.** Soumis à *Scientific reports*.

▪ Rédigés

J. Moro, N. Khodorova, D. Tomé, C. Gaudichon, C. Tardivel, J.-C. Martin, D. Azzout-Marniche*, Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse*. **Identification of biomarkers of protein and amino acid deficiency.**

J. Moro, N. Khodorova, D. Rutledge, J.-C. Martin, D. Tomé, C. Gaudichon, C. Tardivel, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse*, Dalila Azzout-Marniche*. **Pipecolate and taurine sign lysine and threonine deficiency respectively.**

G Roisné-Hamelin*, J.Moro*, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Lysine or threonine deficiency induce liver FGF-21 but differently affect body composition and energy metabolism in growing rats.**

J. Moro, A. Blais, I. Denis, C. Chaumontet, P. C. Even, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **FGF23 response to the quality and quantity of protein intake and sign both the lower bone mineral density induced by osteoporosis and protein/amino acid deficiency.**

Communications orales

J. Moro, J. Calvez, C. Chaumontet, P. C. Even, J. Piedcoq, N. Khodorova, N. Loquet, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Severe protein restriction activates liver protein catabolism and ATF4-CHOP-TRB3 pathway to compensate for amino acid deficiency.** *Nutrition 2020*. 1-4 juin 2020.

J. Moro, P. C. Even, C. Chaumontet, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **The consequences of low protein diet on energy intake, energy expenditure and FGF21 expression.** *Nutrition 2020*. 1-4 juin 2020.

Communications affichées

G. Roisné-Hamelin, J. Moro, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Effets d'une déficience en lysine ou thréonine sur le poids corporel, la prise alimentaire, le métabolisme énergétique et les taux de FGF21 plasmatiques chez le rat en croissance.** *Journées Francophones de Nutrition Life*. 25-27 Novembre 2020 ;

J. Moro, N. Khodorova, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Identification de biomarqueurs de sources protéiques déficientes en acides aminés indispensables : lysine et thréonine.** *Journées Francophones de Nutrition*. Nantes (France). 13-15 Décembre 2018.

J. Moro, N. Khodorova, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Molecular markers of dietary essential amino acid-deficiency.** *Nutrition 2019*. Baltimore (USA). 8-11 juin 2019.

J. Moro, A. Blais, C. Chaumontet, P. C. Even, J. Piedcoq, F. Blachier, D. Tomé, C. Gaudichon, D. Azzout-Marniche. **Impact of low protein diet and lysine-deficient diet on bone metabolism.** *Nutrition 2019*. Baltimore (USA). 8-11 juin 2019.

J. Moro, N. Khodorova, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Molecular markers of dietary essential amino acid-deficiency.** *13th European Nutrition Conference*. Dublin (Irlande). 15-18 octobre 2019.

J. Moro, A. Blais, C. Chaumontet, P. C. Even, J. Piedcoq, F. Blachier, D. Tomé, C. Gaudichon, D. Azzout-Marniche. **Impact of low protein diet and lysine-deficient diet on bone metabolism.** *13th European Nutrition Conference*. Dublin (Irlande). 15-18 octobre 2019.

J. Moro, C. Chaumontet, P. C. Even, A. Blais, J. Piedcoq, C. Gaudichon, D. Tomé, D. Azzout-Marniche. **Rôle respectif de FGF21 hépatique et hypothalamique dans le contrôle du métabolisme et de la prise alimentaire selon le niveau du régime.** *Journées Francophones de Nutrition*. Rennes (France). 27-29 Novembre 2019.

Introduction générale

L'apport en protéines est une question particulièrement sensible dans le contexte des débats actuels sur l'augmentation de la population mondiale et des problèmes de malnutrition, et du fait de la nécessité de rééquilibrer les sources alimentaires d'origine animale et végétale pour des raisons à la fois de santé humaine et de durabilité de l'alimentation. La satisfaction des besoins en protéines dans les populations humaines est conditionnée par la quantité de protéines des régimes alimentaires mais aussi par leur qualité définie à partir de leur composition en acides aminés indispensables (AAI) [1].

La malnutrition est une cause importante de mortalité dans le monde, en particulier chez les jeunes enfants. Dans les pays en voie de développement, le risque de malnutrition protéino-énergétique est particulièrement élevé. On estime que près de la moitié des décès d'enfants de moins de 5 ans est causée par la malnutrition [2], touchant principalement les pays en développement et représentant un problème majeur de santé publique dans ces pays [3]. La malnutrition est mise en évidence par différents paramètres tels que le retard de croissance, la cachexie, l'insuffisance pondérale souvent associé à une altération du développement cognitif [4,5]. Parmi les nutriments indispensables pour la croissance et le maintien d'une bonne santé, les protéines, leur quantité et leur qualité, ont un rôle déterminant.

En Afrique par exemple, l'alimentation est principalement basée sur la consommation de céréales, de légumes, de racines ou de tubercules [6]. Il en est de même en Asie, où une grande part de l'apport protéique provient de sources végétales. En Inde, la majeure partie de la population est végétarienne, et leur principale source protéique se trouve dans les céréales telles que le riz, le blé et le millet [7]. Or, ces céréales ont un contenu protéique faible : 100g de bœuf contient 17.7 g de protéines, contrairement à 100g de riz qui n'en contient que 6.7 g. De plus, les protéines qui les composent sont de mauvaises qualités, déficientes en certains AAI. La lysine est notamment le 1^{er} AAI limitant dans les céréales. Ainsi, il y a un risque de ne pas couvrir les besoins nutritionnels en protéines et en AAI avec la consommation de ces sources protéiques, ce qui explique en partie la fréquence de la malnutrition dans ces pays [8].

L'apport protéique doit être optimal pour couvrir les besoins en protéines et en AAI et il est pour cela nécessaire de disposer de méthodes permettant de déterminer précisément ces besoins. Cependant, les méthodes utilisées ont des protocoles invasifs et lourds à mettre en place. De plus, les valeurs de besoins obtenus diffèrent selon la méthode utilisée et ne permettent donc pas la mise en place de recommandations. La FAO recommande alors de développer de nouvelles approches non invasives qui puissent permettre de préciser ce besoin en AAI. L'essor des nouvelles technologies et des sciences « omiques », tel que la métabolomique, semblent être prometteuses pour développer de nouvelles méthodes de mesure des besoins en AAI.

L'objectif de cette thèse est d'évaluer l'impact de la déficience en protéines et en AA strictement indispensables, lysine et thréonine, sur le métabolisme protéique et énergétique, ainsi que d'identifier des biomarqueurs urinaires (non invasif) et plasmatiques (peu invasif) du besoin en ces AAI. La première partie de ce manuscrit, l'introduction bibliographique, est composée de trois parties présentant dans un premier temps le métabolisme protéique et ses différentes régulations, les méthodes de détermination du besoin en protéines et AAI, et l'impact de la déficience en protéines et acides aminés indispensables sur le métabolisme protéique et énergétique. Une seconde partie présente la démarche expérimentale et les résultats obtenus dans le cadre des travaux de thèse. Enfin, dans une troisième partie, les résultats obtenus sont discutés et des perspectives sont proposées.

1. Chapitre I. Introduction bibliographique

1.1. Le métabolisme protéique et son contrôle

1.1.1. Les protéines

Le terme protéine vient du grec « *prôtos* » signifiant premier, essentiel. Les protéines font partie d'une des trois grandes familles de macronutriments comprenant également les glucides et les lipides. Sur le plan biochimique, les protéines sont des macromolécules constituées par un enchainement spécifique d'acides aminés (AA), reliés entre eux par des liaisons peptidiques, qui varient en fonction du nombre, de l'ordre d'enchainement, des proportions relatives des différents AA, ainsi que de leur organisation dans l'espace [9]. Sur un plan physiologique, les protéines sont des constituants majeurs des organismes et des cellules animales et végétales, et ont des rôles essentiels indispensables à la survie des organismes [10]. Elles ont d'une part un rôle structural, en participant à la composition des tissus musculaires, des phanères, de la matrice osseuse et de la peau, et d'autre part, un rôle fonctionnel et de messenger interne grâce aux enzymes, hormones, anticorps, ou récepteurs par exemple. Enfin, sur le plan nutritionnel, les protéines des aliments sont la source majeure d'AA et d'azote et sont aussi des nutriments énergétiques.

1.1.2. Les acides aminés

Les AA sont des molécules qui possèdent une fonction acide carboxylique COOH (extrémité C-terminale), une fonction amine NH₂ (extrémité N-terminale) toutes deux liées à un carbone central appelé carbone α , et une chaîne latérale appelée radical (R), portion variable qui peut se composer de différents éléments (carbone, soufre, azote...). Chez l'homme, 20 AA, dits protéinogènes, entrent dans la composition des protéines. Parmi ces 20 AA, on en distingue trois types (**Figure 1**):

- Les **acides aminés indispensables** (AAI), ce qui signifie qu'il n'y a pas de synthèse *de novo* par l'organisme ou qu'ils sont synthétisés à une vitesse insuffisante par rapport aux besoins de l'organisme et doivent donc être apportés par l'alimentation [11,12]. Parmi ces AAI, deux sont considérés comme strictement indispensables, car ils ne participent pas aux réactions de transamination, ce sont la lysine et la thréonine. La transamination étant le processus d'échange d'une fonction amine primaire entre un acide alpha aminé et un alpha acide cétonique [13].

- Les **acides aminés conditionnellement indispensables**, qui sont synthétisés en quantité insuffisante dans certaines conditions physiologiques ou physiopathologiques et peuvent devenir limitants: arginine, glutamine, glycine, proline, cystéine et tyrosine [14]. C'est notamment le cas de la cystéine chez les prématurés résultant de l'absence de l'activité hépatique de la cystathionase dont le rôle est de cliver la cystathionine en cystéine et acide alpha-cétobutyrique [15,16], ou de l'arginine qui peut être considérée comme indispensable lors d'infection [17].

- Les **acides aminés non indispensables**, qui peuvent être synthétisés par l'organisme à partir de pré-curseurs carbonés et azotés.

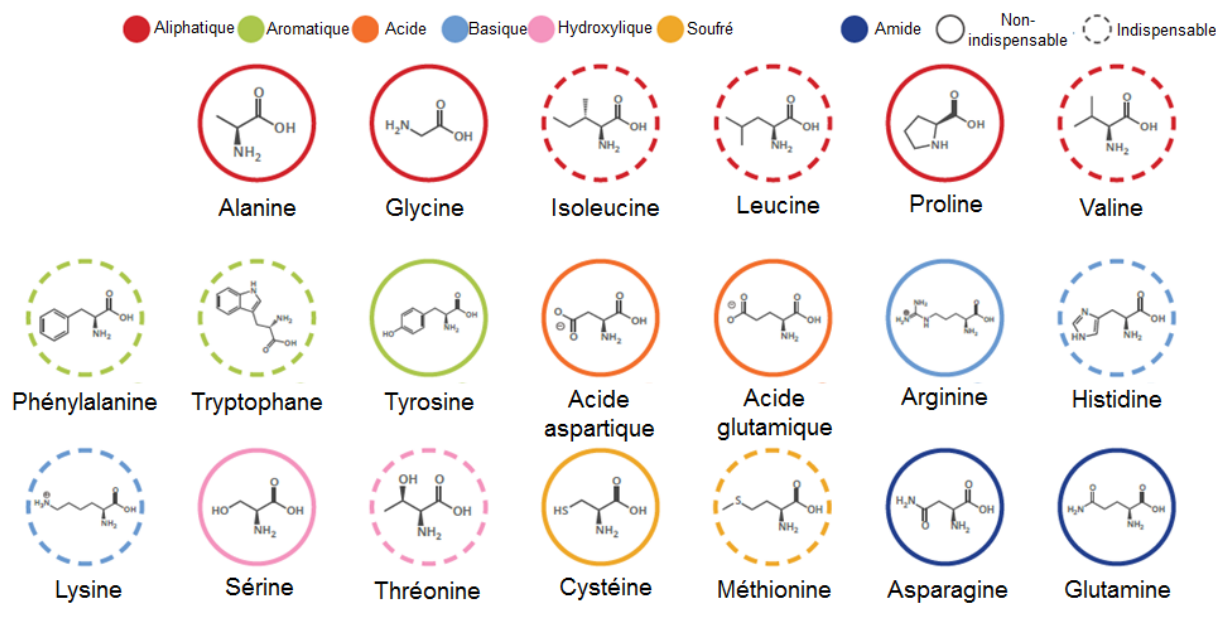


Figure 1. Les 20 acides aminés protéinogènes

20 AA, dits protéinogènes, rentrent dans la séquence des protéines. Ces 20 AA diffèrent dans leur radical carboné qui peut être aliphatique, aromatique, acide, basique, hydroxylique, soufré ou amide. Ils peuvent être non-indispensables ou indispensables, dans ce dernier cas, il est nécessaire qu'ils soient apportés par l'alimentation. Les AAI sont entourés de traits pointillés alors que les non indispensables, de traits pleins. Les couleurs représentent les groupes d'AA en fonction de la nature du radical carboné (Compoundchem.com).

1.1.3. Digestion et absorption des protéines alimentaires

1.1.3.1. Le processus digestif

La digestion des protéines alimentaires débute avec la mastication et l'action des enzymes salivaires [18]. Leur dégradation commence au niveau de l'estomac sous l'action d'une protéase, la pepsine [19]. La pepsine est sécrétée par les cellules principales de l'estomac sous forme de pepsinogène, forme inactive de l'enzyme. Puis, l'acide chlorhydrique, sécrété par les cellules pariétales de la muqueuse gastrique, va d'une part permettre d'hydrolyser le pepsinogène pour obtenir la pepsine, forme active de l'enzyme, et d'autre part va provoquer une dénaturation des structures tertiaires et quaternaires des protéines favorisant ainsi l'accès des enzymes digestives aux liaisons peptidiques. La pepsine est une endopeptidase clivant les protéines au niveau des liaisons peptidiques, à l'extrémité C-terminale des AA aromatiques.

Le chyme entre ensuite au niveau de l'intestin, où les oligopeptides continuent d'être dégradés grâce aux différentes enzymes pancréatiques. Les protéases pancréatiques sont d'abord sécrétées sous forme de zymogène, sous forme non active. Le précurseur de la trypine est clivé pour former la trypine active

qui catalyse le clivage des autres zymogènes en leur forme active : chymotrypsine, élastase et carboxypeptidases. Ces différentes endopeptidases et exopeptidases (**Tableau 1**) permettent de dégrader les oligopeptides en AA libres et di- et tripeptides. Les endopeptidases, trypsine, chymotrypsine, et élastase, hydrolysent les protéines en clivant les liaisons peptidiques qui se trouvent au centre de la protéine, alors que les exopeptidases et carboxypeptidases, clivent les protéines à leurs extrémités, libérant les AA en bout de chaîne [20].

Tableau 1. Caractéristiques des enzymes intervenant dans la digestion des protéines et peptides

Enzyme	Origine	Activateurs	Action	Points de clivage	Produits
Pepsine	Estomac	Autoactivation	Endopeptidase	Tyr, Phe, Leu, et Asp	Large oligopeptides et AA libres
Trypsine	Pancréas	Entéropeptidase et trypsine	Endopeptidase	Arg, Lys, et AA basiques	Oligopeptides (2 à 8 AA)
Chymotrypsine	Pancréas	Trypsine	Endopeptidase	Tyr, Trp, Phe, Leu, Gln, Met	Oligopeptides (2 à 8 AA)
Elastase	Pancréas	Trypsine	Endopeptidase	Ala, Gly, Tyr, Phe, Trp	Oligopeptides (2 à 8 AA)
Carboxypeptidase	Pancréas	Trypsine	Exopeptidase	AA situés à l'extrémité carboxylique	AA libres
Aminopeptidase	Bordure en brosse intestinale		Peptidase	Arg, Leu, Met, Glu, Asp	AA libres
Di et tripeptidase	Cytoplasme des entérocytes		Peptidase		AA libres

Dans la lumière intestinale, les polypeptides et protéines digérés se retrouvent à 30% sous forme d'AA libres et 70% sous forme d'oligopeptides (2 à 8 AA) [21]. Puis la muqueuse de l'intestin assure la poursuite de l'hydrolyse des oligopeptides et l'absorption des AA, intervenant principalement au niveau du duodénum et jéjunum [22]. Les AA libres et les di- et tripeptides sont transférés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes grâce des transporteurs spécifiques. Dans le cytoplasme des entérocytes, les di- et tripeptides sont hydrolysés en AA libres par l'action des di- et tri-peptidases. Une partie des AA absorbés est utilisée par les entérocytes [23], l'autre partie rejoint la circulation sanguine par la veine porte, puis est transférée vers les différents organes et tissus (Figure 2). Les entérocytes utilisent environ 10% des AA absorbés pour leur propre métabolisme, principalement l'aspartate, le glutamate et la glutamine. La glutamine est le principal substrat énergétique de l'entérocyte [23]. Le glutamate et la glutamine permettent la synthèse d'alanine, de lactate, de proline, d'ornithine et de citruline [24–26].

Les protéines présentes dans la lumière intestinale sont issues des protéines alimentaires, mais s'ajoutent à celles-ci des protéines dites endogènes [20]. Twombly et Meyer [27] ont montré que chez le rat nourri avec un régime protéoprive, la sécrétion endogène de protéines était d'environ 150 mg/j. Ces protéines endogènes, correspondent aux protéines des cellules desquamées, aux protéines des sécrétions salivaires, gastriques, intestinales, biliaires et pancréatiques servant à assurer le processus digestif, ainsi que des protéines d'origine plasmatique (albumine, immunoglobuline, etc.) recyclées par diffusion dans la lumière de l'intestin.

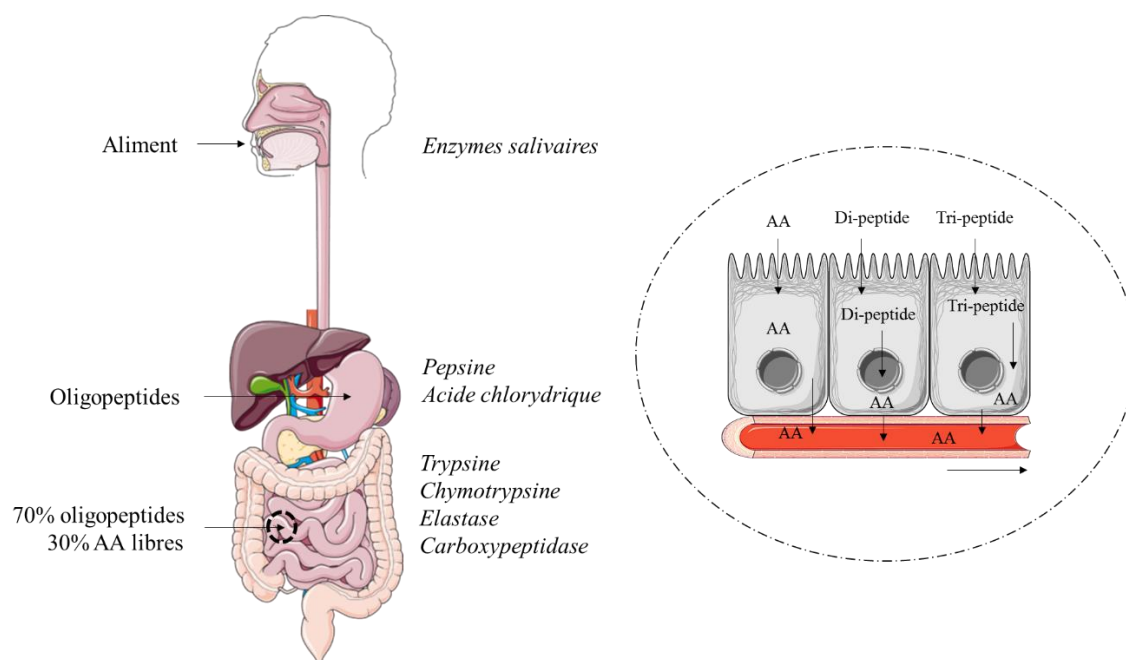


Figure 2. Digestion des protéines

Les aliments sont ingérés et dégradés par l'action mécanique de la mastication et l'action chimique des enzymes salivaires. Les protéines alimentaires rejoignent ensuite l'estomac où elles seront dégradées par une protéase, la pepsine, avec l'aide de l'acide chlorhydrique, donnant des oligopeptides. Au niveau de l'intestin, des protéases pancréatiques (trypsine, chymotrypsine, elastase et carboxypeptidase) vont cliver les oligopeptides en AA libres et oligopeptides (de 2 à 8 AA), avec une proportion de 30% et 70%, respectivement. Les AA libres traversent la membrane des entérocytes à l'aide de transporteurs. Les di- et tripeptides sont transportés à l'intérieur des entérocytes grâce à un transporteur, majoritairement Pept-1. Des di- et tripeptidases vont permettre leur dégradation en AA libres, qui pourront alors rejoindre la circulation sanguine via la veine porte, pour être métabolisés par les différents organes et tissus. Une partie des AA est métabolisée dans les cellules intestinales.

1.1.3.2. Facteurs influençant la digestion et l'absorption des protéines

Les protéines diffèrent entre elles par leur composition et leur structure qui influencent leur digestibilité, leur absorption et leur efficacité nutritionnelle. La notion de digestibilité des protéines correspond à la quantité absorbée d'une protéine par rapport à la quantité ingérée [28]. Sa mesure est généralement réalisée par différence en déterminant la fraction non absorbée au niveau de la partie distale de l'intestin grêle. Il a été montré que la digestibilité des protéines d'origine végétale est, le plus souvent, inférieure à celle des protéines d'origine animale, de 85 à 92% contre 95% respectivement [29].

La digestibilité peut être influencée par différents facteurs tels que la matrice et la transformation des aliments. Certaines sources de protéines végétales ont des structures résistantes à la digestion qui protègent les protéines, ainsi que des facteurs antinutritionnels (tanins, inhibiteurs de protéases, etc...) rendant difficile la dégradation des protéines lors de la digestion [30]. La transformation des aliments, comme la cuisson, peut également provoquer des réactions qui réduisent la digestibilité de certains AA, ce qui est notamment le cas de la lysine impactée par la réaction de Maillard, diminuant ainsi sa biodisponibilité [31].

La vitesse de digestion varie également selon les protéines. Ces différences de vitesse se traduisent par des différences dans la cinétique de transfert plasmatique des acides aminés, qui influencent la synthèse et la dégradation protéique. Selon la vitesse d'apparition des AA dans le sang, on distingue deux types de protéines : les protéines dites lentes, comme les caséines, et les protéines dites rapides, comme les protéines sériques du lait [32]. La différence de vitesse d'absorption entre ces deux protéines s'explique par une différence au niveau de la vidange gastrique qui est plus lente pour la caséine, retardant son arrivée au niveau de l'intestin grêle [32].

1.1.4. Le contrôle du pool protéique

Le compartiment des protéines corporelles représente 10-12 kg chez un homme adulte de 70 kg [10]. Près de la moitié des protéines corporelles est localisée au niveau du muscle squelettique (42%), 15% se retrouve au niveau de la peau, de l'os et du sang, 10% au niveau des tissus viscéraux, et le reste dans les autres tissus et organes. La durée de vie des protéines est limitée, elles doivent être en permanence renouvelées pour assurer l'entretien des tissus et les fonctions physiologiques de l'organisme. Afin d'assurer le maintien de la masse des protéines corporelles et de leurs fonctions, deux voies métaboliques interviennent, la protéolyse et la synthèse protéique.

Chaque jour a donc lieu un renouvellement du pool protéique : une partie des protéines est dégradée lors de la protéolyse, alors que de nouvelles protéines sont synthétisées grâce à la protéosynthèse (**Figure 3**). Chez l'adulte en bonne santé, le renouvellement de protéines est estimé à 250-300g par jour (2% en moyenne) ce qui permet à l'organisme de s'adapter en permanence aux différentes conditions physiologiques et nutritionnelles [18].

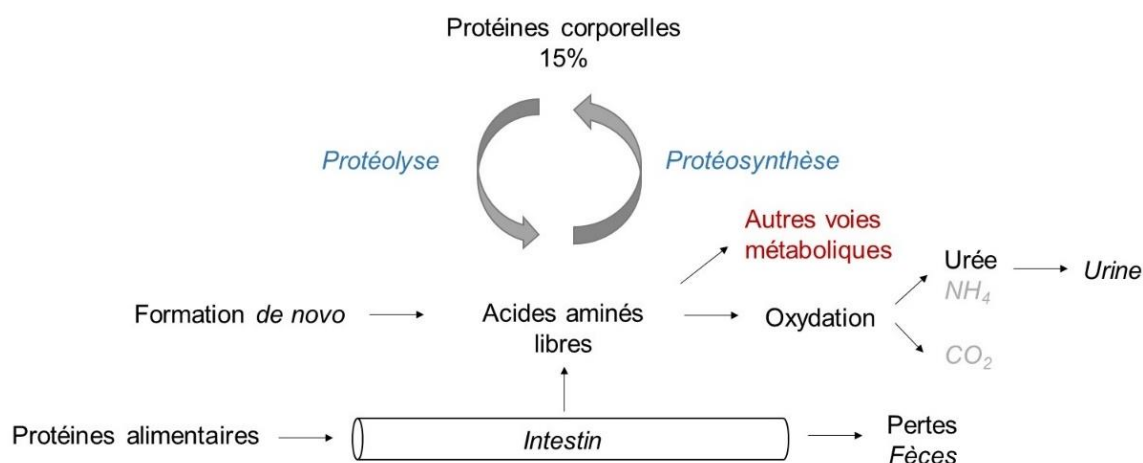


Figure 3. Renouvellement protéique

Les protéines corporelles sont en constant renouvellement. Une partie des protéines est dégradée par protéolyse tandis qu'une autre est synthétisée à partir du pool d'AA libres. Ces AA libres proviennent de l'alimentation, de la protéolyse, ou de la formation *de novo*. Les AA restants permettront la synthèse de composés spécifiques, ou seront dégradés par oxydation conduisant à la production d'urée, et de dioxyde de carbone (CO₂).

Pour que le renouvellement protéique puisse se dérouler correctement, il est important que tous les AAI soient apportés en quantité suffisante [33]. Une protéine ne peut être synthétisée que si tous les AA qui la compose sont disponibles simultanément et en quantité suffisante [34] (**Figure 4**). Dans le cas où l'un des AAI est en déficit, il limite la protéosynthèse. Les autres AA s'accumulent et ne pouvant être stockés par l'organisme, ils sont éliminés par oxydation, ou participe à la synthèse de composés spécifiques (glucose, corps cétoniques) [35].

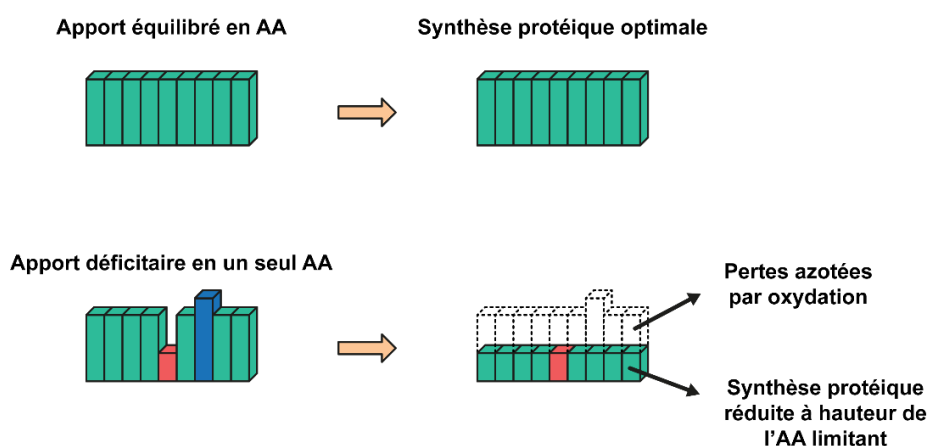


Figure 4. Optimisation de la synthèse protéique (tiré de Gaudichon 2019, FFAS)

Pour que la synthèse protéique soit optimale, l'apport en AA doit être équilibré. L'apport déficitaire en un seul AAI suffit à ralentir la synthèse protéique à hauteur de cet AAI qualifié d'AAI limitant, représenté en rouge.

1.1.4.1. Renouvellement des protéines corporelles via la synthèse protéique

Les AA sont les précurseurs de la synthèse des protéines corporelles. Chaque protéine présente un taux de renouvellement spécifique génétiquement programmé et contrôlé par l'équilibre entre anabolisme et catabolisme, et dépendant aussi des situations physiologiques, physiopathologiques et de l'environnement nutritionnel [10]. La vitesse de renouvellement protéique diffère selon les tissus. En effet, les protéines du foie et de l'intestin ont une vitesse de renouvellement très rapide, d'environ une semaine, alors que les protéines du muscle ont un renouvellement plus lent, de l'ordre de plusieurs mois. De plus, le renouvellement protéique diminue avec l'âge, il passe de 17.4 g/kg/j chez le nourrisson, à 3.0 g/kg/j chez l'adulte et seulement 1.9 g/kg/j chez le sujet âgé [1].

Au sein des cellules, la synthèse de protéines se déroule en différentes étapes. La première étape est la transcription, qui a lieu dans le noyau par transfert du code génétique de l'ADN à l'ARN messenger (ARNm). Elle se réalise en quatre étapes : initiation, élongation, terminaison et maturation. La transcription est régulée par des activateurs et des répresseurs transcriptionnels. Les AA sont notamment capables de réguler l'expression de certains gènes cibles en agissant au niveau de l'initiation de la transcription [36–39]. Différents travaux ont montré que l'expression de l'*Asparagine Synthase* (ASNS) [37], *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 1* (IGFBP-1) [39], et *C/EBP homologous protein* (CHOP) [38] est augmentée en réponse à une déficience en AA. Cette régulation se fait via un élément de réponse

aux AA, appelé *Amino Acid Regulatory Element* (AARE), localisé dans les promoteurs de ces gènes [40] et fait intervenir deux facteurs de transcription de la famille des *Activating Transcription Factor* (ATF), ATF4 et ATF2. La déficience en AA active la traduction d'ATF4 et la phosphorylation d'ATF2 qui se fixent alors sur l'élément de réponse AARE, activant la transcription de gènes cibles [41].

L'ARNm est ensuite transporté du noyau vers le cytosol, où il est traduit en protéine. C'est l'étape de traduction. L'ARNm, porteur du code génétique, est composé de codons, ou triplets de nucléotides, qui seront traduits en AA spécifiques et assemblés en chaînes polypeptidiques. La traduction se déroule en trois temps : initiation, élongation et terminaison (**Figure 5**) [42].

- L'initiation : cette étape commence par la formation d'un complexe de pré-initiation 43S, formé de la petite sous-unité du ribosome (40S), de facteurs d'initiation *eukaryotic Initiation Factor* (eIF) (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF5), de l'ARN de transfert (ARNt) chargé avec une méthionine, ainsi que de GTP lié à la sous unité γ d'eIF2 [42]. Dans le même temps, le complexe eIF4A-eIF4B-eIF4E-eIF4G s'associe à l'ARNm. Grâce au facteur d'initiation eIF3, le complexe de pré-initiation 43S, le complexe eIF4 et l'ARNm s'assemblent [43]. L'activité hélicase du facteur eIF4 permet de supprimer les appariements intramoléculaires des bases et le déplacement du complexe de pré-initiation le long de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation, le codon AUG. Le GTP est alors hydrolysé en GDP, les facteurs d'initiation se détachent du complexe, et la sous unité ribosomique 60S se fixe à la sous-unité 40S [44]. L'étape d'élongation peut ainsi débuter.

- L'élongation : les AA sous forme active, associés à un ARNt, s'associent les uns aux autres pour former une chaîne polypeptidique. L'ordre des AA dépend de la séquence des codons qui compose l'ARNm. Cette étape nécessite l'intervention des facteurs d'élongation *eukaryotic Elongation Factor* (eEF). Un complexe AA-ARNt-eEF1A-GTP se forme et lorsqu'un ARNt possède un anticodon complémentaire du codon de l'ARNm, il s'apparie au niveau du « site A » du ribosome. Le GTP est alors hydrolysé, le facteur eEF1A se dissocie, et la liaison entre la méthionine et le second AA est créée.

Une fois le second AA lié au premier, le ribosome se déplace d'un codon grâce au facteur eEF2 et à l'hydrolyse d'un GTP, on parle de translocation. L'ARNt qui portait le second AA se dissocie alors du ribosome et laisse place à un nouvel ARNt. Ce processus se répète jusqu'à atteindre un codon stop indiquant que l'étape d'élongation est terminée [45,46]. Un ARNm peut être traduit par plusieurs ribosomes en même temps, l'ensemble étant appelé polysome [47].

- La terminaison : lorsqu'un ribosome arrive au niveau d'un codon stop, UGA, UAG ou UAA, qui ne correspond à aucun AA, des facteurs de terminaison *eukaryotic Release Factors* (eRF1 et eRF3) entrent en jeu. Le facteur eRF1 reconnaît l'un des trois codons stop, et se lie au ribosome à la place d'un ARNt. Une molécule de GTP est hydrolysée entraînant la dissociation des deux sous-unités du ribosome et la libération de la chaîne polypeptidique dans le cytoplasme, où elle peut subir des modifications post-traductionnelles [48].

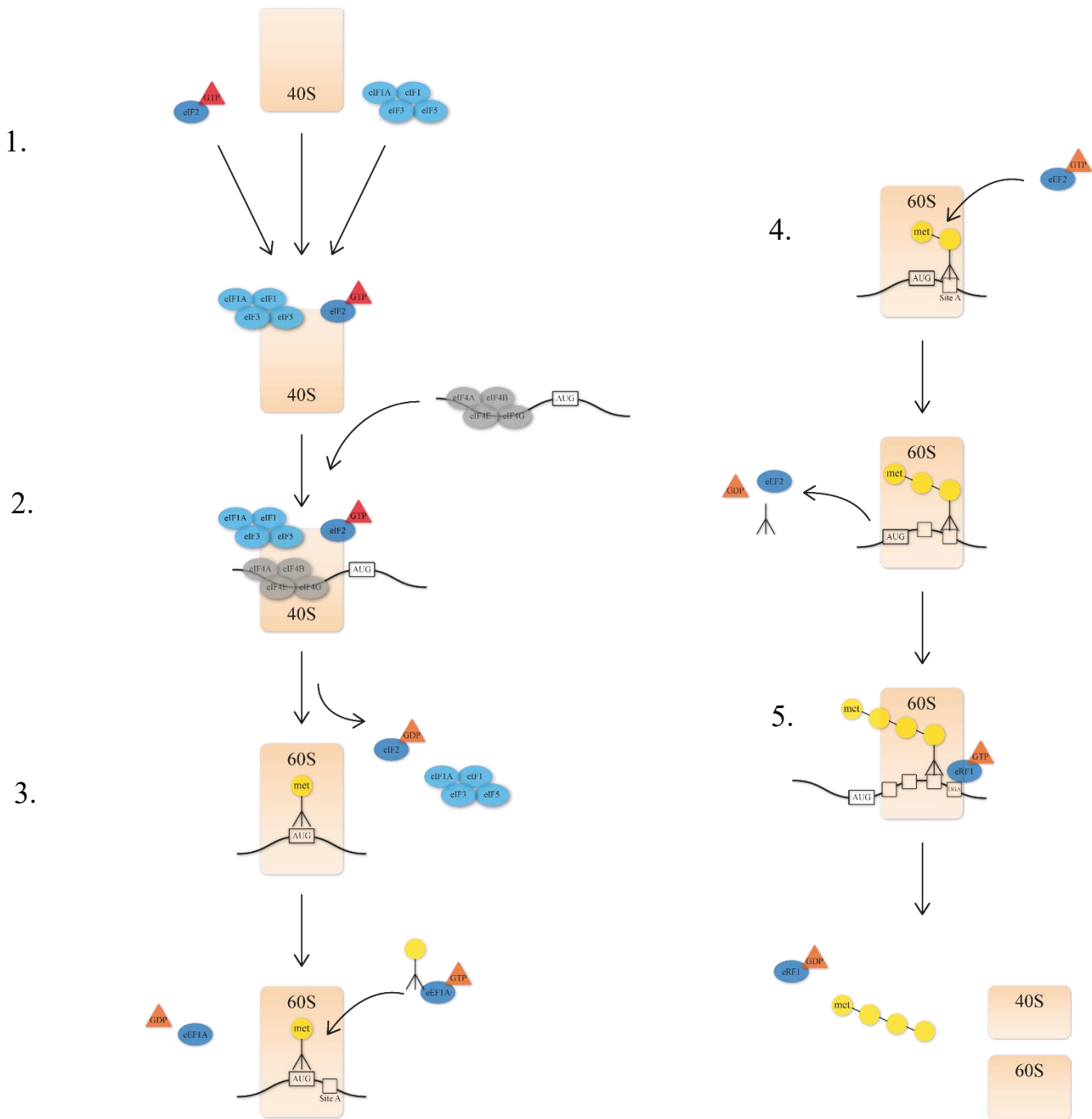


Figure 5. Schéma de la traduction protéique

1. La petite sous-unité du ribosome (40S), les facteurs d'initiation eukaryotic Initiation Factor (eIF) (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF5), l'ARN de transfert (ARNt) chargé avec une méthionine, ainsi que le GTP lié à la sous unité γ d'eIF2 s'associent pour former le complexe de pré-initiation 43S. Dans le même temps, le complexe eIF4A-eIF4B-eIF4E-eIF4G s'associe à l'ARNm. **2.** Le complexe de pré-initiation 43S, le complexe eIF4 et l'ARNm s'associent grâce au facteur eIF3. Le complexe de pré-initiation se déplace alors le long de l'ARNm jusqu'au codon d'initiation, AUG, grâce à l'activité hélicase du complexe eIF4 qui permet de supprimer les appariements intramoléculaires des bases. **3.** Le GTP est hydrolysé en GDP, les facteurs d'initiation se détachent du complexe et la sous unité ribosomique 60S se fixe ainsi à la sous-unité 40S. **4.** L'étape d'élongation débute. Les AA vont être liés les uns aux autres. **5.** Lorsqu'un ribosome arrive au niveau d'un codon stop, l'élongation s'arrête. L'hydrolyse du GTP entraîne la dissociation des deux sous-unités du ribosome, et la chaîne polypeptidique est libérée dans le cytoplasme.

1.1.4.2. La dégradation des protéines : la protéolyse

A l'intérieur d'une cellule, le niveau de protéines varie selon le rapport entre protéosynthèse et protéolyse. La demi-vie d'une protéine est variable, pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours [49]. Les protéines rapidement dégradées sont des protéines de régulation, comme les facteurs de transcription ou les hormones, permettant d'ajuster le signal en fonction des situations physiologiques et nutritionnelles, ou certaines protéines hépatiques telles que l'ApoB.

Il existe quatre voies de protéolyses chez les eucaryotes :

- **La voie ubiquitine-protéasome:** c'est la principale voie de dégradation des protéines nucléaires et cytosoliques. L'ubiquitine, un polypeptide de 76 AA, est activée par l'enzyme E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) par suite de la formation d'une liaison thioester, puis est transférée sur une seconde enzyme E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*). Dans la majorité des cas, l'ubiquitine est ensuite transférée sur une troisième enzyme E3 (*ubiquitin-protein ligase*), responsable de la reconnaissance du substrat. L'ubiquitine se fixe ainsi sur la protéine à dégrader au niveau de la chaîne latérale d'un résidu lysine [49]. Dans certains cas, E2 permet la reconnaissance du substrat sans l'intervention de E3. D'autres ubiquitines vont ensuite s'ajouter pour former une chaîne d'ubiquitine sur la protéine à dégrader. Les protéines polyubiquitinylées sont alors reconnues et dégradées par le protéasome. Le protéasome est un complexe enzymatique multiprotéique qui reconnaît les protéines ubiquitinylées. Les ATPases déplient la protéine permettant son passage à l'intérieur du protéasome. Elle est alors dégradée dans la chambre protéolytique, contenant des sites actifs peptidasiques [50], en oligopeptides de 3 à 20 AA, et l'ubiquitine est recyclée. Les oligopeptides sont ensuite dégradés en AA grâce à l'action des carboxypeptidases et des aminopeptidases cellulaires [51].

- **La voie lysosomale ou autophagie:** elle fait intervenir les lysosomes, organites intracellulaires contenant des enzymes digestives tels que des protéases (cathepsines, carboxypeptidases). La voie lysosomale permet la dégradation de protéines intracellulaires, extracellulaires, membranaires ou d'organelles [52]. Il apparaît que les protéines dégradées via cette voie de dégradation contiennent une séquence KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), et sont des protéines à longue demi-vie [49]. La dégradation des protéines via la voie lysosomale peut se faire selon quatre processus d'autophagie différents [53] :

- La macroautophagie : elle permet la dégradation de protéines solubles et d'organelles. Le complexe ULK1/ATG13/FIP200 (*Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1 / AuTophaGy-related protein 13 / Family Interacting Protein of 200 kD*) initie la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, qui se forme en englobant la protéine ou l'organelle à dégrader. Ce dernier fusionne alors avec un lysosome grâce à des protéines transmembranaires, *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor* (SNARE). Les enzymes du lysosome permettent alors la dégradation des éléments à l'intérieur de la vésicule.

- La microautophagie : grâce à une invagination de la membrane du lysosome, elle permet le passage du matériel cytosolique à l'intérieur de celui-ci afin d'être dégradé par ses protéases.
- L'autophagie médiée par les chaperonnes : des protéines chaperonnes reconnaissent les protéines à dégrader grâce à leur séquence KFERQ et s'associent à elles. Les protéines chaperonnes sont reconnues par des récepteurs membranaires à la surface du lysosome, *Lysosome-Associated Membrane Protein Type 2A* (LAMP2A). Une fois les protéines stabilisées au niveau du récepteur, elles sont transloquées à l'intérieur du lysosome puis dégradées.

- **Les calpaïnes** : ce sont des cystéines protéinases. Leurs substrats sont majoritairement cytoplasmiques comprenant les protéines du cytosquelette, et les protéines nucléaires avec certains facteurs de transcription. Leur action est dépendante du calcium [54]. Il existe deux types de calpaïnes qui se différencient par la concentration en calcium nécessaire à leur activation. Les calpaïnes de type I sont activées par des concentrations en Ca^{2+} inférieures à 1 mM, alors que les calpaïnes de type II le sont avec des concentrations en Ca^{2+} supérieure à 1 mM. L'action de ces calpaïnes est également régulée par une protéine, la calpastatine, qui a une activité inhibitrice [55,56].

- **Les caspases** : elles appartiennent à la famille des protéases à cystéine (*cysteine-dependant aspartate-directed proteases*). Elles sont impliquées dans les phénomènes de morts cellulaires programmées, comme l'apoptose et la pyroptose. Les caspases sont présentes sous forme inactive dans le cytoplasme, appelées procaspases. Il existe deux types de caspases jouant un rôle dans l'apoptose. D'une part, les caspases initiatrices (caspase-2 ; caspase-8 ; caspase-9 ; caspase-10) qui sont activées suite au clivage et à la dimérisation de leurs sous-unités pour former une protéine tétramérique active. D'autre part, les caspases effectrices (caspase-3 ; caspase-6 ; caspase-7) qui sont exprimées sous forme de dimères, sont clivées au niveau de leurs sous-unités par des molécules initiatrices ou par autoprotéolyse, ce qui induit leur activation [57]. Ces dernières ont une activité protéolytique, et clivent leur substrat à l'extrémité C-terminal au niveau d'un résidu aspartate, glutamate ou plus rarement au niveau d'une phosphosérine [58].

1.1.5. Signalisation des acides aminés

Au-delà de leur propre rôle métabolique, certains nutriments ont la capacité d'avoir un rôle de régulateur des fonctions cellulaires. C'est le cas des AA, qui en plus de leur rôle de constituant des protéines et de source d'énergie, ont un rôle de signalisation. La disponibilité en AA régule des processus physiologiques cellulaires grâce au contrôle de certaines voies de signalisation et de l'expression de certains gènes.

1.1.5.1. Signalisation cellulaire : GCN2, AMPK et mTOR

Les AA ont un rôle régulateur au niveau transcriptionnel et traductionnel [59–61]. Le contrôle des AA sur les voies métaboliques se fait via des voies de signalisation intracellulaire d'AA. Les voies de signalisation qui sont impliquées dans la détection des AA sont les voies mammalian Target Of Rapamycin (mTOR), General Control Conderepressible 2 (GCN2), et AMP-activated Kinase (AMPK).

1.1.5.1.1. mTOR

mTOR est une sérine/thréonine kinase ayant un rôle clé dans la détection des AA. mTOR est impliqué dans la régulation de la croissance cellulaire, de la prolifération et de la synthèse protéique [62,63]. Chez les mammifères, mTOR est présent sous forme de deux complexes distincts, mTORC1 et mTORC2 [64]. mTORC1 est composé de la sous-unité catalytique mTOR, de deux sous-unités régulatrices *Proline-Rich Akt Substrate de 40KDa* (PRAS40), et Raptor, associée à mTOR. Le complexe mTORC2 est quant à lui composé de mTOR, et de la protéine Rictor. La protéine *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (Deptor) et une protéine associée à la sous-unité β du complexe protéique G/LST8 (mLST8/G β L) sont communes à mTORC1 et mTORC2 [65–67]. mTORC1 a la propriété d'être inhibé par la rapamycine, et est sensible aux nutriments et facteurs de croissance, contrairement à mTORC2 qui est insensible aux nutriments et à la rapamycine, et a un rôle dans la survie cellulaire et la réorganisation du cytosquelette [68]. L'activité de mTOR est régulée par phosphorylation.

L'assemblage et l'activation de mTORC1 se déroule au niveau de la membrane des lysosomes (**Figure 6**). La présence d'AA va empêcher l'inhibition de *Gap Activity TOWard Rags 2* (GATOR2) par *Cytosolic Arginine Sensor For mTORC1 Subunit* (CASTOR) et Sestrin (SESN) via l'arginine et la leucine, respectivement. GATOR2 inhibe alors GATOR1, qui est également inhibé par la méthionine qui empêche son activation via *S-AdenosylMethionine sensor for the mTORC1* (SAMTOR). L'inhibition de GATOR1 permet l'activation des *Ragulator* (Rag) GTPases. Les Rag GTPases sont également activées par *Folliculin* (FLCN), *Ragulator*, *KPTN ITFG2 C12orf66 and SZT2-containing regulator of mTORC1* (KICSTOR) et *Sodium-coupled neutral amino acid transporter 9* (SLC38A9). Après leur activation, les Rag se lient à mTORC1 et induisent sa localisation à la surface du lysosome.

Une fois mTORC1 à la surface du lysosome, son activité kinase est stimulée par la protéine *Ras homolog enriched in brain* GTPase (Rheb) [69] en réponse à l'énergie, aux facteurs de croissance ou à l'insuline [70]. La translocation de mTORC1 sur la membrane des lysosomes et son activation par Rag GTPases et les protéines Rheb, stimulé par les AA et les facteurs de croissance, provoque une activation de la synthèse protéique au niveau de l'étape de l'initiation de la traduction et une inhibition de la protéolyse, alors que la diminution de la concentration en AA diminue son assemblage réduisant ainsi la synthèse protéique et augmentant l'autophagie et donc la protéolyse [71].

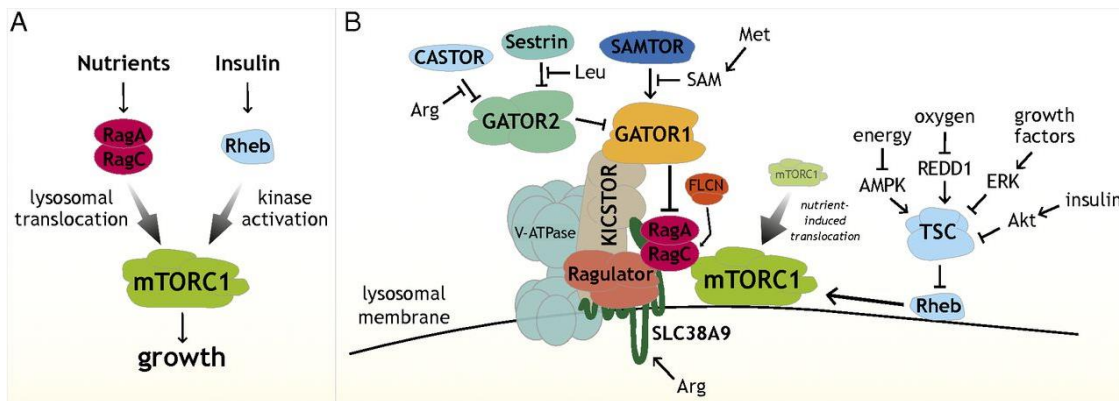


Figure 6. Activation et assemblage de mTORC1 sur la membrane du lysosome [70]

(A) La présence de nutriments, en particulier les AA, permettent aux Rag GTPases d'induire la translocation de mTORC1 au niveau de la membrane lysosomale. Puis, la protéine Reg stimule l'activité kinase de mTORC1 en réponse à l'insuline et aux nutriments. (B) Les Rag GTPases sont régulées par différents complexes protéiques, eux-mêmes régulés par les niveaux d'AA.

La traduction protéique est régulée par mTORC1 via son action sur ces deux cibles, *Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1) et *P70S6 kinase* (P70S6K), qui sont impliqués dans le contrôle de l'initiation de la traduction. mTORC1 premièrement active par phosphorylation la protéine kinase P70S6K, qui à son tour phosphoryle la *ribosomal protein S6* (S6). Cette protéine est un composant de la sous-unité ribosomale 40S et permet alors l'initiation de la traduction [72]. En parallèle, mTORC1 phosphoryle 4E-BP1, ce qui réduit son affinité pour le facteur eIF4E ce qui le libère et permet sa liaison avec le facteur d'initiation eIF4G permettant la formation d'un complexe d'initiation de la traduction avec la sous-unité ribosomale 40S [73,74].

En plus de son effet sur la protéosynthèse, mTORC1 contrôle la protéolyse en régulant le processus d'autophagie, permettant ainsi aux cellules de s'adapter à des carences en nutriments [75]. Pour cela, en présence d'AA et de facteurs de croissance, l'activation de mTORC1 phosphoryle et inhibe le complexe ULK1/Atg13/FIP200, qui est requis pour initier l'autophagie. Il apparaît également qu'il agit sur d'autres effecteurs tels que *Death Associated Protein 1* (DAP1) qui est un suppresseur de l'autophagie et *WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2* (WIP1), régulateur de la formation d'autophagosome [68,76].

1.1.5.1.2.GCN2

GCN2 est une sérine/thréonine kinase impliquée dans le métabolisme énergétique et le contrôle de la synthèse protéique en contrôlant l'étape de traduction des ARNm [77]. Cette kinase, activée par phosphorylation, se compose de différents domaines (pseudokinase domain (N), protein kinase (PK), HisRS-like et C-terminal domain (CTD)) [78].

GCN2 est défini comme le senseur du déficit en AA. Lorsqu'il y a une déficience en AA, la cellule est capable de la détecter, et de déclencher des réponses adaptatives conduisant à l'inhibition de l'initiation

de la traduction via GCN2 5 (**Figure 7**) [79]. Lorsqu'un AA est en déficit, les ARNt libres augmentent au sein de la cellule. Grâce à son domaine HisRS-like (domaine homologue à l'histidyl-tRNA synthetase) et CTD, GCN2 se lie aux ARNt non chargés [77,79]. Cette liaison induit un changement de conformation allostérique au sein de GCN2, entraînant son auto-activation par phosphorylation. En retour, GCN2 phosphoryle le facteur *eukaryotic Initiation Factor 2α* (eIF2α) au niveau de la sous-unité α, responsable de l'initiation du complexe de traduction [77]. En effet, eIF2α fournit aux ribosomes les méthionyl-tRNA en hydrolysant son GTP en GDP durant la première étape de la traduction. La phosphorylation d'eIF2α par GCN2 au niveau de la sérine 51, empêche le recyclage du GDP en GTP par le facteur d'initiation de la traduction eIF2B. eIF2α est dans ces conditions inactif et ne peut plus fournir les méthionyl-tRNA aux ribosomes [80].

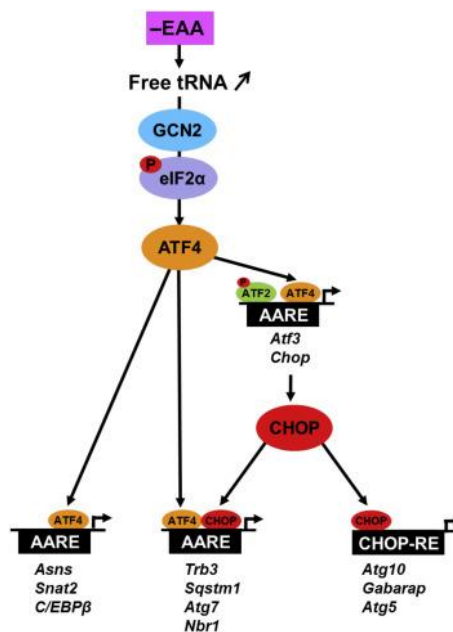


Figure 7. Activation de la voie de signalisation GCN2/ATF4 [86]

La déficience en AAI (EAA : *essential amino acid*) induit l'augmentation des ARNt libres qui permettent l'activation de GCN2. GCN2 phosphoryle en retour eIF2α qui augmente la traduction du facteur de transcription ATF4. La déficience en AAI induit également la phosphorylation d'ATF2. ATF4 et ATF2 activent la transcription de gènes cibles, en se fixant sur la séquence AARE au niveau du promoteur des gènes. Le gène CHOP est transcrit et peut à son tour induire la transcription de certains gènes, impliqué dans les processus d'autophagie, en se liant à la séquence AARE avec ATF4, ou à la séquence CHOP-RE.

La phosphorylation d'eIF2α entraîne d'une part l'inhibition de la synthèse protéique, d'autre part l'augmentation de la traduction du facteur de transcription ATF4. En parallèle, la déficience en un AA induit la phosphorylation d'ATF2 [41], indépendamment de la voie GCN2. ATF2 est phosphorylé par *c-Jun NH₂-terminal kinase 2 (JNK2)* via l'activation de la voie Gα12 [81]. ATF4 et ATF2 permettent la transcription de gènes cibles possédant une séquence AARE au niveau de leur promoteur [82–84]. Ils induisent ainsi la transcription du gène CHOP, qui possède un rôle de facteur de transcription. CHOP et ATF4 activent l'expression de certains gènes tels que *Tribbles 3 (Trb3)*, ULK1, Atg7 qui sont impliqués dans les processus d'autophagie et plus particulièrement dans la formation de l'autophagosome [85]. Cette

cascade de signalisation permet de réguler le taux de synthèse protéique en réponse à un déficit en AA, mais également l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation des cellules en réponse à une situation de stress, comme une carence en nutriments et particulièrement en AA.

Au-delà d'être un senseur de la déficience en AA, GCN2 est également sensible à leur augmentation. Chotechuang et al ont montré que des rats nourris avec à un régime à forte teneur en protéines (48% de protéines), présentaient une diminution de la phosphorylation de GCN2 dans le foie. Ces résultats indiquent que GCN2 est capable de détecter la déficience mais également l'augmentation d'AA au niveau du foie [63].

1.1.5.1.3.AMPK

La majorité des processus biologiques nécessite de l'énergie. Cette énergie est fournie grâce à l'hydrolyse de l'ATP qui permet ainsi la réalisation de diverses réactions biochimiques nécessaire à la survie cellulaire. La consommation d'ATP augmente la concentration en AMP au sein des cellules, et ce ratio AMP/ATP reflète le statut énergétique de la cellule. Le principal senseur de ce ratio énergétique est la protéine kinase AMPK. C'est un complexe protéique composé de trois sous-unités : la sous-unité catalytique α , et les deux sous-unités régulatrices β et γ . Chaque sous-unité existe sous différentes isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) [86]. L'AMPK permet le maintien de l'homéostasie énergétique en condition de stress. Lors d'une diminution de la disponibilité en ATP, ou une augmentation du ratio AMP/ATP dans la cellule, l'AMPK est activée par phosphorylation. Pour cela, l'AMP se lie à la sous-unité γ , induisant un changement conformationnel de l'AMPK et permettant la phosphorylation de la sous-unité α au niveau de la thréonine 172 par des kinases [86–89]. La fixation de l'AMP sur l'AMPK permet d'inhiber la déphosphorylation par des phosphatases alors que la liaison à l'ATP inhibe l'activation de l'AMPK.

L'AMPK est également impliquée dans le contrôle de la synthèse protéique. Elle agit au niveau de l'étape d'initiation et d'élongation de la traduction. Au niveau de l'initiation de la traduction, l'AMPK inhibe la synthèse protéique via l'inhibition de mTOR (**Figure 8**). En effet, la protéine SESN2 stimule l'activité de l'AMPK qui phosphoryle la protéine Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2), rendant le complexe TSC1/TSC2 inactif, ce qui permet la conversion de Rheb-GTP en Rheb-GDP, sa forme inactive. Une fois inactivé, Rheb ne peut plus phosphoryler mTORC1, qui est alors lui-même inactivé [90]. En parallèle, SESN2, via une action directe et via l'inhibition de GATOR2, maintient les Rag GTPases inactives. mTORC1 est ainsi maintenu inactif dans le cytoplasme [91]. Il semble également que l'AMPK inhibe mTOR en phosphorylant sa protéine associée, RAPTOR [65,92]. Outre l'arrêt de la synthèse protéique par l'inhibition de mTOR, l'AMPK a aussi pour cible la kinase eukaryotic Elongation Factor-2-kinase (eEF2k). L'AMPK active par phosphorylation cette kinase qui phosphoryle à son tour le facteur d'élongation eEF2, empêchant sa liaison au ribosome, ce qui bloque alors l'étape d'élongation de la traduction [93]. Cette étape d'élongation est très coûteuse en énergie. Elle nécessite environ 4 ATP pour

la formation d'une liaison peptidique [94]. Via l'inhibition de mTOR, l'AMPK stimule également l'autophagie [95–97].

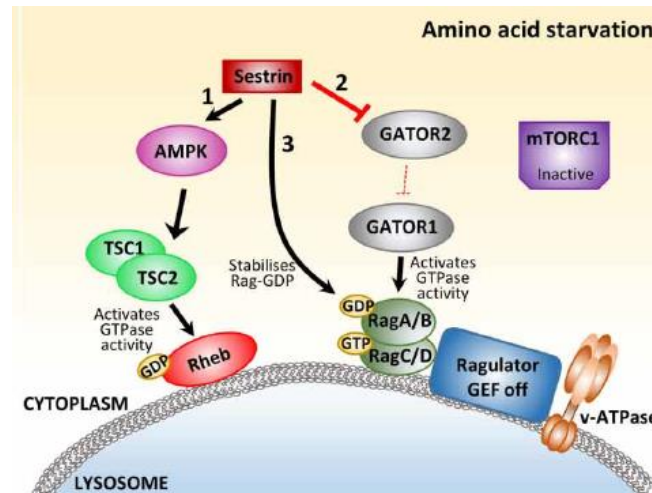


Figure 8. Régulation de mTORC1 via l'AMPK [92]

En cas de déficience en acides aminés, les protéines Sestrin induisent l'inhibition de mTORC1. (1) Sestrin active l'AMPK qui bloque le complexe TSC1/TSC2 et réduit l'activité de Rheb. (2) Sestrin inhibe GATOR2 ce qui rend inactives les Rag GTPases. (3) Sestrins stabilise les Rag-GDP pour les garder inactives. mTORC1 reste dans ce cas inactif dans le cytoplasme.

En résumé, la déficience en AAI induit l'activation des voies GCN2 et AMPK et l'inhibition de la voie mTOR (**Figure 9**). Ces voies vont d'une part permettre d'inhiber la synthèse protéique en contrôlant l'étape d'initiation et d'élongation de la traduction, et d'autre part activer les processus d'autophagie afin de fournir les AA nécessaire à l'organisme.

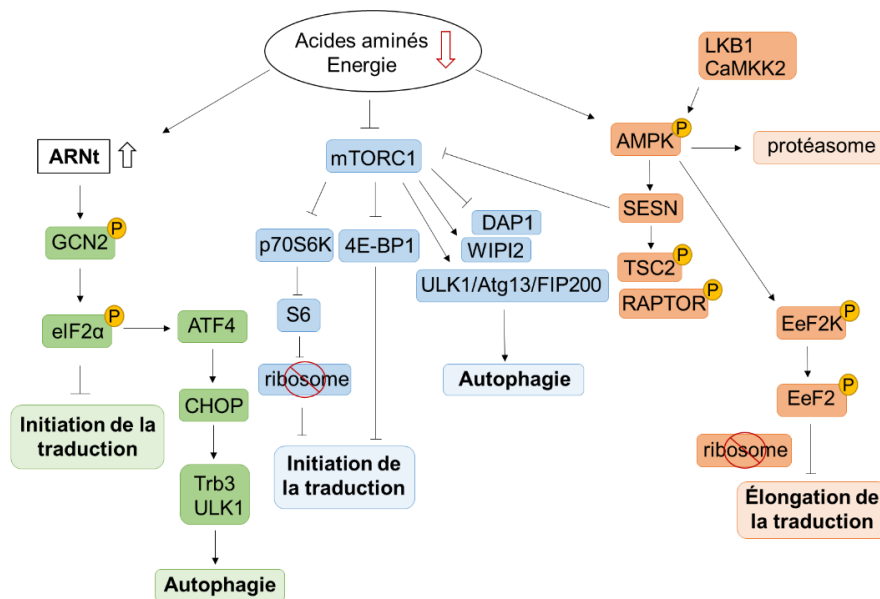


Figure 9. Les voies de signalisation impliquées dans la réponse à un déficit en acides aminés

La déficience en AAI induit l'activation des voies GCN2 et AMPK et l'inhibition de la voie mTOR ce qui induit une inhibition de la synthèse protéique et l'activation des processus d'autophagie.

1.1.5.2. Signalisation extracellulaire : FGF21

Savoir s'adapter à des changements nutritionnels par la régulation de l'homéostasie est primordial pour la survie d'une espèce. Cette adaptation est assurée par des modifications intracellulaires des orientations métaboliques et est coordonnée par des hormones elles-mêmes sous la régulation de la disponibilité en protéines et AA. Parmi les hormones qui répondent aux variations d'apport en protéines ou AA, il y a *Fibroblast Growth Factor 21* (FGF21).

Le Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) est une hormone peptidique appartenant à la famille des facteurs de croissance des fibroblastes [98]. Il est exprimé principalement dans le foie [99], mais également dans le pancréas, le muscle, le tube digestif, le tissu adipeux brun (TAB), le tissu adipeux blanc et l'hypothalamus [100] (**Figure 10**). C'est un facteur contrôlant l'homéostasie énergétique, avec une action endocrine, autocrine et paracrine au niveau de différents organes cibles [101].

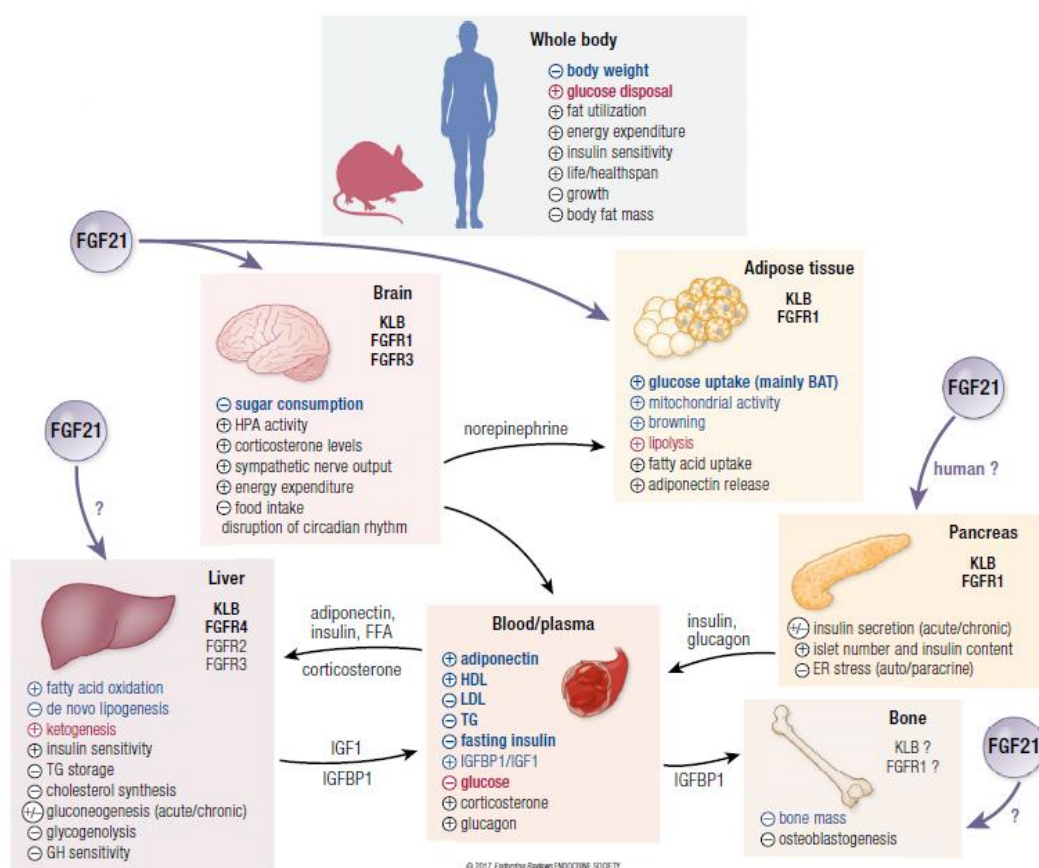


Figure 10. Effets métaboliques de FGF21 chez la souris et l'homme [100]

Chez la souris et l'homme, FGF21 est impliqué dans divers processus physiologiques comme le montre cette illustration. FGF21 a un impact sur différents organes tels que le cerveau, le tissu adipeux, le foie, le pancréas ou l'os. Il contrôle le métabolisme lipidique, glucidique, énergétique, la croissance, le poids, la prise alimentaire, ou encore la sécrétion d'hormones. (+) indique un effet stimulant de FGF21, et (-) un effet inhibiteur. Les effets similaires chez l'homme et la souris sont notés en bleu, les effets différents en rouge, et en noir lorsque les données chez l'homme sont absentes de la littérature.

Les données de souris KO-foie spécifique suggère que le FGF21 circulant provient principalement du foie [99,102]. Sur ces cibles, FGF21 se lie et active les récepteurs FGF (FGFR), nécessitant la présence d'un corécepteur β -klotho (KLB). FGF21 est impliqué dans divers processus physiologiques, tel que le métabolisme lipidique et glucidique [103,104], le contrôle du poids ou de la dépense énergétique [105]. Il est également décrit comme un signal permettant de limiter l'apport alimentaire en sucres [106] et en alcools [107]. FGF21 est connu pour répondre à différents signaux nutritionnels [99]. L'expression de FGF21 est augmentée en réponse à différents signaux nutritionnels, induisant divers effets métaboliques propre à chaque contexte. Sa sécrétion est élevée en cas de déficience en protéines et AA, en réponse à un régime cétogène faible en protéines ou en réponse à un régime riche en glucides, en cas de jeûne ou en cas de suralimentation, d'obésité ou de résistance à l'insuline [108].

1.2. Méthodes de détermination du besoin en protéines et acides aminés

Afin de maintenir le bon fonctionnement de l'organisme et assurer la santé, il apparaît important de déterminer de façon précise les besoins en protéines et AAI. L'apport en protéines et AAI doit permettre d'assurer une croissance optimale chez l'enfant, l'entretien des tissus chez l'enfant et l'adulte, et assurer les besoins supplémentaires en cas de situation pathologique, de grossesse ou d'allaitement.

1.2.1. Besoin en protéines et acides aminés indispensables

Le besoin en protéines correspond à la quantité de protéines nécessaires pour assurer l'entretien des tissus, et le fonctionnement métabolique et physiologique d'un individu sain. Ce besoin est variable selon le sexe, l'âge, l'état physiologique, le niveau d'activité physique. La FAO définit ce besoin comme « l'apport minimum en protéines de bonne qualité permettant d'atteindre l'équilibre azoté chez un adulte en bonne santé avec un niveau d'activité physique modéré » [1]. L'apport en protéines doit ainsi couvrir le besoin en azote et en AAI.

1.2.2. Qualité des protéines

Il existe différentes sources de protéines, qui se différencient d'un point de vue de leur 'qualité'. La qualité d'une protéine se définit par sa capacité à satisfaire le besoin métabolique en AAI et en azote [10].

Afin de mesurer la qualité protéique, la FAO a développé un score, le PD-CAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) [109]. Ce score compare le profil en AAI de la protéine étudiée par rapport à une protéine de référence couvrant tous les besoins en AAI, ajusté à la valeur de la digestibilité de la protéine. L'AAI le plus limitant de la protéine donnera le score le plus bas.

$$PD - CAAS (\%) = Digestibilité \times \frac{mg \text{ du 1er AA limitant dans 1 g de la protéine}}{mg \text{ du même AA dans 1 g de la protéine de référence}}$$

Cependant, cette méthode d'évaluation présente certaines limites. D'une part, la digestibilité variant d'un AAI à l'autre, il est nécessaire de prendre en compte la digestibilité des AAI individuels et non pas celle de la protéine. D'autre part, la digestibilité est généralement mesurée au niveau fécal, or il a été montré que la digestibilité iléale était plus adaptée car une partie des AAI retrouvés dans le côlon sont produits par les bactéries induisant une sous-estimation de la digestibilité réelle [110]. Ainsi, la FAO recommande l'utilisation d'un nouveau score, le DIAAS (*Digestible Indispensable Amino Acid Score*) prenant en compte les valeurs de digestibilité iléale pour chaque AAI présent dans la protéine étudiée [28].

$$DIAAS = \frac{mg \text{ d'un AA dans 1g de protéine alimentaire} \times digestibilité \text{ iléale de cet AA}}{mg \text{ de ce même AA dans 1g de protéine de référence}} \times 100$$

Les sources protéiques alimentaires peuvent être de nature animale (viande, poisson, œuf, lait) ou végétale (blé, riz, soja, lentilles...). Les protéines d'origine animale sont équilibrées en AAI, et ont de ce fait une meilleure qualité que certaines protéines végétales qui peuvent être déficientes en certains AAI, c'est notamment le cas de la lysine dans les céréales, et des AA soufrés (méthionine, cystéine) dans les légumineuses.

Dans les pays en voie de développement, les protéines proviennent essentiellement des céréales. En Afrique, par exemple, le régime alimentaire est essentiellement basé sur la consommation de céréales, de légumes, de racines et de tubercules [6]. En Inde, la majeure partie de la population est végétarienne. Leur principale source protéique se trouve dans les céréales telles que le riz, le blé et le millet [7]. Or, ces céréales ont d'une part un contenu protéique faible, d'autre part les protéines qui les compose sont de mauvaise qualité (17.7 g de protéines /100g de bœuf, contre 6.7 g de protéines /100g de riz par exemple) ce qui explique la fréquence des malnutritions protéiques dans les pays en voie de développement [8].

1.2.3. Détermination du besoin en protéines

Différentes méthodes ont été développées pour estimer le besoin en protéines : la méthode du bilan azoté et la méthode factorielle. Chez l'adulte en bonne santé, la méthode du bilan azoté a permis d'estimer le besoin moyen en protéines à 0.66 g/kg de poids corporel/j (105 mg N/kg de poids corporel/j) [111,112]. Afin de tenir compte de la variabilité interindividuelle au sein de la population, deux écarts-types (12,5%) ont été ajoutés à cette valeur moyenne du besoin, donnant ainsi une recommandation d'apport

en protéines de bonne qualité de 0.83 g/kg/j pour un adulte en bonne santé. Pour l'enfant, c'est la méthode factorielle qui est utilisée, et les besoins sont estimés à 1.12 à l'âge de 6 mois, et à 0.7g/kg de poids corporel/j entre 15 et 18 ans [1].

1.2.3.1. Le bilan azoté

Le besoin en protéines a été défini à l'aide de la méthode du bilan azoté. Cette méthode consiste à faire la différence entre les apports d'azote, c'est à dire la prise alimentaire, et les pertes azotées, correspondant aux pertes urinaires, fécales, et aux autres pertes variées comme la desquamation, la perte de cheveux, etc. [113]. Le bilan azoté est réalisé en testant différents niveaux d'apports en protéines, jusqu'à trouver l'apport assurant l'équilibre azoté.

Les pertes azotées sont évaluées avec précision (**Figure 11**). Deux types de pertes azotées sont distingués. D'une part, les pertes correspondant aux pertes urinaires et fécales, qui sont dues à l'oxydation des AA et au cycle de l'urée pour les pertes urinaires, et à la sécrétion de mucus, à la desquamation des cellules intestinales et aux enzymes digestives pour les pertes fécales. D'autres part, les pertes diverses plus mineures, qui correspondent aux pertes dermiques, à la transpiration et à la desquamation, à la perte de cheveux, de poils, d'ongles, etc. [111,114].

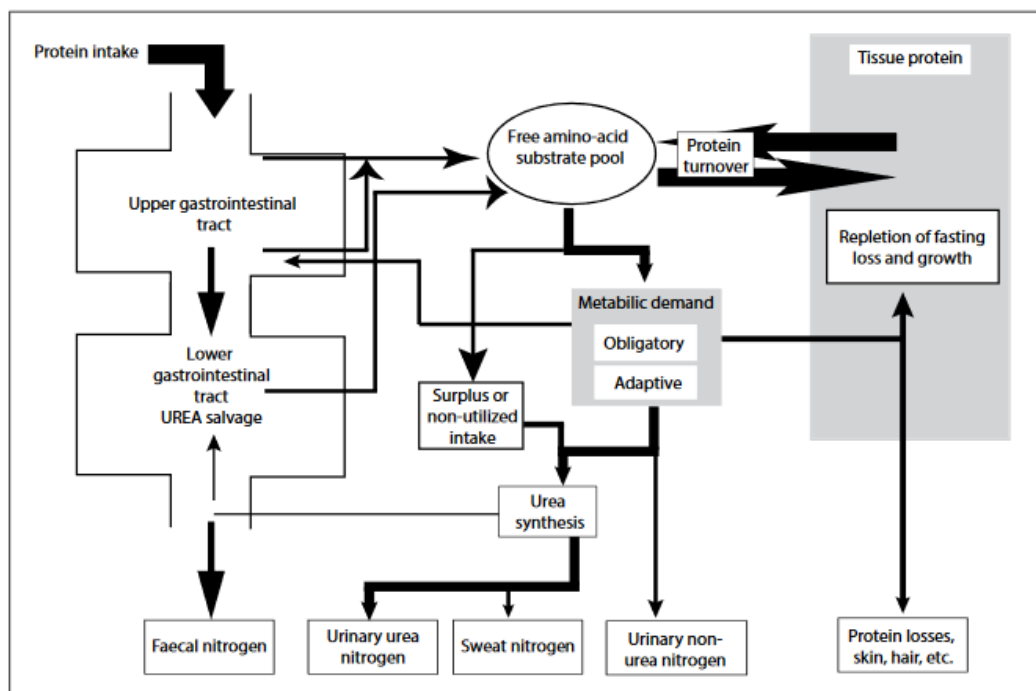


Figure 11. Modèle du métabolisme protéique chez l'homme [116]

Après absorption au niveau des entérocytes, les AA participent au métabolisme des différents tissus et organes. Ils seront ensuite éliminés selon différentes voies de dégradation. Une part de l'azote sera éliminée dans les fèces. Les AA seront eux, dégradés sous forme d'urée et éliminés via l'urine ou la transpiration. Une part des pertes protéiques sera également faite par la perte de cheveux, de poils, la desquamation de la peau, la perte des ongles, etc.

Chez l'homme, une étude a estimé les pertes diverses qui ont été classées en différentes catégories : les pertes tégumentaires (cheveux, poils, ongles, desquamation), la transpiration, les pertes diverses (ammoniaque expiré, papier toilette usagé) et autres pertes (brossage de cheveux, sang, crachat, sperme) [115]. En pratique, seules les pertes urinaires et fécales sont le plus souvent mesurées, représentant 90% des pertes azotées totales. Les pertes mineures sont, quant à elle, estimées à l'aide de valeurs de référence, 5 et 8 mg N/kg/j. La FAO recommande d'utiliser la valeur la plus élevée, 8 mg N/kg/j [112], car l'estimation des apports et des pertes azotées a tendance à être sous-estimé.

Chez l'adulte, les apports devant compenser les pertes, le besoin est atteint lorsque le bilan azoté est à l'équilibre. Différents modèles de régression ont été utilisés pour tenter d'interpréter précisément les données du bilan azoté. Rand et Young ont testé 4 modèles de régression : régression linéaire, régression de la racine carrée, régression logarithmique, régression exponentielle. Le modèle de régression exponentielle s'est révélé inapproprié. Les autres modèles n'étaient pas en mesure d'expliquer toute la variabilité des données. Cependant, Rand et Young ont montré que le modèle racine carrée était le modèle le moins sensible aux individus extrêmes [114]. Par conséquent ce modèle a été retenu pour analyser les données de bilan azoté.

Cette méthode présente certaines limites. L'une des principales étant la durée de la période d'adaptation, qui varie de 5 à 16 jours. Cette période d'adaptation peut également être vu comme une période d'accommodation comme l'ont souligné Young et Marchini [35]. Durant cette période d'adaptation à des apports variés en protéines, diverses réactions sont mises en place dans l'organisme afin de faire face à des situations de déficiences ou d'excès. Ces adaptations métaboliques impactent la synthèse protéique, ayant pour répercussion une modification de la valeur de besoin obtenus [35].

Le style de vie peut également impacter la détermination du bilan azoté. En effet, le niveau d'activité physique va modifier l'apport alimentaire, la composition corporelle et la demande métabolique avec une augmentation de la rétention azotée. Tout cela a un impact sur le bilan azoté [1]. La consommation d'alcools et de cigarettes, en modifiant les processus de détoxification et d'excrétion, modifie également le besoin en protéines [1].

1.2.3.2. Méthode factorielle

Il est possible de calculer le besoin en protéines de façon théorique à l'aide de la méthode factorielle. Cette méthode est utilisée pour calculer les besoins lors de certains états physiologiques comme la croissance, la grossesse ou l'allaitement, permettant ainsi de tenir compte du besoin spécifique lié à ces différents statuts. À ces stades, les protéines sont nécessaires pour le maintien mais également pour l'accrétion protéique dans les nouveaux tissus ou dans le lait [116].

La méthode factorielle consiste à faire la somme du besoin d'entretien, et du besoin de croissance chez les enfants, correspondant au dépôt protéique et variable en fonction de l'âge, comme représenté dans le **Tableau 2** [117].

Cependant, cette méthode est critiquable du fait qu'elle repose sur un besoin d'entretien et un coefficient d'utilisation protéique constant, alors que ce coefficient dépend du niveau d'apport en protéines. Mais, elle a l'avantage de pouvoir prédire les besoins pour différentes populations en fonction du sexe et de l'âge notamment, en faisant varier uniquement les quantités d'azote liées au besoin spécifique de chaque sous-population

Tableau 2. Besoin d'entretien et besoin de croissance en fonction de l'âge chez l'enfant [116]

Age (years)	Maintenance ^a requirement	Growth ^b requirement	Average requirement	Safe level ^c (+1.96SD)	1985 report
(g protein/kg body weight per day)					
0.5	0.66	0.46	1.12	1.31	1.75
1	0.66	0.29	0.95	1.14	1.57
1.5	0.66	0.19	0.85	1.03	1.26
2	0.66	0.13	0.79	0.97	1.17
3	0.66	0.07	0.73	0.90	1.13
4	0.66	0.03	0.69	0.86	1.09
5	0.66	0.06	0.69	0.85	1.06
6	0.66	0.04	0.72	0.89	1.02
7	0.66	0.08	0.74	0.91	1.01
8	0.66	0.09	0.75	0.92	1.01
9	0.66	0.09	0.75	0.92	1.01
10	0.66	0.09	0.75	0.91	0.99

^a Derived from the regression of nitrogen balance against intake shown in Table 26.

^b From Table 29, adjusted for 58% efficiency of utilization, derived from the regression analysis in Table 26.

^c SD for maintenance based on a coefficient of variation of 12%. SD for growth calculated from SD of deposition in Table 29/0.58 (efficiency of utilization). SD for maintenance and for growth are calculated as described in the text.

1.2.4. Détermination du besoin en acides aminés indispensables

Contrairement à la recommandation d'apport en protéines qui fait maintenant l'objet d'un certain consensus, il n'existe pas de recommandation d'apport en AAI. Le besoin en AAI a été estimé à l'aide d'une méthode théorique (méthode factorielle), ou de méthodes expérimentales (bilan azoté, méthodes utilisant les isotopes stables). Compte tenu de son caractère strictement indispensable et de son caractère limitant dans les céréales, le besoin en lysine a été particulièrement étudié, tout comme le besoin en thréonine, du fait de son importance dans les sécrétions digestives.

1.2.4.1. Bilan azoté

Jusqu'en 1986, les besoins en AAI chez l'homme étaient évaluées en utilisant la méthode du bilan azoté [113]. Cette méthode a été notamment utilisée pour déterminer le besoin en lysine [118,119] et en thréonine [120].

L'évaluation des besoins en AAI suit le même principe que l'évaluation du besoin en protéines. Cette méthode repose sur la détermination de la différence entre l'azote ingéré et l'azote excrété. Pour cela, les sujets reçoivent une alimentation équilibrée en tous les nutriments et tous les AA exceptés l'AAI dont on veut mesurer le besoin. L'apport en cet AAI est progressivement augmenté et lorsque le bilan azoté atteint un état d'équilibre, cela signifie que le besoin est couvert. Les sujets sont adaptés à des niveaux croissants d'AAI pendant une période de 7 à 10 jours.

Cependant, la mise en place de ce protocole d'étude est fastidieux [121]. D'une part, la période d'étude est relativement longue correspondant à une dizaine de jours par niveaux d'apports. D'autre part, le calcul des pertes implique une collecte totale des urines et des selles pour permettre un dosage de l'azote dans celles-ci sans pouvoir évaluer précisément les pertes en AAI. En outre, il est difficile d'évaluer précisément les pertes mineures correspondant à la desquamation ou à la perte de cheveux. La consommation de protéines doit également être déterminée avec précision, avec une mesure des quantités réellement consommées. Enfin, ce bilan dépend du niveau d'énergie et de l'activité physique.

1.2.4.2. Méthode factorielle

Le besoin en AAI peut être déterminé de façon théorique à l'aide de la méthode factorielle. Comme pour le besoin en protéines, le calcul considère le besoin d'entretien, le besoin de croissance chez l'enfant, et la composition en AAI des tissus.

Chez l'enfant, le besoin de croissance en lysine a été estimé en faisant le produit du taux d'accrétion protéique et de la composition en lysine de l'organisme, que l'on divise par l'efficacité de l'utilisation protéique (0.58) (**Tableau 3**). Il est possible de calculer le taux d'accrétion protéique au cours de la croissance car la vitesse de gain pondéral est connue [122]. Il passe de 4.2 g/j à 1 mois, à 1.8 g/j à 1 an [122]. Chez l'enfant de 6 mois à 3 ans, le besoin d'entretien en protéines est de 0.66 g/kg/j et le besoin de croissance à 0.46 g/kg/j. La composition de la protéine de référence en lysine étant de 45 mg/g de protéine, le besoin d'entretien en lysine est donc de $0.66 \times 45 = 33.6$ mg/kg/j. Pour le besoin de croissance, la composition des tissus en lysine est de 73 mg/g de protéine. Le besoin de croissance est donc de $0.46 \times 73 = 29.7$ mg/kg/j. Ainsi, la méthode factorielle permet d'estimer le besoin nutritionnel moyen en lysine de 63 mg/kg/j pour un enfant de 6 mois à 3 ans. Pour les enfants de la naissance à 6 mois, c'est la composition du lait maternel qui est la référence pour établir le besoin nutritionnel, en considérant que le lait apporte 75% d'azote protéique et 25% d'azote non protéique [28]

Au cours de la grossesse, les besoins sont également estimés à l'aide de la méthode factorielle qui permet de considérer les besoins spécifiques liés à ce statut physiologique. Le calcul prend en compte l'accrétion protéique dans l'organisme maternel, le fœtus et le placenta. Un travail de Hytten et Leitch a évalué le gain total de protéines entre 925 et 992 g, dont plus de la moitié reviendrait au fœtus et au placenta [123]. Le besoin en protéines a été estimé à 1; 9 et 31 g de protéines/j pour le semestre 1, 2 et 3 respectivement. Durant l'allaitement, le besoin en protéines est de 19 g de protéines/j en moyenne puis de 12.5 g de

protéines/j après 6 mois. En considérant la composition en AAI de la protéine de référence, dans ce cas, le besoin en lysine peut être estimé à 41 mg/kg/j et le besoin en thréonine, à 21 mg/kg/j [124].

Durant l'allaitement, le besoin en AAI est déterminé en prenant en compte la composition en AAI du lait maternel au cours des 6 premiers mois de l'allaitement, à laquelle sont ajouté les besoins en AAI d'une femme non-allaitante [10,124]. Ainsi, pour la lysine le besoin a été estimé à 42 mg/kg/j, et à 24 mg/kg/j pour la thréonine [124].

Tableau 3. Besoin en acides aminés indispensables chez l'enfant [28]

			His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val
Tissue amino acid pattern (mg/g protein) ¹			27	35	75	73	35	73	42	12	49
Maintenance amino acid pattern (mg/g protein) ²			15	30	59	45	22	38	23	6	39
Protein requirements (g/kg/d)											
Age (yr)	Maintenance	Growth ³	amino acid requirements (mg/kg/d) ⁴								
0.5	0.66	0.46	22	36	73	63	31	59	35	9.5	48
1-2	0.66	0.20	15	27	54	44	22	40	24	6	36
3-10	0.66	0.07	12	22	44	35	17	30	18	4.8	29
11-14	0.66	0.07	12	22	44	35	17	30	18	4.8	29
15-18	0.66	0.04	11	21	42	33	16	28	17	4.4	28
>18	0.66	0.00	10	20	39	30	15	25	15	4.0	26
scoring pattern mg/g protein requirement ⁵											
0.5			20	32	66	57	27	52	31	8.5	43
1-2			18	31	63	52	25	46	27	7	41
3-10			16	30	61	48	23	41	25	6.6	40
11-14			16	30	61	48	23	41	25	6.6	40
15-18			16	30	60	47	23	40	24	6.3	40
>18			15	30	59	45	22	38	23	6.0	39

His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; SAA, sulphur amino acids; AAA, aromatic amino acids, Thr, threonine, Trp, tryptophan; Val, valine

1.2.4.3. Méthodes de traceurs isotopiques

Pour pallier aux différents problèmes posés par la méthode du bilan azoté, des méthodes alternatives ont donc été proposées [121]. À la fin des années 80, de nouvelles méthodes utilisant des traceurs isotopiques ont été développées. Ces mesures sont basées sur le fait que l'oxydation des AAI est irréversible, lorsque le besoin n'est pas couvert ou que l'apport alimentaire dépasse les besoins. Ainsi, les modifications du niveau d'oxydation en AAI pourrait prédire leur apport et leur besoin [125].

1.2.4.3.1. Méthode du bilan du traceur

La méthode du bilan du traceur (ou *Direct Amino Acid Oxidation* DAAO) a été mise au point chez l'animal puis utilisée chez l'homme par Vernon Young et ses collègues pour déterminer le besoin en AAI [126]. Lorsque l'oxydation, qui est considérée comme la seule composante de la perte d'un AAI, atteint un minimum, la quantité ingérée correspond au besoin. Cette méthode consiste donc à évaluer

les pertes oxydatives d'un l'AAI en fonction du niveau de son apport. Le taux d'oxydation est mesuré grâce à l'utilisation d'isotopes stables.

Pour réaliser un bilan traceur, le régime expérimental, avec un certain apport en un AAI, est suivi pendant 6 jours [125,127,128]. Le 7^{ème} jour, l'enrichissement basal en carbone 13 (^{13}C) de l'AAI testé est mesuré dans le plasma, et dans le CO_2 expiré. Le sujet consomme un petit repas par heure durant 6 heures. Au cours du 3^{ème} repas, l'AAI test marqué au ^{13}C (L-[1- ^{13}C]AA) ($\sim 5\text{-}8\mu\text{mol/kg}$) est perfusé par voie intraveineuse afin de marquer le pool d'AA libre. Un taux constant de L-[1- ^{13}C]AA est administré jusqu'à la fin de l'expérimentation ($\sim 0.6\text{-}0.1\mu\text{mol/kg/min}$).

Le flux d'apparition de l'AAI test dans le compartiment est mesuré grâce à la dilution de l'AAI marqué perfusé, le taux d'oxydation est, quant à lui, mesuré par l'apparition de CO_2 marqué dans les gaz expirés. Le besoin correspondra à la valeur de l'apport en AAI au-delà duquel le niveau d'oxydation présente un point d'inflexion avant d'augmenter (**Figure 12**) [125].

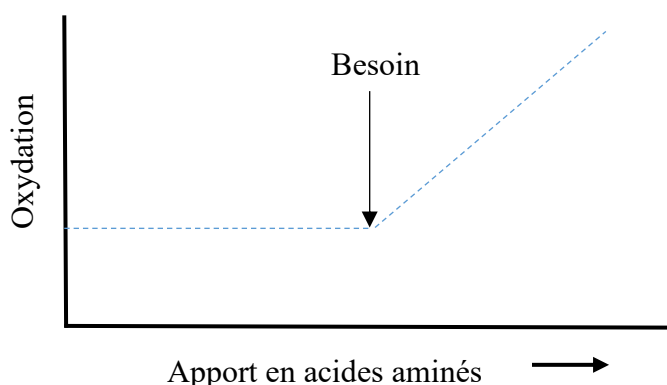


Figure 12. Détermination du besoin en AAI par la méthode du bilan du traceur

Lorsque l'apport en AA est limitant, son niveau d'oxydation est au minimum. Cette oxydation va augmenter en fonction de l'augmentation du niveau d'apport en AA. Le besoin correspondra à la valeur de l'apport en AA au-delà duquel le niveau d'oxydation présente un point d'inflexion avant d'augmenter.

Le rythme circadien intervient dans le processus d'oxydation des AA, c'est pourquoi la mesure qui était initialement réalisée sur 3h a été allongée à 24h. Elle est basée sur le même protocole, détaillé précédemment, avec des mesures 12h à jeun et 12h à l'état nourri. La mesure de l'enrichissement du ^{13}C de l'AAI plasmatique est similaire si la mesure est faite dans l'urine ou dans le plasma. La mesure de l'enrichissement en ^{13}C dans l'urine permet d'être le moins invasif [129].

Cependant, cette méthode associe des problèmes théoriques et des problèmes pratiques. D'une part, les pertes oxydatives ne sont pas représentatives de l'ensemble des pertes en AAI. D'autre part, une période d'adaptation aux régimes expérimentaux est nécessaire, ce qui rend le protocole lourd et difficile à mettre en œuvre [130]. De plus, la prise de petits repas échelonnés toutes les heures ne mime pas la réalité alimentaire et peut avoir une incidence sur les niveaux d'oxydation mesurés [1]. Un travail de El-

Khoury a notamment évalué les effets de la prise de petits repas toutes les heures tout au long de la journée sur l'oxydation de la leucine [129]. Le bilan de la leucine était à l'équilibre lorsque les repas étaient fractionnés toutes les heures, alors qu'il était positif avec la prise de seulement 3 gros repas au cours de la journée. En outre, aucun repas n'est donné les deux dernières heures de l'expérimentation. Ainsi, l'oxydation est plus élevée pendant les 1^{ère} heures de la phase nourrie [1] pouvant surestimer l'oxydation. Enfin, un des derniers points limites de cette technique est la perfusion d'un traceur, qui rend le protocole très invasif.

1.2.4.3.2.Méthode de l'oxydation de l'acide aminé indicateur

La méthode de l'oxydation de l'AA indicateur est une évolution de la méthode du bilan du traceur. Elle a préalablement été développée chez le rat, puis chez le porc [131] avant d'être utilisée chez l'homme pour évaluer le besoin en AAI [126]. Cette méthode est basée sur le fait que la déficience en un AAI implique une augmentation de l'oxydation de tous les autres AA [132,133]. Cette méthode évalue donc le besoin en un AAI en mesurant l'oxydation d'un autre AA, l'AA indicateur est généralement la phénylalanine. Lorsque l'apport en AAI test est limitant, l'oxydation de tous les autres AA est augmentée, et lorsque l'AAI test est apporté à hauteur du besoin, l'oxydation de l'AA indicateur va alors diminuer. Similairement à la méthode précédente, cette méthode est basée sur l'utilisation d'un isotope stable.

L'oxydation de l'AA indicateur en fonction de l'apport de l'AAI étudié est représenté par une courbe suivant un modèle bilinéaire [113]. Le besoin en AAI est défini à l'aide du « breakpoint », point de rupture de la pente (**Figure 13**). Cette valeur correspond alors au besoin nutritionnel moyen, auquel il faudra ajouter +/- 2 écarts-types pour déterminer une recommandation.

Ce protocole a été d'abord utilisé pour suivre l'oxydation de l'AA pendant 8h. Ainsi, pour évaluer le besoin en leucine [134], chaque heure pendant 8 heures, un petit repas, avec un certain niveau d'AA test, a été consommé. En parallèle, l'AA test (ici la leucine), et l'AA indicateur (la phénylalanine), a été perfusés : 19.37 µmol/kg de phénylalanine et 21.89 µmol/kg de leucine [134]. Le CO₂ expiré a été mesuré toutes les 30 minutes (45 min après le début de la perfusion des isotopes stables). L'enrichissement en ¹³C a été mesuré dans des prélèvements d'urine réalisés en continue.

Par la suite, de nouvelles études ont permis de mieux contrôler les conditions expérimentales de la méthode de l'oxydation de l'AA indicateur en mesurant l'oxydation sur le nyctémère (12h à jeun / 12h à l'état nourri) [130]. Dans ce cas-là, le besoin déterminé par le point de rupture de la pente ne correspond plus à l'oxydation de l'AA indicateur mais à son bilan sur 24h comprenant la quantité oxydée moins les quantités ingérées et perfusées. Ce bilan sur 24h présente l'avantage de mesurer un besoin global en AAI, tenant compte des différentes voies métaboliques impliquées. Cette méthode semble être la plus satisfaisante développée jusqu'à présent.

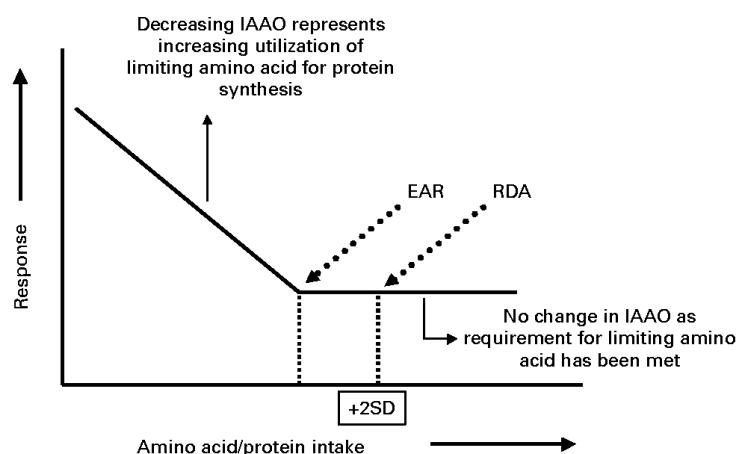


Figure 13. Niveau d'oxydation de l'AA indicateur en réponse à l'apport en AA [134]

Avant d'atteindre la valeur du besoin en AA test, l'oxydation de l'AA indicateur va diminuer, reflétant son incorporation dans les protéines via la protéosynthèse. Au-delà du besoin, l'oxydation de l'AA indicateur va se stabiliser. A l'aide d'une double régression, un point d'inflexion va pouvoir être déterminé correspondant à la valeur du besoin en cet AA. L'ajout de ± 2 écarts-types à cette valeur, permettra de déterminer une recommandation.

Cependant la mise au point du protocole expérimental pour la mesure de l'oxydation de l'AA indicateur reste difficile à mettre en place car les sujets doivent être présents entre 24 et 29h pour chaque étude et doivent être adaptés à l'apport en AAI pendant 8 jours.

Les valeurs trouvées avec cette méthode, particulièrement celles pour la lysine, sont en accord avec les méthodes factorielles qui ont conduit aux besoins que l'on trouve dans le rapport de la FAO, à savoir 30mg/kg/j pour la lysine et 15mg/kg/j pour la thréonine (**Tableau 4**) [117]. Néanmoins les valeurs reportées par ces méthodes sont deux à trois fois plus élevées que celles indiquées par la FAO en 1985 [1,135], basées sur le bilan azoté (**Tableau 4**). Comme explicité précédemment, la méthode du bilan azoté est peu précise et les valeurs obtenues sembleraient sous-estimer le besoin ne permettant donc pas de compenser les pertes obligatoires [136]. Les données issues de ces différentes techniques d'évaluation du besoin en AAI aboutissent à de larges gammes de valeurs, si bien qu'il n'est pas possible de déterminer les variabilités interindividuelles et donc de définir des recommandations nutritionnelles [1].

Tableau 4. Estimation des besoins en acides aminés indispensables chez l'adulte selon différentes méthodes [116]

En mg/kg/j	Bilan azoté	Bilan du tra- ceur	Oxydation de l'acide aminé indicateur	Bilan sur 24h de l'acide aminé indicateur
Histidine	8-12			
Isoleucine	10		55	
Leucine	14	24.5 ; 38 ; 40	55	
Valine	10	19	55	17
Lysine	12	27	35 ; 37 ; 38 ; 45	29 ; 31 ; 44
AA soufrés	13	13	13	15
AA aromatiques	14	39	15	
Thréonine	7	13.5	19	15
Tryptophane	3.5		4	

1.2.5. Utilisation des méthodes « omics » pour déterminer le besoin en protéines et AAI

Comme vu précédemment, les méthodes actuelles utilisées pour définir le besoin en AAI demandent à être améliorées afin de préciser la valeur du besoin et pouvoir déterminer des recommandations nutritionnelles. Les protocoles expérimentaux mis en place jusqu'à présent sont lourds, invasifs et les valeurs de besoins obtenues restent imprécises. Il est donc nécessaire de développer des approches plus précises et moins invasives. La FAO a établi différentes caractéristiques pour la mise au point de nouvelles méthodes permettant de préciser la valeur du besoin en AAI [28]. Ces méthodes doivent être directement applicables à l'homme, à différents stades de la vie, et dans différentes conditions physiopathologiques. Leur coût doit être raisonnable, et elles doivent être le moins invasives possibles. Une des nouvelles approches qui a ainsi été proposé par la FAO, et l'utilisation des « omics » [28].

Les technologies dites « omics » sont des études à haut débit permettant de générer de grandes quantités de données à différents niveaux biologiques. Elles comprennent la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique ou encore la lipidomique. Ces approches permettent d'obtenir de nombreuses informations sur la réponse cellulaire et/ou tissulaire. Elles peuvent en particulier être utiles pour mettre en évidence et identifier de nouveaux biomarqueurs, molécules dont la présence ou la concentration dans le sang ou les urines pourrait signaler un événement ou un statut physiologique particulier, tel qu'une déficience ou un excès en AA [137]. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la métabolomique pour la suite de cette partie.

1.2.5.1. La métabolomique

La métabolomique est une technique d'analyse physicochimique qui permet de mesurer des métabolites endogènes (lipides, sucres, nucléotides, acides aminés d'une taille inférieure à 3000 Da) de différentes voies biochimiques, et ainsi observer s'il y a une modification de ces biomarqueurs lors de certaines conditions physiologiques ou physiopathologiques. Contrairement au génome, qui est fixé, le métabolome est variable. Il associe une composante génétique et environnementale (prise de médicaments, contaminants, activité du microbiote, alimentation) et peut ainsi être modifié au fil du temps (**Figure 14**).

Les méthodes utilisées pour les analyses de métabolomiques sont la spectrométrie de masse (MS), et la Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) [138] :

- **La Résonnance Magnétique Nucléaire** : l'analyse par RMN est une méthode quantitative et qualitative donnant une information sur la structure des métabolites. C'est une analyse rapide, de l'ordre de la minute, facile à mettre en œuvre car la préparation des échantillons est très succincte [139]. Cependant, sa sensibilité est inférieure à celle de la spectrométrie de masse [140]. Elle permet de détecter seulement des métabolites très concentrés.

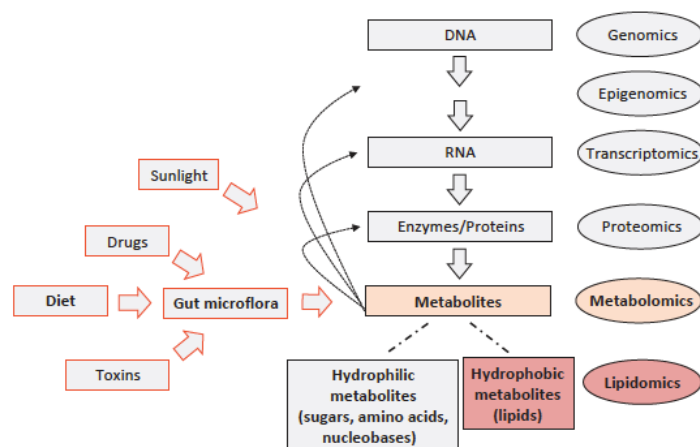


Figure 14. Les « Omics » [138]

Elles comprennent la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique ou encore la lipidomique. Elles comprennent la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique ou encore la lipidomique. La métabolomique est une technique d'analyse physicochimique qui permet de mesurer des métabolites endogènes (lipides, sucres, nucléotides, acides aminés d'une taille inférieure à 3000 Da).

- **La spectrométrie de masse** : elle détecte des fragments de métabolites selon leur rapport m/z , avec une sensibilité élevée [140]. La spectrométrie de masse est souvent couplée à la chromatographie, soit la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS), soit la chromatographie en phase liquide (LC-MS) [139]. La technique de GC-MS nécessite une étape supplémentaire dans le prétraitement des échantillons pour les transformer en composés volatils, étape qui n'est pas possible sur des composés thermolabiles, qui devront donc être analysés par LC-MS.

Une fois les spectres obtenus grâce à la RMN ou la spectrométrie de masse, la seconde étape est celle du prétraitement des données [139]. Premièrement, le bruit de fond spectral est soustrait des données. Les signaux sont extraits et transformés sous forme de matrice. Chaque variable sera alors associée à un rapport m/z , à un temps de rétention et à une intensité [141].

La dernière étape est l'étape de discrimination des différentes variables grâce à des analyses statistiques multivariées [139,142]. L'analyse en composante principale, ou ACP, est régulièrement utilisée. Elle fait partie des analyses statistiques descriptives. Elle est sans a priori sur l'appartenance d'un échantillon à un groupe. Elle permet de visualiser la répartition des échantillons et de trouver des « clusters », et de dissocier ainsi différents groupes [141]. Une méthode qualitative peut également être utilisée pour discriminer des molécules, la méthode ICDA (Independent Component-Discriminant Analysis). C'est une méthode qui dérive de l'ICA (Independent Components Analysis) faisant partie des méthodes dites de « séparation aveugle de sources », car elle vise à extraire les signaux sources sous-jacents de la matrice ainsi que leurs proportions dans les mélanges. L'ICDA permet de prendre en compte l'information sur le modèle d'échantillon afin de renforcer la discrimination [143].

D'autres méthodes, faisant parties des analyses statistiques explicatives, peuvent être utilisées. Notamment, la régression PLS (Partial Least Square ou Projection to Latent Structures), l'analyse discriminante PLS (PLS-DA) et l'OPLS (Orthogonal Projection to Latent Structures) [141]. Ce sont des méthodes de régression qui tentent d'expliquer des variables (Y) par des variables (X). Ces modèles permettent de lier plusieurs variables entre elles. L'objectif est de calculer des variables latentes qui maximisent la variance extrait des deux matrices, et la corrélation entre les deux matrices.

1.2.5.2. Métabolomique et besoin nutritionnel

La majorité des études de nutrition repose sur des mesures de besoins nutritionnels moyens définis pour une population. Cependant, des facteurs environnementaux et génétiques induisent des différences interindividuelles avec des besoins métaboliques propres à chacun. Les recommandations seraient d'autant plus efficaces si elles étaient appliquées individuellement. L'utilisation du profil métabolomique peut aider à déterminer les variations interindividuelles et ainsi émettre des recommandations plus ciblées [137], et notamment pour des populations spécifiques [144].

Les profils de métabolome dans les fluides biologiques ont déjà été utilisés avec succès comme biomarqueurs précoces de variations de processus et de dysfonctions métaboliques. L'étude de Fedry et al. a montré un lien entre un profil spécifique en biomarqueurs dans les urines et des dysfonctionnements métaboliques. Des souris dites résistantes à l'obésité, ont montré un taux d'acylglycine et de leucine particulièrement élevé dans les urines, par rapport aux souris sensibles à la prise de poids, avant l'exposition à un régime gras et cette différence se maintient lorsque les souris sont soumises à un régime riche en lipides [145].

La métabolomique a également été appliquée à la détermination du besoin en choline [146]. La choline est un nutriment essentiel pour lequel un *adequate intake* a été fixé par l'institut américain de médecine en 1998 à 550 mg/j pour les hommes, 425 mg/j pour les femmes adultes avec 450 mg/j durant la gestation et 550mg/j durant la lactation [147]. Les apports alimentaires en choline permettent la synthèse de phosphatidylcholine, qui fait intervenir la phosphatidyléthanolamine-N-méthyltransférase (PEMT), enzyme qui est induite par les œstrogènes. Chez les femmes ménopausées, la concentration en œstrogènes étant faible, le faible apport en choline provoque des risques de dysfonctions et particulièrement des risques de stéatose hépatique. Afin de préciser la valeur du besoin en choline, les métabolites plasmatiques ont été analysés par métabolomique, chez des sujets soumis à une déplétion (<50 mg de choline/70kg/j) puis à une réplétion en choline (550-850 mg/70kg/j). Ces études ont permis d'identifier des biomarqueurs plasmatiques sensibles (choline, betaine, phosphatidylcholine, sphingomyeline, diméthylglycine, méthylglycine, homocystéines et méthionine) pour la détection du besoin en choline. Cette approche a également été utilisée pour la détermination du besoin en choline chez des sujets présentant un polymorphisme du gène codant la PEMT rs12325817le [148,149] et chez les femmes enceintes et allaitantes [150]. Ces travaux ont été pris en compte pour l'établissement de recommandations d'apport en choline

par l'European Food Safety Authority (EFSA) en 2014 variant de 269 à 444 mg/j [151]. Ces recommandations sont de 480 mg durant la gestation et 520 mg durant la lactation et entre 269 à 450 mg chez les personnes âgées.

Certains métabolites plasmatiques ont également été mis en évidence en réponse à des régimes riches en leucine d'une part [152,153], et en méthionine d'autre part [154]. Une déficience peut également être signifiée par un métabolome spécifique. Wu et son équipe [155] a montré qu'une malnutrition protéino-énergétique pouvait induire des modifications du profil métabolique dans les urines chez des rats. Après analyse par GC-MS et LC-MS, différentes voies métaboliques ont été affectées en réponse à une malnutrition protéique et énergétique. Ils ont observé une augmentation du niveau de créatine, thréitol, acide pyroglutamique et acide kynurénique, et une diminution du niveau d'acide succinique, d'acide *cis*-aconitique, d'acide citrique, d'acide isocitrique, d'acide thréonique, de triméthylglycine, d'acide N-méthyl-nicotinique ainsi que d'acide urique. L'altération de ces métabolites est associée à une modification du métabolisme énergétique, protéique, et lipidique en réponse à la malnutrition protéino-énergétique.

Le changement de concentration des AA plasmatiques après l'ingestion d'un repas à différents niveaux protéiques est connu. Une diminution mais également une augmentation de certains AA plasmatiques a été mise en évidence en lien avec une augmentation de l'apport protéique [156]. Le niveau d'AA plasmatiques ne reflète pas seulement l'apport net en AA alimentaires, mais la concentration finale de chaque AA est déterminée par différents facteurs incluant le catabolisme et le taux de transport entre les différents organes. Des études sur des animaux nourris avec différents régimes ont montré que l'apport alimentaire, et protéique, modulait les orientations et l'intensité des voies métaboliques [157–161] qui devrait donc être reflété par une concentration différente en métabolites plasmatiques ou urinaires.

Ces différentes études montrent que l'analyse de biomarqueurs pourrait être appliquée à la détermination du besoin en AA, mais également à mieux comprendre le métabolisme des AA et leur implication dans diverses voies biologiques [162].

1.3. Impact de la déficience en protéines et acides aminés indispensables sur le métabolisme protéique et énergétique

Compte tenu du rôle essentiel qu'ont les protéines dans la croissance et la survie de l'organisme, il est primordial que l'apport en protéines et AAI soit suffisant [1].

Dans les pays en voie de développement, les malnutritions protéino-énergétiques sont fréquentes chez les enfants. Après le sevrage, ces enfants sont régulièrement nourris avec des régimes faibles en protéines, et des protéines de mauvaise qualité [163–165]. Près de la moitié des décès d'enfants de moins de 5 ans sont liés à la dénutrition [2]. C'est un problème de santé publique majeur, représentant la 3ème

maladie infantile la plus répandue dans ces pays [3]. Il existe deux types de malnutrition protéino-énergétique. Le marasme qui correspond à une insuffisance pondérale sévère, exprimé en rapport poids/taille. Et le Kwashiorkor, qui se définit par la présence d'œdème [18]. Dans ces deux cas, la masse maigre est fortement diminuée, en particulier la masse musculaire en raison d'un ralentissement du renouvellement protéique.

Une restriction en protéines et en AAI aura ainsi de lourdes conséquences sur l'organisme d'autant plus marquées chez des individus en pleine croissance, incluant une forte diminution de la croissance, du poids, ainsi qu'un impact important sur diverses fonctions physiologiques de l'organisme (développement cérébral, fonction cardiaque, immunitaire, hépatique, etc.) [166].

1.3.1. Effet d'une déficience en protéines et acides aminés indispensables sur la prise alimentaire

La prise alimentaire est dépendante de la quantité de protéines dans le régime. Cependant, les effets d'une restriction protéique sur celle-ci restent encore assez controversés.

Une majorité d'études chez le rat ont rapporté que des régimes modérément faibles en protéines, 5% à 6% de l'énergie, induisent une augmentation de la prise alimentaire [167–169]. Chez la souris, cette augmentation de prise alimentaire sera d'autant plus marquée que la température diminue (22°C vs 30°C) [170]. Chez l'homme également, il a été montré qu'un régime modérément faible en protéines induit une augmentation de la prise alimentaire pour rétablir un statut protéique adéquat [171,172]. Cependant, d'autres études rapportent une diminution de la prise alimentaire suite à une restriction protéique [173–175]. Différents facteurs peuvent influencer les effets des régimes faibles en protéines, notamment l'âge, le pourcentage de déficience, la durée de restriction, ou encore l'état physiologique [169,176]. Il apparaît qu'une restriction protéique modérée induit une augmentation de la prise alimentaire, alors qu'une restriction sévère induit une diminution de celle-ci [177].

Un certain nombre de travaux ont émis l'hypothèse qu'une déficience modérée en protéines (5 à 10%), induit une hyperphagie afin d'augmenter l'apport en protéines et AA pour couvrir les besoins [174,178–180]. En revanche, lorsque la restriction est sévère (moins de 5% de protéines), un phénomène d'aversion est observé. Une zone du cerveau appelé cortex piriforme antérieur (aPC) serait responsable de la mise en place de cette aversion [181,182]. La diminution des AA dans le plasma, le liquide cébrospinal, et le cerveau, en réponse à un régime faible en protéines, activerait la voie de signalisation GCN2 au niveau de l'aPC. GCN2 phosphorylerait alors eIF2 α et le *Glutamate Receptor 1* (GluR1), activant la voie glutamatergique responsable de la modification du comportement alimentaire [80,183,184].

De même que pour la déficience en protéines, la déficience en un AAI a un impact sur la prise alimentaire. Des études de choix ont montré que des rats diminuent rapidement leur consommation d'un régime déficient en leucine, ou en thréonine au profit d'un régime équilibré en tous les AA [185,186]. Des rats soumis à un régime déficient en L-lysine (8%) vont également se tourner vers des régimes équilibrés

composés de L-lysine pour aider à contrebalancer cet état de déficience [187]. La déficience en AAI entraînant un déséquilibre en AA, l'aPC serait responsable de la mise en place de l'aversion lors de régimes déséquilibrés en AAI [181,182]. Lorsqu'un régime présente une déficience en un AAI, les rats le détectent rapidement et vont alors diminuer la consommation de ce régime, dans le but de favoriser la prise alimentaire d'une alimentation plus équilibrée, si le choix est permis entre un régime déficient et un régime équilibré en AAI [182,183,185].

L'ensemble de ces données montrent que le degré de déficience (sévère ou modérée) en protéines ou en un seul AAI induit des réponses physiologiques différentes sur la prise alimentaire.

1.3.2. Effet d'une déficience en protéines et acides aminés indispensables sur la dépense énergétique

Chez le rat, les régimes modérément faibles (5 à 10%) en protéines entraînent une augmentation de la prise alimentaire, induisant alors une augmentation de l'apport énergétique avec un risque d'augmenter l'adiposité [169,188].

Parallèlement à l'augmentation de prise alimentaire en réponse à des régimes modérément faibles (5 à 10%) en protéines, la dépense énergétique augmente, permettant de contrebalancer l'excès d'apport énergétique, et ainsi limiter la prise de tissu adipeux [160,170,174,188,189]. En effet, Blais et al. ont mis en évidence que des souris nourries *ad libitum* avec un régime à 6% de protéines présentaient une augmentation de la dépense énergétique par rapport à des souris nourries avec un régime à 20% de protéines. La dépense énergétique tient compte de différentes composantes : la dépense énergétique de repos, la dépense énergétique liée à l'activité motrice et la dépense énergétique totale. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'augmentation de la dépense énergétique était due au fait que les souris sous restriction protéique présentaient une augmentation du niveau et du coût de l'activité, sans modification de la thermogénèse au sein du TAB comme l'ont montré d'autres études [190–192].

En réponse à des régimes faibles en protéines, l'augmentation de la dépense énergétique pourrait être responsable de l'augmentation de prise alimentaire, permettant une compensation partielle de la déficience, mais limiterait aussi la prise de tissu adipeux dû à l'augmentation de la prise alimentaire. Un certain nombre de travaux ont montré que la restriction protéique, sans restriction énergétique, augmentait la dépense énergétique via une augmentation de FGF21, qui entraîne l'augmentation d'UCP1 dans le TAB [105,193–195]. Contrairement à d'autres études qui ont montré que FGF21 ne nécessitait pas UCP1 pour augmenter la dépense énergétique [160,170,196]. Un travail de Hill et al. a montré que des souris KO-*Ucp1*, ne présentait pas de modifications de la dépense énergétique en réponse à une restriction protéique, malgré une augmentation de FGF21. Ils ont également observé une diminution de la prise alimentaire chez les souris KO-*Ucp1* en accord avec de précédents travaux [197,198]. Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse que la suppression d'UCP1 serait responsable de l'effet anorexigène de FGF21.

Ces résultats pourraient indiquer que la modulation de la dépense énergétique pourrait être le premier paramètre modifié en réponse à une restriction protéique, nécessitant dans un second temps une augmentation de la prise alimentaire pour compenser l'augmentation de cette dépense énergétique [194,195,199,200].

Différentes études montrent que la déficience en un seul AAI suffisait à augmenter la dépense énergétique, c'est le cas notamment de la déficience en méthionine et en thréonine [201–204].

1.3.3. Régulation du métabolisme protéique

Le maintien d'un bilan azoté équilibré est le résultat d'un équilibre entre deux phases : la phase de mobilisation des protéines corporelles, à jeun, et la phase de dépôt protéique, à l'état nourri. Les taux circulants d'AA influencent la dynamique du métabolisme protéique [1,18,112].

A l'état nourri, l'oxydation des AA et la protéosynthèse augmentent alors que la protéolyse des protéines corporelles totales diminue [205]. Lors de la transition de l'état nourri à l'état post-absorptif, l'oxydation des AA sera au plus bas, et la protéolyse sera supérieure à la protéosynthèse afin de fournir les AA dont l'organisme a besoin [206,207].

Les AA proviennent de la dégradation des protéines du foie et de l'intestin principalement, puis après quelques heures, la majeure partie des AA sont fournis par le muscle [208]. Le processus d'autophagie permet le maintien des niveaux d'AA plasmatiques.

Les protéines musculaires sont catabolisées pour libérer des AA libres qui sont soit réincorporés dans des protéines musculaires, soit utilisés pour d'autres besoins physiologiques. Ces AA pourront ainsi être utilisés pour la synthèse de protéines dans d'autres organes, oxydés pour fournir de l'énergie, ou inclus dans d'autres voies métaboliques tel que la néoglucogenèse dans le foie par exemple [208]. Les AA libres provenant du catabolisme des protéines musculaires permettent également la synthèse de protéines du système immunitaire, de protéines plasmatiques, d'hormones et d'enzymes intra et extracellulaires [209]. A l'état post-absorptif, la voie mTOR ne sera pas activée diminuant alors la synthèse protéique et augmentant la dégradation des protéines et l'autophagie [210–212]. En parallèle, la voie GCN2/ATF4 et la voie AMPK seront activées permettant d'inhiber la protéosynthèse [63,213].

1.3.4. Organes sensibles à l'apport en protéines et acides aminés indispensables

1.3.4.1. Impact de la déficience en protéines et acides aminés indispensables sur le foie

Le foie est le premier organe à être atteint par les AA. Après avoir été absorbés par les entérocytes, les AA passent dans la veine porte et sont dirigés vers le foie (**Figure 15**). Les AA issus de la protéolyse rejoignent également le foie par la circulation générale. Selon les besoins métaboliques, le foie contrôle le flux d'AA en direction des organes périphériques. Parmi les AA arrivant au foie, il a été montré que

20% sont utilisés pour la synthèse protéique, 57% sont catabolisés, et 23% sont excrétés dans la veine cave en direction des organes périphériques [18]. Le foie permet également la synthèse d'autres composés à partir des AA. Certains AA seront convertis en glucose via la néoglucogenèse, d'autres en corps cétoniques via la cétogenèse. Les AA en excès seront désaminés, ce qui correspond à la perte du groupe α -aminé par un AA, ou transaminés, ce qui correspond au transfert du groupe α -aminé d'un AA à un α -acide cétonique conduisant à la formation d'un nouvelle AA. Une fois désaminés, les AA sont soit convertis dans les voies du métabolisme énergétique, soit oxydés. Le foie est un site majeur du métabolisme des AA et de la synthèse protéique. Il synthétise ses propres protéines mais également des protéines plasmatiques comme l'albumine, la transferrine ou les lipoprotéines. Il est également le site majeur du catabolisme des AA. En effet, le foie est le seul organe à avoir la capacité à neutraliser rapidement l'ammoniac en l'utilisant pour la synthèse d'urée [214]. La fonction amine des AA sera alors dirigée en direction du foie pour subir l'uréogénèse alors que le squelette carboné intégrera le cycle de Krebs. Le NH_3 libéré permettra la synthèse de carbomoyl-phosphate qui rentrera dans le cycle de l'urée, qui sera ensuite éliminée dans les urines [215].

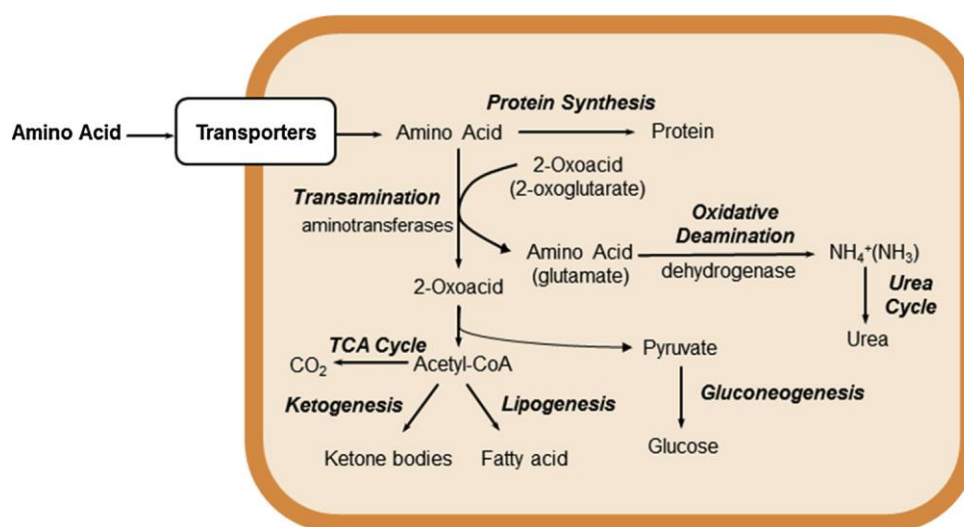


Figure 15. Métabolisme hépatique des acides aminés [215]

Les principales fonctions de foie dans le métabolisme des protéines et des AA sont : la synthèse des AA, la transamination et la désamination, la synthèse de protéines plasmatiques et la synthèse de l'urée.

La déficience en protéines et en AAI impacte le métabolisme hépatique. Il a été montré que des rats nourris avec un régime déficient en protéines ou protéoprive présentaient une diminution du poids du foie, d'autant plus marquée lorsque la période de restriction était longue [216,217]. Il a également été observé une diminution de l'expression de gène de la lipogenèse hépatique et une tendance à réduire le contenu lipidique du foie [218]. Chez des enfants malnutris, déficients en protéines, une diminution de la croissance et du poids de certains organes comme le foie est observé [219]. De plus, la concentration des protéines sériques, tel que l'albumine et les apolipoprotéines, est diminuée en réponse à une déficience en protéines [219–221].

Le métabolisme protéique hépatique est impacté par la déficience en protéines. Chez le porc, un régime déficient en protéines (3%) est associé à une réduction du turnover protéique avec une diminution du taux de synthèse protéique dans le foie [222]. D'autres études chez le rat ont également rapporté une diminution du taux de synthèse protéique dans le foie en cas de restriction protéique [223–225].

Ces différents travaux indiquent que la réduction du contenu protéique est expliquée par une diminution du taux de synthèse protéique. Yoshizawa et al., ont étudié les causes de la diminution de la synthèse protéique chez des rats nourris avec un régime protéoprive [226]. Ils ont observé une augmentation du complexe 4E-BP1–eIF4E, qui diminue ainsi la liaison de eIF4E avec le facteur d'initiation eIF4G. Le complexe d'initiation de la traduction est alors diminué ce qui a pour conséquence de réduire la synthèse protéique [226]. Chez le rat, l'autophagie est stimulée par l'activation de la formation des autophagosomes [218,227]. L'autophagie est efficace pour fournir des AA en réponse à une restriction protéique. L'oxydation des AA est réduite afin de limiter les pertes azotées et ainsi augmenter l'efficacité d'utilisation de ces AA, dans le but de maintenir un équilibre azoté [228,229].

La déficience en un seul AAI a également des conséquences sur l'ensemble du métabolisme hépatique. Il a été montré qu'une restriction sévère en lysine (75% de restriction) augmente le contenu lipidique du foie, alors qu'une restriction modérée (50% de restriction) ne modifie pas le métabolisme lipidique [230]. Concernant l'impact sur le métabolisme protéique, une étude menée chez le rat a montré une diminution de la synthèse protéique dans le foie en réponse à un régime à base de gluten, déficient en lysine [231]. Chez le porc, une étude a montré qu'une déficience modérée en thréonine induit une augmentation de la synthèse protéique dans le foie [232], alors qu'une étude de Wang et al. a montré qu'une restriction sévère en thréonine impliquait une réduction de la synthèse protéique [233].

La restriction en méthionine induit également des modifications métaboliques au niveau du foie. Chez la souris, la déficience en méthionine a un effet sur le métabolisme lipidique et glucidique au niveau du foie induisant une augmentation de la sensibilité à l'insuline et diminuant la néoglucogenèse, le risque de diabète de type 2, l'hypertension et la stéatopathie non alcoolique (*Non Alcoholic Fatty Liver Disease* ou NAFLD) [234–237]. L'effet positif de la déficience en méthionine sur la stéatose hépatique passe par une diminution de la synthèse des triglycérides et de l'oxydation des acides gras. La diminution de la lipogenèse *de novo* est dû à une diminution de l'expression de l'acide gras synthase, de l'acétyl CoA carboxylase 1 ainsi que de la stearoyl CoA desaturase [234,238]. L'exportation des lipides du foie est également augmentée chez les souris soumises à une restriction en méthionine [239]. Sur le métabolisme protéique, la restriction en méthionine réduit le taux de synthèse des protéines cytosoliques dans le foie, mais aucune différence n'est observée concernant la synthèse des protéines mitochondriales [240].

1.3.4.2. Impact de la déficience en protéines et acides aminés sur le muscle

Avec le foie, le muscle joue un rôle essentiel dans le métabolisme des AA et la synthèse protéique. Il capte les AA plasmatiques pour la protéosynthèse et le catabolisme de ses protéines lui permet de libérer

des AA libres pour d'autres organes périphériques. Le muscle squelettique est le principal organe permettant le catabolisme des AA à chaînes ramifiées (AACR) (leucine, valine, isoleucine). Un certain nombre de travaux ont montré que les AACR ont un rôle important dans le turnover protéique au niveau du muscle. Différentes études *in vitro* sur des cellules musculaires ont montré que les AACR, et plus particulièrement la leucine, stimulait la synthèse protéique et inhibait la protéolyse [241–243]. Ces résultats ont été confirmés par des études chez l'animal, en particulier chez le rat [244,245]. Durant la synthèse des protéines dans le muscle squelettique, l'absorption de glutamine dans la cellule s'accompagne d'une absorption de leucine [246]. La concentration intracellulaire de leucine active des médiateurs tel que les Rag GTPases qui induisent la localisation de mTOR à la surface du lysosome [247,248]. Une fois mTOR activé, il active 4E-BP1 et S6k qui activent l'étape d'initiation de la traduction protéique. Il semblerait que la leucine puisse également stimuler la synthèse protéique en stimulant la phosphorylation de 4E-BP1 qui permet alors la libération de eIF4E induisant l'initiation de la traduction [249].

La déficience en protéines induit une diminution du gain de poids corporel chez des rats en croissance avec une diminution de la masse maigre dû en partie à une diminution du poids des muscles squelettiques [167]. La synthèse protéique est diminuée en réponse à des régimes déficients en protéines, ce qui provoque une diminution de la masse du muscle *soleus* et de son contenu protéique [250]. La diminution de la disponibilité en AA induit la diminution de l'activité du facteur d'initiation de la traduction protéique eIF2B qui implique alors une diminution de la protéosynthèse [251]. D'autres études chez le rat ont mis en évidence qu'une restriction protéique était associée à une diminution de la synthèse des protéines dans l'*extensor digitorum longus muscle* [252–254]. La restriction protéique impact également le transport des AA vers le muscle. Une étude a notamment montré que les transporteurs d'AA (SLC1A1, SLC1A2, SLC7A1 et SLC7A2) étaient sous-régulés dans le muscle en réponse à des régimes déficients en protéines [255] .

En cas de restriction protéique, la diminution de la protéosynthèse est associée à une diminution de la protéolyse. L'activité de la voie ubiquitine-protéasome est réduite du fait d'une diminution de l'activité du protéasome. De plus, la diminution de la synthèse des ARNm codant pour l'*ubiquitin-protein ligase* E3 entraîne une diminution de l'ubiquitination des protéines [250]. Il a également été observé une diminution de l'activité des caspases 3 [250,252] et de la voie lysosomale, avec une diminution de l'activation des cathepsines [256]. Cela semble être un mécanisme d'adaptation permettant au muscle d'épargner ces protéines du fait de la diminution de la disponibilité des AA pour la synthèse de protéines [250,252].

La restriction en un seul AAI impacte le métabolisme protéique au niveau du muscle. Ainsi, chez le rat, il a été montré qu'une restriction sévère en lysine (75% de restriction) augmente le contenu protéique du muscle, ce qui n'est pas le cas d'une restriction modérée (50% de restriction) [230]. De plus, chez

des porcs en croissance, une étude a montré que la déficience en lysine diminue la synthèse des protéines et l'accrétion protéique dans le muscle [257]. La déficience en thréonine diminue également la synthèse des protéines dans le muscle chez des jeunes porcs [233].

1.3.5. FGF21 et apport protéique

FGF21 est régulé par l'apport protéique et son expression est contrôlée par la voie GCN2 [157,159,160,170,258] (**Figure 16**). De Sousa-Coelho and al. ont mis en évidence qu'une déficience en leucine induit une augmentation de FGF21 hépatique *in vitro* et *in vivo* impliquant la voie GCN2-EIF2 α -ATF4. Ils ont identifié une séquence AARE en 5' sur le gène *Fgf21*, séquence sur laquelle va se fixer le facteur de transcription ATF4 permettant la transcription de *Fgf21*. En plus de la voie GCN2-EIF2 α -ATF4, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha* (PPAR α) apparaît être un autre régulateur de la sécrétion de FGF21. Une délétion de PPAR α provoque une diminution de FGF21 plasmatique chez des souris soumises à une restriction protéique. Ainsi, en réponse à un régime faible en protéines, une rapide augmentation de FGF21 circulant provenant du foie est observée, nécessitant à la fois la voie GCN2 et PPAR α [259,260].

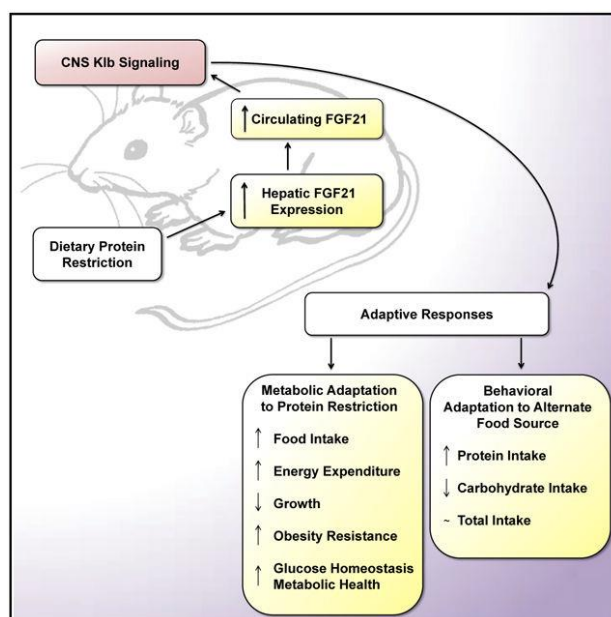


Figure 16. Effet d'une restriction protéique via FGF21 [281]

La restriction protéique augmente l'expression hépatique et les taux circulants de FGF21. FGF21 va alors agir au niveau du SNC et au niveau périphérique pour induire une diminution du poids et augmenter la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Chez des souris KO-*Fgf21*, les effets de la restriction protéique sur le poids, la prise alimentaire et la dépense énergétique sont reversés, suggérant que FGF21 est nécessaire pour médier les effets des régimes faibles en protéines. De plus, la délétion du corécepteur β -klotho dans le système nerveux central (SNC) de souris mime le même phénotype que les souris KO-*Fgf21*, avec une annulation des effets des

régimes faibles en protéines [261]. Cela suggère que FGF21 agit également via le SNC pour induire les effets métaboliques de la restriction protéique.

FGF21 est augmenté en réponse à des régimes faibles en protéines mais le contexte nutritionnel induit des réponses métaboliques différentes. La restriction protéique accompagnée d'une augmentation de l'apport énergétique, due à une hyperphagie, induit une augmentation de FGF21 [160,174,262]. Au contraire, une restriction protéique associée à une restriction énergétique n'induit pas d'augmentation de prise alimentaire et diminue le poids, mais augmente le niveau de FGF21 [108,263]. En cas de restriction énergétique sans restriction protéique, FGF21 n'est pas induit [264].

Cependant, la déficience en protéines est souvent associée à une augmentation de la part des glucides. Ainsi, il est important de définir le rôle des glucides dans la sécrétion de FGF21 lors d'une restriction protéique. Il apparaît que l'apport en glucides régule FGF21. En effet, les régimes cétogènes (faibles en glucides) [265,266], ainsi que les régimes riches en glucides [267,268] induisent une augmentation de FGF21. Chez l'homme, un apport élevé en glucides augmente la sécrétion de FGF21, contrairement à une augmentation en lipides [269]. L'ingestion de fructose augmente de manière aiguë les niveaux de FGF21 [270]. Chez la souris, un apport élevé en glucides augmente d'une part la sécrétion de FGF21, d'autre part l'expression des ARNm d'UCP1, FGFR1c ainsi que de KLB dans le tissu adipeux brun [271]. Il a été montré que l'augmentation de FGF21 était régulée par le facteur de transcription *Carbohydrate Response Element Binding Protein* (ChREBP), activé par le glucose [272]. L'ARNm de ChREBP est augmenté dans le foie et le TAB en réponse à des régimes riches en glucides. FGF21 est également décrit comme un signal satiétogène jouant un rôle dans la préférence pour le sucre [106]. En réponse à un apport élevé en glucides, FGF21 supprime la préférence pour les sucres [106]. Le travail de Solon-Biet et son équipe [108] appuie les résultats trouvés par Laeger and al. [259], montrant que les régimes faibles en protéines ont un rôle majeur dans l'augmentation de la sécrétion de FGF21. Ils montrent également que cette augmentation se trouve être d'autant plus marquée lorsque la restriction en protéines est associée à un apport élevé en glucides. De plus, le travail de Laeger a testé les effets d'un régime cétogène, diminuant les glucides et augmentant les lipides, et d'un régime faible en protéines, augmentant les glucides et diminuant les lipides, sur la sécrétion de FGF21 [259]. Dans les deux cas, une induction de FGF21 est observée. Ainsi, ils émettent l'hypothèse que FGF21 serait médiée par les protéines et non pas par les glucides.

Selon l'environnement nutritionnel, FGF21 induit différentes conséquences sur la préférence alimentaire. Dans le cas, où l'animal se trouve en présence uniquement d'un régime faible en protéines, FGF21 permet grâce à son action via le SNC d'augmenter la prise alimentaire [261]. Cependant, si l'animal peut avoir accès à d'autres sources protéiques, FGF21 joue un rôle dans la préférence alimentaire, en augmentant l'apport protéique sans augmenter la prise alimentaire.

Plus récemment, il a été montré qu'une déficience en un seul AAI agit sur la sécrétion de FGF21. Différentes études ont observé une augmentation de FGF21 en réponse à une restriction en méthionine, thréonine ou tryptophane [203,236,273], suggérant que la déficience en un AAI mime les effets d'une restriction protéique sur FGF21.

2. Chapitre II. Travail personnel

2.1. Justification et objectifs des travaux

La qualité et la quantité de l'apport en protéines est devenue une question particulièrement sensible dans le contexte des débats actuels sur l'augmentation de la population mondiale, les problèmes de dénutrition et la nécessité de rééquilibrer l'apport des sources protéiques animales et végétales. Comme présenté dans la partie introductive, les protéines ont un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'organisme. Les apports protéiques doivent couvrir les besoins en azote et en AAI et un déficit d'apport a des retentissements importants sur l'organisme. Ainsi, un régime déficient en protéines induit une diminution du gain de poids corporel liée à une diminution du gain de masse maigre. Le régime déficient en protéines impact également le métabolisme énergétique, induisant une augmentation à la fois de la consommation énergétique, qui tend à compenser la déficience en protéines, mais aussi de la dépense énergétique, limitant ainsi le gain d'adiposité dû à l'augmentation de la prise alimentaire. Ces effets de la restriction protéique sur le poids et la dépense énergétique semblent médiés par une hormone hépatique, FGF21. La déficience en un seul AAI suffit à diminuer le gain de poids corporel. Cependant, l'impact de cette déficience sur la prise alimentaire et la dépense énergétique est encore peu clair. De plus, l'implication de FGF21 dans les effets médiés par la restriction en un AAI n'a pas été caractérisée.

Du fait de l'impact de la déficience en protéines et AAI sur le métabolisme, il est important que leurs apports soient satisfaisants et couvrent les besoins nutritionnels de l'organisme. Ainsi, il est nécessaire de connaître précisément le besoin en chaque AAI. Comme nous l'avons présenté dans la partie introductive, ce besoin a d'abord été défini à partir d'un bilan azoté puis par des méthodes utilisant la perfusion d'isotopes stables, la méthode du bilan traceur qui mesure l'oxydation de l'AA testé, par exemple la lysine-13C, et celle de l'oxydation de l'AA indicateur qui mesure l'oxydation d'un AA témoin, souvent la phénylalanine-13C, en fonction de l'apport de l'AA étudié. Cependant, ces méthodes sont lourdes et invasives et les valeurs de besoins obtenus diffèrent grandement selon la méthode utilisée, rendant impossible la détermination d'une recommandation. La FAO recommande de développer de nouvelles méthodes, non invasives, afin de préciser le besoin en chaque AAI. Parmi ces méthodes, les nouvelles technologies « omiques », comme la métabolomique, ont été proposée pour mesurer les besoins en AAI.

Les travaux de recherche qui ont été réalisés au cours de cette thèse avaient deux objectifs :

- Evaluer l'impact des régimes faibles en protéines et en AAI (lysine et thréonine) sur le métabolisme énergétique et protéique
- Identifier des biomarqueurs de la déficience en protéines et AAI (lysine et thréonine) à l'aide d'analyses métabolomiques dans différents fluides biologiques tels que l'urine et le plasma

2.2. Protocole expérimental

Afin de répondre à ces objectifs, trois études chez le rat en croissance ont été réalisées. Le modèle du rat en croissance a été choisi car une déficience d'apport en protéines ou AAI a un impact sur la croissance et a ainsi, des effets plus marqués chez des jeunes rats comparativement à des rats adultes. Le régime contenant 15% de protéines correspond au niveau d'apport permettant de couvrir les besoins en protéines décrit dans le rapport *Nutrient Requirement of laboratory animals*, (NRC, 1995) [274]. Concernant les besoins protéiques du rat en croissance, 20% de protéines de lait est la recommandation établie par *l'American Institute of Nutrition-93* (AIN-93) [275]. Les niveaux de déficience pour les AA ont été établis par rapport aux besoins décrits dans le NRC, 1995 [274], indiquant que le besoin est couvert avec un régime contenant 9.2 g/kg de lysine et 6.2 g/kg de thréonine pour des rats en croissance.

La première étude avait pour objectif d'évaluer l'impact de la déficience en protéines chez les rats en croissance. La protéine de lait totale, qui est une protéine de référence équilibrée en tous les AA, a été utilisée comme source protéique. Le pourcentage de protéines dans les régimes a été diminué afin d'obtenir différents niveaux d'apport protéique représentant 3%, 5%, 8%, 12%, 15% ou 20% de l'énergie, 20% de protéines étant le régime contrôle correspondant à la recommandation. Ces régimes sont référencés dans les articles et la présentation des résultats sous la forme de P pour protéines suivi du niveau d'apport protéique soit : P3, P5, P8, P12, P15, P20.

Les deuxième et troisième études avaient pour objectif d'évaluer les effets de la déficience en lysine et thréonine, respectivement, sur le métabolisme protéique et énergétique. Préalablement aux recherches menées dans le cadre de ce projet de thèse, une étude pilote a été réalisée afin d'évaluer l'impact de la déficience en lysine et en thréonine chez le rat en croissance. Afin d'induire une déficience en lysine et en thréonine, le gluten a été utilisé comme source protéique. En effet, c'est une protéine déséquilibrée en AAI, déficiente en lysine et en thréonine. Elle apporte seulement 30% du besoin en lysine et 53% du besoin en thréonine pour des rats en croissance. Etant donné que les niveaux de déficience en AAI sont différents et ne peuvent être maîtrisés, il est difficile de différencier les effets d'une déficience en chaque AAI de ceux des niveaux de déficience de ces AAI. Ainsi, le peu d'effets observés pour la thréonine pouvait être dû à la moindre déficience de cet AAI (53%) comparativement à la lysine (30%) dans le gluten. Nous avons donc choisi de travailler avec un régime modèle, dans lequel le niveau de déficience en AAI test est contrôlé. Pour cela, le pourcentage de protéines de lait totale a été réduit jusqu'à obtenir des niveaux de déficience en protéines, et donc aussi en lysine et en thréonine de 85%, 75%, 60%, 40%, 25%, ou 0% (régime contrôle). En pratique, le niveau d'apport protéique pour induire ces déficiences correspond à 3%, 5%, 8%, 12%, 15% ou 20% de l'énergie, comme pour l'expérimentation 1. Puis, les autres AA sont ajoutés sous forme d'AA libres pour atteindre le niveau du régime contrôle P20, à l'exception de la lysine ou de la thréonine. Ces régimes sont référencés dans les articles et la présentation

des résultats sous la forme suivante : L/T15, L/T25, L/T40, L/T60, L/T75, P20, L/T100 et L/T170, soit L pour lysine ou T pour thréonine.

Ainsi, les régimes de la deuxième étude (lysine) ont été composés de la manière suivante :

- Le régime L15 est composé de PLT à 3%, qui induit une déficience en lysine de 85%, à laquelle nous avons ajouté tous les AA à hauteur du besoin, excepté la lysine. Ce régime couvre ainsi 15% du besoin en lysine et 100% du besoin des autres AA.
- Le régime L25 est composé de PLT à 5%, qui induit une déficience en lysine de 75%, à laquelle nous avons ajouté tous les AA à hauteur du besoin, excepté la lysine. Ce régime couvre ainsi 25% du besoin en lysine et 100% du besoin des autres AA.
- Il en est de même pour les autres régimes L40, L60 et L75. Le régime P20 est le régime contrôle qui couvre tous les besoins en AA.
- Dans les deux dernières études, nous avons ajouté un régime contrôle, le régime L100, qui est un régime composé de PLT à 3%, complété par tous les AA à hauteur du besoin pour couvrir 100% du besoin en tous les AA, y compris en lysine. Ce régime permet d'évaluer les effets de l'apport en AAI libres comparativement au P20.
- En outre, un régime supplémentaire présentant non pas une déficience mais un excès de lysine, a été ajouté à cette étude afin d'évaluer le comportement des biomarqueurs lorsque les niveaux d'apport en AAI dépassent le besoin. Il est composé de PLT à 20% qui couvre le besoin en tous les AA, auquel nous avons ajouté de la lysine pour dépasser la valeur du besoin et couvrir 170% du besoin en lysine.

Les régimes de la troisième étude (thréonine) ont été composés selon le même protocole que ceux de l'expérimentation 2. Dans ces régimes, l'AAI déficient n'est pas la lysine mais la thréonine.

Le protocole expérimental a été le même pour les trois études que nous avons menées. Après une période d'habituation d'une semaine, les rats ont été alimentés durant 3 semaines avec les régimes expérimentaux (**Figure 17**). Au cours de ces expérimentations, nous avons étudié les effets sur le métabolisme énergétique et protéique.

Mesure du métabolisme énergétique

L'impact sur le métabolisme énergétique a été analysé grâce aux mesures de prise alimentaire, de poids et de composition corporelle, à la mesure de la dépense énergétique par calorimétrie indirecte ainsi que par l'analyse de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique par qPCR (**Article 1 p.63 et Article 2 p.95**). Lors de la 3^{ème} semaine, les rats ont été placés en cage à calorimétrie indirecte pendant 48h (dont 24h d'habituation) afin de mesurer leur dépense énergétique totale (DET) et leur activité motrice. Cette méthode repose sur le fait que la dépense énergétique est liée au métabolisme oxydatif des nutriments, et utilise la consommation d'oxygène et la production de CO₂ comme mesure de la dépense énergétique totale.

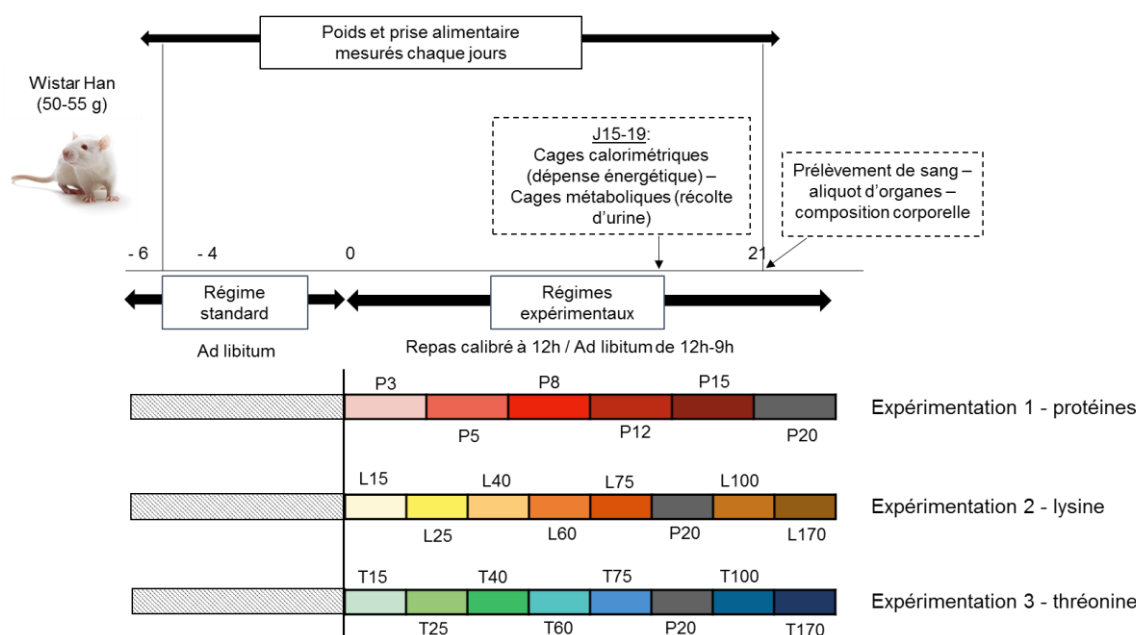


Figure 17. Protocole expérimental

Les trois expérimentations chez le rat en croissance (50-55 g) ont suivi le même protocole expérimental. Après une semaine d'habituation, : (1) *expérimentation 1* : 36 rats en croissance ont été répartis en 6 groupes nourris avec des régimes contenant différents niveaux de protéines : P3, P5, P8, P12, P15 ou P20; (2) *expérimentation 2* : 64 rats ont été répartis en 8 groupes et nourris avec des régimes contenant différents niveaux de lysine : L15, L25, L40, L60, L75, P20, L100 ou L170 ; (3) *expérimentation 3* : 64 rats ont été répartis en 8 groupes et nourris avec des régimes contenant différents niveaux de thréonine : T15, T25, T40, T60, T75, P20, T100 ou T170. Dans ces trois expérimentations, les rats ont suivi leur régime test durant 3 semaines. Le poids et la prise alimentaire ont été mesurés quotidiennement. Au cours de la 3^{ème} semaine, les rats ont été placés en cages métaboliques afin de collecter les urines, puis en cages calorimétriques pour les mesures de la dépense énergétique. A la fin des trois semaines d'expérimentations, les animaux ont été euthanasiés, des échantillons de sang et les organes ont été prélevés, et la composition corporelle a été analysée.

Le dispositif de cage à calorimétrie indirecte permet de mesurer les échanges gazeux respiratoires (consommation d'O₂, et production de CO₂). La DET est alors déterminée à l'aide de l'équation de Weir : $DET = 16.3 VO_2 + 4.57 VCO_2$.

En outre, les cages sont placées sur un plateau qui enregistre l'activité grâce à des capteurs de force qui produisent un signal électrique proportionnel à l'intensité du travail fourni par l'activité du rat. Les données d'activité et du coût de l'activité permettent de calculer :

- La dépense énergétique de repos : $DER = DET - (\text{activité} \times \text{coût de l'activité})$.
- La dépense énergétique d'activité : $DEA = DET - DER$.

A la fin de l'expérimentation, les animaux ont été nourris avec un repas calibré de leur propre régime test (58.2 kJ), puis ils ont été euthanasiés 2h après la distribution du repas. Des échantillons de sang, de foie, de muscles, de tissu adipeux blanc, de TAB et d'hypothalamus ont été prélevés afin d'effectuer des mesures d'expression géniques, et des dosages de FGF21.

Mesure du métabolisme protéique

Le métabolisme protéique a été évalué par mesure de la synthèse protéique suite à l'injection de la valine ^{13}C (isotope stable du carbone) et à la mesure de son incorporation dans les protéines nouvellement synthétisées dans le foie et le muscle par spectrométrie de masse. L'expression de gènes impliqués dans le métabolisme protéique a été analysée par qPCR. De plus, des analyses de western blot et de protéomiques sont en cours de réalisation en collaboration avec Valérie Labas de la plateforme PIXANIM du Centre INRAE de Nouzilly.

Afin de mesurer la synthèse protéique, les rats ont été nourris avec un repas calibré de leur propre régime test (58.2 kJ), puis 1h30 après la distribution du repas, une injection de valine marquée au ^{13}C a été réalisée au niveau de la queue. Trente minutes plus tard, les rats ont été euthanasiés, le foie et le muscle gastrocnémien ont été prélevés.

Afin de mesurer la synthèse protéique, nous avons utilisé une technique qui repose sur un modèle simplifié du métabolisme protéique impliquant deux compartiments :

- Le compartiment des AA libres intracellulaires, considéré comme le compartiment précurseur de la synthèse protéique
- Le compartiment protéique tissulaire

Cette technique consiste à surcharger le compartiment des AA libres intracellulaires en valine- ^{13}C et à mesurer sa vitesse d'incorporation dans les protéines tissulaires au bout de 30 min (**Figure 18**).

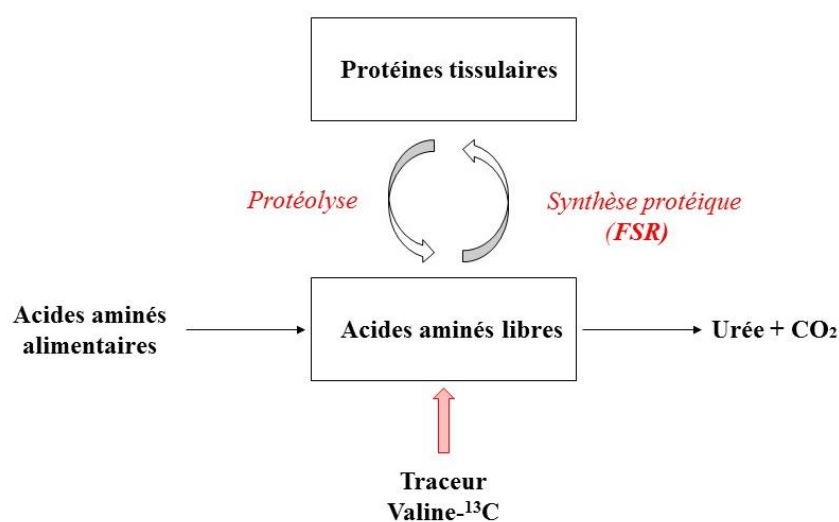


Figure 18. Modèle à deux compartiments utilisés pour les mesures in vivo des taux de synthèse protéique

La vitesse de synthèse protéique est calculée en surchargeant le compartiment d'AA libres avec un traceur, la valine- ^{13}C , et en calculant sur une période définie l'enrichissement en ce traceur au sein des protéines tissulaires. Le rapport entre l'enrichissement des deux compartiments permet de calculer le taux fractionnaire de synthèse protéique FSR.

Pour ces analyses, les tissus ont été broyés, et les protéines précipitées à l'aide de l'acide sulfosalicylique. Cette étape permet de dissocier deux phases : le surnageant contenant la fraction d'AA libres, et le culot contenant les protéines tissulaires. Après purification et extraction des AA libres grâce à une résine échangeuse de cations, les AA ont été dérivés avec un mélange d'acétonitrile/NTBSTFA (N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide) afin de les rendre volatils, puis séparés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

Les protéines tissulaires ont été hydrolysées à l'aide d'acide chlorhydrique, puis les AA obtenues purifiées grâce à une résine échangeuse de cations. Ils ont été ensuite dérivés avec de l'éthylchloroformate avant d'être quantifiés par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une combustion et d'un couplage à un spectromètre de masse à ratio isotopique (GC-C-IRMS). Le GC-MS et GC-C-IRMS permettent de mesurer le rapport isotopique valine-¹³C/valine¹²-C.

La vitesse de synthèse protéique a été calculée à l'aide du taux fractionnaire de synthèse protéique (FSR ou *Fractionnal Synthesis Rate*) qui est le rapport entre l'enrichissement isotopique du compartiment d'AA libres et l'enrichissement du compartiment des protéines tissulaires :

$$FSR = \frac{E_{valine\ protéique} - E_{basal}}{E_{valine\ libre} \times t_{inc}} \times 100$$

Avec $E_{valine\ protéique}$: enrichissement en valine-¹³C dans les tissus ; E_{basal} : enrichissement basal ; $E_{valine\ libre}$: enrichissement en valine-¹³C dans le compartiment d'AA libres ; et t_{inc} : le temps d'incorporation de la valine-¹³C (30 min). La FSR est exprimé en %/jour.

En plus du FSR, nous avons déterminé le taux de synthèse absolu (ASR ou *Absolute Synthesis Rate*) exprimé en g/j. Il est déterminé par la formule suivante : **ASR = FSR x P_{tissu}**, où P_{tissu} correspond à la teneur en protéines du tissu analysé qui est déterminé par un dosage à l'analyseur élémentaire, qui permet de déterminer le pourcentage d'azote d'un échantillon.

Outre ces mesures de vitesse de synthèse protéique, des analyses d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme protéique ont été réalisés par qPCR, ainsi que des dosages d'AA dans la veine porte et la veine cave réalisés par chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC).

Analyse Métabolomique

Enfin, des analyses métabolomiques ont été réalisées sur les urines collectées durant la 3^{ème} semaine en cages métaboliques et sur les plasmas correspondant au sang de la veine porte et de la veine cave prélevés à la fin de l'expérimentation. Les analyses de métabolomiques ont été effectuées par la plateforme BioMet, en collaboration avec l'équipe de Jean-Charles Martin, au centre de recherche en cardiovasculaire et nutrition (C2VN), à l'INRAe de Marseille. Le profil du métabolome a été analysé dans les urines, la veine cave et la veine porte grâce à des analyses de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS). Les données de spectres de masse obtenues pour les échantillons d'urine, de veine

porte et de veine cave, ont permis d'obtenir 3 matrices. Chaque matrice a été prétraitée. Les données ont été normalisées avec la méthode PQN (Probabilistic Quotient Normalisation) et centrées-réduites avec Pareto. Une fois, les données prétraitées, deux méthodes d'analyses multivariées ont été appliquées : un modèle quantitatif, la régression PLS et un modèle qualitatif, ICDA. Enfin, pour chaque métabolite discriminant identifié par PLS ou ICDA, l'effet des régimes a été testé par ANOVA à un facteur.

2.3. Conséquences d'une déficience en protéines

2.3.1. Contexte et objectifs

La déficience en protéines a un impact important sur l'ensemble du métabolisme. Un certain nombre de travaux ont montré que les régimes faibles en protéines induisent une augmentation de la prise alimentaire et par conséquent de l'apport énergétique, avec un risque d'augmenter l'adiposité. Cependant, il a été montré que l'augmentation de l'adiposité pouvait être compensée par une augmentation de la dépense énergétique totale.

Les effets des régimes déficients en protéines semblent être médiés par FGF21. FGF21 est une hormone produite principalement par le foie qui répond à différents signaux nutritionnels tel qu'un régime riche en glucides, un régime cétogène, un jeûne ou une restriction protéique. Il régule divers processus physiologiques comme le métabolisme glucidique et lipidique, le poids et la dépense énergétique.

Afin d'assurer le maintien de la masse des protéines corporelles et de leurs fonctions, deux voies métaboliques interviennent : la synthèse protéique et la protéolyse. La dynamique de ces deux processus est fortement influencée par la disponibilité en AA. Un certain nombre de travaux chez le rat ont montré que les régimes faibles en protéines pouvaient induire une diminution de la synthèse protéique dans le foie, le muscle, l'intestin et la peau. Concernant la protéolyse, la déficience en protéines entraîne une diminution de l'activité de la voie ubiquitine-protéasome, des cathepsines et des caspases, et est associée à une augmentation de l'autophagie. Ainsi, la déficience en protéines induit une diminution du poids corporel dû à une diminution de la masse maigre en raison d'un ralentissement du renouvellement protéique.

Cette étude vise à évaluer l'impact de différents taux de restriction protéique sur l'expression de *Fgf21* hépatique et hypothalamique et son rôle dans les adaptations du métabolisme énergétique en réponse à ces régimes déficients. L'objectif est également d'évaluer l'impact de différents niveaux de restriction protéique sur le métabolisme protéique et la masse maigre et d'identifier les orientations métaboliques au niveau du foie et du muscle.

2.3.2. **Article 1.** La déficience sévère en protéines induit l'expression hépatique et plasmatique de FGF21 mais inhibe son expression hypothalamique chez des rats en croissance

2.3.2.1. Méthodes

36 rats en croissance ont été séparés en 6 groupes (n = 6 / groupe) et nourris durant 3 semaines avec un régime contenant 3% (P3), 5% (P5), 8% (P8), 12% (P12), 15% (P15) ou 20% (P20) de l'énergie sous forme de protéines de lait totales (PLT). Le poids et la prise alimentaire ont été mesurés quotidiennement. Lors de la 3^{ème} semaine d'expérimentation, les rats ont été placés 24h en cage à calorimétrie indirecte afin de mesurer leur dépense énergétique. A la fin de l'expérimentation, des échantillons de sang, de foie, de muscles, de tissus adipeux blanc, de tissus adipeux brun et d'hypothalamus ont été prélevés afin d'effectuer des mesures d'expression géniques, et des dosages de FGF21.

2.3.2.2. Résultats principaux et conclusion

Une déficience sévère en protéines (3% et 5%) entraîne une diminution du gain de poids corporel, dû à une diminution de masse maigre, ainsi qu'une augmentation de l'apport énergétique (**Tableau 1 et 2, p.80-81**). La restriction protéique n'entraîne pas d'augmentation de l'adiposité. Par ailleurs, la dépense énergétique totale est augmentée, médiée par une augmentation du niveau et du coût de l'activité (**Figure 2, p.83**). La restriction protéique sévère (3 à 5%) induit une augmentation de l'expression de *Fgf21* dans le foie et de la concentration de FGF21 dans le plasma, alors que l'expression dans l'hypothalamus diminue (**Figure 3 p.84**). L'augmentation de *Fgf21* n'entraîne pas d'augmentation du brunissement du tissu adipeux blanc évalué par la mesure des ARNm codant UCP1 (**Tableau 3, données supplémentaires p.87**). L'étude des orientations métaboliques a en outre mis en évidence que la déficience sévère en protéines (3% et 5%) entraîne une augmentation de la lipogenèse dans le tissu adipeux blanc, ainsi que dans le foie déterminée par la mesure des ARNm codant ACC et FAS. Cependant, l'apport protéique ne modifie pas l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras (CPT1 et CD36) dans le foie, le muscle (**Tableau 3, données supplémentaires p.87**). Une restriction protéique sévère (3% et 5%) induit une augmentation de *Fgf21* dans le foie qui explique la stimulation la dépense énergétique, et une diminution de *Fgf21* dans l'hypothalamus qui pourrait être responsable de la diminution du signal de satiété induisant ainsi une hyperphagie. Concernant les seuils de détection de la restriction protéique, lorsque l'apport protéique est inférieur à 8%, le foie détecte la déficience en protéines et active la synthèse et la sécrétion de FGF21 qui va permettre d'induire ces adaptations métaboliques. L'hypothalamus est capable de détecter la déficience en protéines lorsque l'apport est inférieur à 5% et induit une diminution de la synthèse de FGF21. Nous sommes les premiers à montrer que le niveau d'expression de *Fgf21* dans l'hypothalamus répond à la restriction protéique.

2.3.2.3. *Manuscrit: « Severe protein deficiency induces hepatic expression and systemic level of FGF21 but inhibits its hypothalamic expression in growing rats »*

Le manuscrit a été soumis le 13/07/2020 dans Scientific reports

Severe protein deficiency induces hepatic expression and systemic level of FGF21 but inhibits its hypothalamic expression in growing rats

Joanna Moro¹, Catherine Chaumontet¹, Patrick C. Even¹, Anne Blais¹, Julien Piedcoq¹, Claire Gaudichon¹, Daniel Tomé¹ and Dalila Azzout-Marniche¹

¹UMR PNCA, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, Paris, 75005, France

Corresponding author:

Dalila Azzout-Marniche,
UMR PNCA, AgroParisTech
16 rue Claude Bernard
F-75005 Paris, France
Telephone 33-1-44087244
Fax: 33-1-44081858
E-mail: dalila.azzout_marniche@agroparistech.fr

Funding:

Supported by the UMR Nutrition Physiology and Ingestive Behavior
AlimH department of Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

Declarations of interest: none

Author disclosures:

JM, CC, PCE, AB, JP, CG, DT and DA-M declare no conflicts of interest.

Author contributions:

The authors responsibilities were as follows: JM, CC, PCE, DA-M, and JP conducted the research; JM, CC, PCE, AB and DA-M interpreted the data; JM and DA-M wrote the manuscript; DA-M, CG and DT designed the study; JM and DA-M had primary responsibility for the final content; and all authors read and approved the final manuscript.

Aims: To study, in young growing rats, the consequences of different levels of dietary protein deficiency on food intake, body weight, body composition, and energy balance and to assess the role of FGF21 in the adaptation to a low protein diet.

Materials and methods: Thirty-six weanling rats were fed diets containing 3%, 5%, 8%, 12%, 15% and 20% protein for three weeks. Body weight, food intake, energy expenditure and metabolic parameters were followed throughout this period.

Results: The very low-protein diets (3% and 5%) induced a large decrease in body weight gain and an increase in energy intake relative to body mass. No gain in fat mass was observed because energy expenditure increased in proportion to energy intake. As expected, *Fgf21* expression in the liver and plasma FGF21 increased with low-protein diets, but *Fgf21* expression in the hypothalamus decreased.

Conclusion: Under low protein diets (3% and 5%), the increase in liver *Fgf21* induced an increase in energy expenditure. The decrease in *Fgf21* in the hypothalamus could be responsible for the decrease in the satiety signal responsible for hyperphagia observed in response to the low protein diets. Our results highlight that when dietary protein decreases below 8%, the liver detects the low protein diet and responds by activating synthesis and secretion of FGF21 in order to activate an endocrine signal that induces metabolic adaptation. The hypothalamus, in comparison, responds to protein deficiency when dietary protein decreases below 5%.

Keywords: protein deficiency, FGF21, energy expenditure, liver, hypothalamus, motor activity

1. Introduction

Protein intake below nutritional needs has adverse effects on the organism (WHO/FAO/UNU, 2007), and protein intake is therefore tightly controlled (Tomé et al., 2020). In rats, the requirement for protein is 15% energy (National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995), while the recommendation is 20% energy (American Institute of Nutrition (AIN)). Different studies have reported that low protein diets (5% and 6% energy) induce an increase in food intake to maintain an adequate level of protein intake (Aparecida de França et al., 2009; Swick and Gribskov, 1983; White et al., 2000). On the one hand, this low protein diet-induced hyperphagia leads to an increase in energy intake with a risk of increased adiposity (Du et al., 2000; Pezeshki et al., 2016; White et al., 2000). On the other, the increase in total energy expenditure could partially prevent a gain in fat mass induced by the increased food intake (Meyer and Hargus, 1959; Rothwell et al., 1982); (Blais et al., 2018; Chaumontet et al., 2019).

The Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21), a liver-derived circulating hormone (hepatokine) belonging to the Fibroblast Growth Factor (FGF) family, was shown to respond to different nutritional signals (Staiger et al., 2017). Glucose and fructose induce liver FGF21 expression and secretion *in vivo* (Ortega-Prieto and Postic, 2019), and in primary rat hepatocyte culture, high glucose concentration induces FGF21 expression (Chalvon-Demersay et al., 2016). In humans, lipid infusion and a ketogenic diet increase blood FGF21 levels (Badman et al., 2007; Mai et al., 2009). Interestingly, FGF21 also responds to different nutritional deficiencies, such as those caused by low protein diets as well as amino acid and choline-deficient diets (De Sousa-Coelho et al., 2012; Lees et al., 2014; Pissios et al., 2013; Shimizu et al., 2015). All of these diets have been observed to increase circulating FGF21 levels and hepatic expression of *Fgf21* in mice and rats (Blais et al., 2018; Chalvon-Demersay et al., 2016; De Sousa-Coelho et al., 2012; Hill et al., 2018, 2019; Solon-Biet et al., 2016). The effects of a low protein diet on food intake, energy expenditure and body weight involve FGF21. This was demonstrated when protein restriction in Wild type mice, but not in FGF21-KO mice, induced an increase in food intake and energy expenditure and a decrease in body weight and adiposity (Laeger et al., 2014).

FGF21 is expressed mainly in the liver (Nishimura et al., 2000; Staiger et al., 2017), but also in the pancreas, skeletal muscle, the gastrointestinal tract, testes, brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue and the hypothalamus (Fon Tacer et al., 2010; Geller et al., 2019; Restelli et al., 2018). It is a member of a subfamily of the FGF family that has an endocrine, autocrine and paracrine signal (Fisher and Maratos-Flier, 2016). When released into circulation, FGF21 regulates various physiological processes, including glucose and lipid metabolism (Kharitonov et al., 2005) and body weight control and energy expenditure (Owen et al., 2014). It is also described as

a satiety signal involved in the preference for sugars (von Holstein-Rathlou et al., 2016) and alcohol (Talukdar et al., 2016). In these different effects, hepatic FGF21 plays a main regulatory role both locally and systemically after its release in the blood. Nonetheless, the autocrine, paracrine or endocrine role of FGF21 expressed and produced in other sites such as the hypothalamus remains unknown. To our knowledge, no study has investigated the impact of different levels of protein deficiency on the relative hepatic and systemic expression and variation of FGF21 and on hypothalamic expression.

The present study aims to assess the dietary regulation of hepatic and hypothalamic FGF21 and their contribution to the metabolic and behavioral adaptations to protein restriction. Young growing rats were fed diets differing in protein percentages: very low (3% and 5%), moderately low (8% and 12%), or adequate (15% and 20%). The impact on body weight, body composition, food intake and energy expenditure was measured.

2. Material and methods

2.1 Ethics approval

The study was approved by the Regional Animal Care and Ethical Committee and the Minister of Research and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals (registration number: APAFIS#13436-2017122616504600).

2.2 Animals

Thirty-six, 3-week-old male Wistar Han rats (HsdHan[®]: WIST, Envigo, France), weighing 50-55 g on arrival, were housed in a light and temperature-controlled animal facility (12-hour light/12-hour dark cycle, lights on from 00:00 to 12:00, 22±1°C). After one week of adaptation, during which they were fed with a standard rat chow diet (Régime croquettes from Safe, 16.10% protein), they were housed in individual cages and switched to their experimental diet for three weeks. All rats had ad libitum access to food and water during the experimental period.

2.3 Pellet preparation

Food pellets were prepared using powder manufactured at the “Atelier de préparation des aliments” (UPAE, INRA, Jouy en Josas, France). Water was added to form a dough in order to avoid scattering of the powder and to measure food intake. This dough was cut into individual portions and left to dry for three days before being given to the rats. Each day, the evaporation rate was calculated to adjust the dry weight ingested by rats.

2.4 Experimental design

After one week of adaptation to laboratory conditions, the 36 rats were divided into six groups (n=6/group). Each group was assigned one of the six isocaloric diets containing 3% (P3), 5% (P5), 8% (P8), 12% (P12), 15% (P15)

or 20% (P20) protein for three weeks (Supplementary Table 1). Throughout the course of the experiment, a calibrated meal of 4 g (58.2 kJ) was given every day at 12:00 (onset of the night period) in order to train the rats to rapidly ingest the meal. Then, ad libitum access to food was given between 12:30 and 9:00 the next day. Food intake and body weight were measured daily throughout the three weeks. During the third week, each rat was placed for 48 h in a cage connected to an indirect calorimeter (24 h of adaptation and 24 h of measurement) to measure energy expenditure and spontaneous motor activity.

At the end of the experimental period, the rats were fed with a calibrated meal (4 g (58.2 kJ) at 11:00) of their test diet and were anesthetized with Isoflurane two hours later. Blood samples were taken from the portal vein, then from the vena cava until death. Glycaemia was immediately measured using a blood glucose meter (Life-Scan, One touch vita). After centrifugation (4°C, 3000 rpm, 10 min), plasma was collected, aliquoted and stored at -80°C until analysis. Body composition was analyzed by dissection and weighing of the main tissues and organs. Pieces of brown and white adipose tissues, muscle, liver and the hypothalamus were frozen in liquid nitrogen (-80°C) for further measurement of mRNA abundance and biochemical analysis.

2.5 Measurement of total energy expenditure, basal metabolism and spontaneous motor activity

Throughout 24 h of measurement, rats were housed individually in ventilated cages placed on an activity platform equipped with force transducers that produced an electric signal proportional to the intensity of work produced by rat activity (Even and Nadkarni, 2012). For gas analysis, four cages at a time were simultaneously ventilated at 500 ml/min and each connected in turn to the gas analyzers. Oxygen (O₂) consumption and carbon dioxide (CO₂) production were measured in each cage for two min every ten min (two min for each cage and two min of room air to correct values for room O₂% and CO₂%). The first day was used as a habituation day and the second day was used for data analysis. Total metabolic rate (TMR) was calculated with the Weir formula (Weir, 1949), modified to obtain data in Joules/seconds (Watts). The activity signal was continuously recorded at 100 Hz, averaged, stored at two sec intervals and post-experimentally synchronized to the VO₂ and VCO₂ signals. Mean daily values for resting metabolic rate (RMR) were calculated as the origin of the correlations between TMR and Activity. 24 h resting (REE) and total (TEE) energy expenditure were computed in kJ by multiplying RMR and TMR by 86.4 (3600 * 24 / 1000). To take into account between-group differences of body weight and body composition, energy intake, TEE and REE were normalized to the metabolically active mass (MAM) (i.e the weight of the lean body mass + 20% of weight of fat mass). This mode of correction calibrated the adjustment to lean body mass by taking into account that the metabolic activity of fat mass is about ~20% of that of lean body mass, rather than null (Arch et al., 2006; Even and Nadkarni, 2012).

2.6 Plasma assays and mRNA measurement

Plasma FGF21 was determined using an enzyme-linked immunoassay (Mouse and Rat FGF-21 ELISA, BioVendor). Plasma insulin was measured with a Luminex assay (RMHMAG-84K, MILLIPLEX Rat Metabolic Magnetic Bead Panel, Merck-Millipore).

Total RNA was extracted from duodenal, liver, muscle, brown adipose tissue, epididymal adipose tissue and the hypothalamus using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA concentration was measured using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm, and RNA integrity was verified by electrophoresis on agarose gel. Retrotranscription was performed on 0.4 µg of RNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). To measure gene expression, real time PCR was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on the Step One (Applied Biosystems) with 5 ng of cDNA. Gene expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{\text{Gene}} - CT_{18S}$. In order to detect potential contamination, negative controls were used (control without RT or RNA). Primer Express was used to design the primer sequences of genes, and the sequences of primers used are described in Supplementary Table 2.

2.7 Statistical analysis

Data are presented as means $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed using R© studio version 1.1.453. One-way ANOVA, two-way ANOVA and Mixed-model ANOVA for repeated measures were used when appropriate. Pairwise comparisons were performed with Post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at *p-values* <0.05. Pearson correlation coefficients were performed using Excel (Microsoft Corporation®) and significance of the correlations determined from the table of critical values.

3. Results

3.1 Energy intake, body weight, body composition and glucose homeostasis

Body weight gain was stopped or was very low when rats were fed the P3, P5 and P8 diets, but progressively recovered in those fed the P8 diet (Figure 1a). Growth was unaffected in rats fed the P15 and P20 diets and slowed only slightly in those fed the P12 diet. At the end of the experimental period, rats fed the P3 and P5 diets had a body weight that was almost half of those fed the P15 and P20 diets (Figure 1b). Mean rat daily energy intake was largest in P15 and P20-fed rats and lowest in those fed P3 and P5 diets (Figure 1c, Table 1). When energy intake was adjusted to 100 g of MAM, energy intake increased quite linearly while dietary protein decreased from 20% to 3% (Figure 1d, Table 1). The analysis of body composition revealed that lean mass content was lower in rats fed the P3, P5 and P8 diets, whereas no differences were observed between P12, P15 and P20-fed groups (Table

2). Fat mass was also low in P3 and P5-fed rats, but when fat mass was expressed relative to body weight, only the P8 group differed significantly from the P3 group.

No major changes were observed for glucose homeostasis. Fast blood glucose did not differ between groups. Plasma insulin levels decreased in P5 rats, which differed from P15 rats, but not from the other groups or from the P20 control group.

3.2 Total energy expenditure and motor activity

Energy expenditure was analyzed to understand why rats under severe protein-deficient diets (3% and 5%) ate more without gaining weight and fat mass (Table 2, Figure 2). There was no significant effect of diet on REE (Figure 2a), but there was a significant increase in EE-Act in rats fed the P3, P5 and P8 diets (Figure 2b). As a result, TEE (REE+EE-Act) was increased from ~120 kJ in P12, P15 and P20-fed rats to 140-160 kJ in P3, P5 and P8-fed rats, the increase being significant only in those fed P5 (Figure 2c). The increase in EE-Act was explained by an increase in activity level (Figure 2d) and a 71% (NS) increase in activity cost in P5 rats. In comparison, P3-fed rats did not show an increased activity level although the cost of activity did increase 120% (Figure 2e).

3.3 Plasma FGF21 and expression of *Fgf21* and other factors in liver, brown adipose tissue, duodenum and hypothalamus

In the liver, *Fgf21* mRNA expression was increased by 20% in P3-fed rats and by 30% in P5-fed rats compared to those fed P20. *Fgf21* mRNA in P8, P12 and P15-fed rats was intermediate (Figure 3a). Liver *Fgf21* mRNA correlated with plasma FGF21 levels was higher in P3, P5, P8 and P12 rats than in P15 and P20 rats (Figure 3c). PGC-1 α mRNA expression, an FGF21 regulator, was increased in P3 rats compared to P15 and P20 rats. The same results were found for KLB mRNA expression, demonstrating a difference between P3 and P12 rats. KLB mRNA encodes beta-Klotho, the co-receptor needed to activate the FGF21 receptor. In brown adipose tissue, *Fgf21* mRNA was unaffected by the level of protein intake (Supplementary Table 3). In the hypothalamus, *Fgf21* mRNA expression decreased progressively from P20 to P3, but the decrease reached significance only when comparing P20-fed and P3-fed rats (Figure 3b). The same result was found for *Fgfr2* mRNA expression, FGF21 receptor, whereas no effect was observed for the other isoforms (*Fgfr1* and *Fgfr3*).

Severe protein deficiency (3%) was associated with a decrease in *Pomc* and *Cartp* mRNA expression. No differences were observed for other neuropeptides involved in the control of food intake (*Npy*, *Mc4r*, *Npy2r*, *Agrp* genes) and in the duodenum, no changes were observed in the expression of cholecystokinin (Supplementary Table 3).

Moreover, liver *Fgf21* mRNA levels correlated strongly and positively with energy intake ($R^2=0.87$, $P<0.001$) and negatively with protein intake ($R^2=0.77$, $P<0.001$) (Figure 3e). In contrast, hypothalamus *Fgf21* mRNA levels correlated negatively with energy intake ($R^2=0.92$, $P<0.05$) and positively with protein intake ($R^2=0.76$, $P<0.05$) (Figure 3d).

3.4 Expression of genes related to energy metabolism in the liver, adipose tissue and muscle

In order to investigate whether the increase of plasma FGF21 was related to energy expenditure markers, the present study also investigated the expression of genes involved in energy oxidation and browning of white adipose tissue, in brown and white adipose tissue. In brown adipose tissue, no effects were observed on gene expression of *Ucp1*, *Ucp2* and *Ucp3* (Supplementary Table 3). In white adipose tissue, no effects were observed on gene expression of *Ucp1* and *Ucp3*, suggesting that the increase of FGF21 did not stimulate the browning of white adipose tissue. There was a lower expression of *Ucp2* mRNA, which is present in most tissues, in P3 compared to P20-fed rats.

We also explored the effect of diet protein level on lipid oxidation markers in the liver and muscle and on lipogenesis in liver and white adipose tissue. In the liver, no changes were observed in mRNA-encoding CPT1, the rate-limiting protein for long-chain fatty acid entry into mitochondria and subsequent oxidation. In both liver and white adipose tissue, the low protein diets induced a stimulation of lipogenesis through the increase of ACC and FAS, which may be the consequence of the higher carbohydrate content of these diets. In muscle, no major changes were observed except a significantly higher ACCb mRNA abundance in P3 vs P20-fed rats without any changes in mRNA-encoding CPT1. This suggests reduced lipid oxidation due to a higher production of malonyl CoA.

4. Discussion

This study aims to better understand the role played by FGF21 in metabolic and behavioral adaptations to protein restriction. To this end, young, growing rats were fed diets differing in their percentage of protein, including very low (3% and 5%), moderately low (8% and 12%), or adequate (15% and 20%) percentages (National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995). A key result was that FGF21 expression inversely responded to protein intake in the liver and the hypothalamus, which explains the subsequent metabolic and behavioral adaptation to the level of protein intake.

Low protein diets have a major impact on the body weight gain of growing rats. The decrease in the diet's protein content induced a decrease in body weight gain, mainly owing to the decrease in the gain of lean mass. In accordance with the literature, severely deficient diets (P3, P5 and P8) induced a large decrease in body weight gain compared to rats fed the P12, P15 and P20 diets (Aparecida de França et al., 2009; Chaumontet et al., 2019; White et al., 2000). Despite this decrease in body weight gain, we observed that rats under low protein diets have a higher

energy intake relative to body size compared to rats fed P20. This is in line with several previous studies reporting that under protein restriction, growing rats increased their food intake or their relative food intake in order to meet protein requirements (Solon-Biet et al., 2016; Swick and Gribbskov, 1983; Webster, 1993; White et al., 2000; Zhao et al., 1996). In comparison, other studies have contrastingly shown that protein restriction (4% and 5% casein) decreased food intake, though this effect could be related to the low palatability of the diet (Beck et al., 1989; Mercer et al., 1994). In our study, the increase in food intake under severely protein deficient diets (P3 and P5) was associated with a decrease in anorexigenic peptides, *Pomc* and *Cartp* mRNA, in the hypothalamus, as previously reported (Hillebrand et al., 2002).

Despite an increase in energy intake under a low protein diet, fat mass did not increase as much as expected. This limitation in fat mass gain was related to the concomitant increase in energy expenditure. It has been observed that a reduction of the dietary protein level is associated with an increase in energy expenditure (Blais et al., 2018; Chaumontet et al., 2019; Pezeshki et al., 2016; Rothwell et al., 1982; Specter et al., 1995). In the present study, TEE was increased in P5-fed rats compared to those fed P12 and P20. In contrast, a very severe deficit in protein, at the level of 3%, seems too large to induce a significant increase in TEE compared to control rats under P20. The increase in TEE in P5 rats was mainly associated with the increase in the activity component of energy expenditure, and not with the REE. However, low protein diets (P3 and P5) did not induce hyperactivity, but did increase the cost of activity, allowing for a partial increase of energy expenditure regarding activity in the TEE. The same effect of an increased metabolic rate of motor activity associated with an increase in the cost of energy – and not with the level of activity – was previously observed in mice under a low protein diet (Blais et al., 2018). This process allows the animals to increase their TEE, and therefore increase their energy intake without gaining fat mass. Metabolic analysis of pathways involved in energy expenditure confirmed that mRNAs encoding genes related to REE, such as fatty acid oxidation and thermogenesis (UCP), were not notably affected by low protein intake. In BAT, uncoupling protein (UCP1, UCP2 and UCP3) are regularly cited to play a role in thermogenesis. In addition, low protein diets impact their expression. (de França et al., 2016). In this study, no significant effect of protein intake on UCP expression was observed in BAT, in accordance with different studies (Chaumontet et al., 2019). While other studies have shown that the increase in energy expenditure induced by low protein diets requires both UCP1 and FGF21 (Even et al., 2003; Fisher et al., 2012; Hill et al., 2017; Rothwell et al., 1982; Swick and Gribbskov, 1983; Zhao et al., 1996), results from the present study suggest that FGF21 does not require UCP1 to increase TEE (Maida et al., 2016; Véniant et al., 2015). We cannot exclude the possibility that animals may have

developed FGF21 resistance under our experimental conditions. However, PGC1 alpha and KLB expression suggest that the liver is sensitive to circulating FGF21. These results must be confirmed by FGF21 signaling studies in both the hypothalamus and liver. Moreover, induction of liver-integrated stress response-driven nuclear protein 1 (NUPR1) is involved in FGF21 expression and secretion under low protein diets (Maida et al., 2016). Thus, rather than increase energy expenditure through the activation of browning adipose tissue, FGF21 may more likely activate ketogenesis, as has been previously reported in transgenic mice with liver-specific overexpression of FGF21 (Badman et al., 2007).

In line with previous observations, liver *Fgf21* mRNA and FGF21 plasma concentration were increased in rats fed severely low protein diets (Chalvon-Demersay et al., 2016; Chaumontet et al., 2019; Laeger et al., 2014). In addition, the present results suggest that the threshold under which the liver responds to the low protein diet with an activation of FGF21 synthesis was below to P8 and for FGF21 secretion, was between P3 and P12. In other words, it is a value relatively higher than the threshold observed for liver mRNA expression. When recombinant FGF21 was injected in mice and monkeys, pharmacokinetic results showed that the half-life in plasma is short (0.5 to 2 h) (Kharitononkov et al., 2005) and thus could not explain the difference of the threshold observed between liver mRNA and FGF21 plasma levels. However, the stability of endogenous glycosylated FGF21 is currently unknown, and the physiological half-life in circulation could be longer. In the present study, the decrease in a diet's protein content was made at the expense of carbohydrates. However, it is unclear which of these two macronutrients is responsible for the increase in liver mRNA and plasma level of FGF21, and the consequential increase in energy intake and expenditure. Interestingly, a recent study by Zapata RC et al. (Zapata et al., 2019) using sympathetic system antagonists demonstrated that low protein diets with fixed carbohydrate content increased FGF21, promoted hyperphagia and sympathetically mediated an increase in energy expenditure. Indeed, these data confirmed that the low protein content of the diet, rather than a high carbohydrate content, was responsible for the increase of FGF21. In turn, it induced an increase in energy expenditure and food intake through a mechanism independent of browning adipose tissue, but through an increase of the energy cost of activity. How the sympathetic system is involved in this process remains to be determined, as does the nature of the relationship, if there is one, with FGF21 synthesis and secretion.

In addition, the present results show an inverse response of *Fgf21* expression to diet protein content in the liver and the hypothalamus. It can be hypothesized that in response to a low-protein diet, an increase in liver FGF21 principally controls the peripheral metabolic adaptation, and in particular, the increase in energy expenditure, whereas the decrease in hypothalamic *Fgf21* controls the increase in food intake. In contrast to the liver, *Fgf21*

mRNA in the hypothalamus decreased in proportion to the decrease in protein content in the diet, with a progressive, fairly stable decrease from P20 to P3. The value of *Fgf21* mRNA in the hypothalamus was significantly lower in rats fed P3 vs P20. Of note, and in line with this result, it has been reported that tanycytes, which are located close to FGF21-sensitive neurons, produce and secrete FGF21 (Geller et al., 2019). Moreover, intracerebroventricular (ICV) injection of FGF21 markedly suppressed food intake in mice (Santoso et al., 2017), and ICV injection of FGF21 induced a shift in diet preferences to increase protein intake in mice adapted to a low-protein diet. Central FGF21 signaling was shown to be essential for these responses (Hill et al., 2019). Studies using *Fgf21*-KO mice have shown that the effects of a low protein diet on energy expenditure (Hill et al., 2017; Laeger et al., 2014, 2016) and food intake (Laeger et al., 2016) were reversed compared to Wild-type mice. However, these studies used a total *Fgf21*-KO, which include hypothalamus KO and not a liver-specific KO. Therefore, in contrast to the peripheral response, we hypothesized that the central signaling of protein deficiency is a decrease, rather than an increase, in mRNA hypothalamic expression of *Fgf21*. Furthermore, as there is no effect of low-protein intake on orexigenic hypothalamic peptides AGRP and *NPY*, it can also be hypothesized that the increase in food intake under a low-protein diet is mainly related to the decrease of hypothalamic FGF21. However, to confirm our hypothesis, the responsible and respective effects of liver and hypothalamic FGF21 should be investigated using specific KO mice or FGF21 antagonists.

This study confirms that reducing dietary protein to below the levels required to sustain optimal growth induced a large decrease in the gain of lean body mass and an increase in energy intake. Moreover, the present results show that protein deficiency induced an up-regulation of hepatic expression of FGF21 that increased TEE and induced a down-regulation of hypothalamic expression of FGF21 that could lead to the observed hyperphagia. To our knowledge, our study is the first to describe the effect of protein deficiency on hypothalamic FGF21.

Acknowledgments:

We thank Morgane Dufay, who took care of the animals, and Angelique Foucault-Simonin for technical assistance.

References:

- Adibi, S.A., Modesto, T.A., Morse, E.L., and Amin, P.M. (1973). Amino acid levels in plasma, liver, and skeletal muscle during protein deprivation. *Am. J. Physiol.* 225, 408–414.
- AFSSA (2007). Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Aparecida de França, S., Dos Santos, M.P., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C., Kettelhut, I. do C., Lopes, C.F., and Kawashita, N.H. (2009). Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 25, 1186–1192.
- Arch, J.R.S., Hislop, D., Wang, S.J.Y., and Speakman, J.R. (2006). Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)* 30, 1322–1331.

- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437.
- Ballabio, D., and Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* 5, 3790–3798.
- Beck, B., Dollet, J.-M., and Max, J.-P. (1989). Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: Effects on food intake and body weight in rats. *Physiology & Behavior* 45, 761–765.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., and van der Werf, M.J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142.
- Blais, A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Tomé, D., and Even, P.C. (2018). Low-protein diet-induced hyperphagia and adiposity are modulated through interactions involving thermoregulation, motor activity, and protein quality in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314, E139–E151.
- Bollard, M.E., Stanley, E.G., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2005). NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed* 18, 143–162.
- Bortolotti, M., Kreis, R., Debar, C., Cariou, B., Faeh, D., Chetiveaux, M., Ith, M., Vermathen, P., Stefanoni, N., Lê, K.-A., et al. (2009). High protein intake reduces intrahepatocellular lipid deposition in humans. *Am J Clin Nutr* 90, 1002–1010.
- Boutry, C., Bos, C., and Tomé, D. (2008). Les besoins en acides aminés. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 22, 151–160.
- Carbone, J.W., McClung, J.P., and Pasiakos, S.M. (2019). Recent Advances in the Characterization of Skeletal Muscle and Whole-Body Protein Responses to Dietary Protein and Exercise during Negative Energy Balance. *Adv Nutr* 10, 70–79.
- Chalvon-Demersay, T., Even, P.C., Tomé, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., and Azzout-Marniche, D. (2016). Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 36, 60–67.
- Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Blais, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Gaudichon, C., and Even, P.C. (2019). Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 316, R486–R501.
- Davis, A.T., Kruggel, E.M., and Randall, S. (1993). Excess Dietary Lysine Increases Skeletal Muscle and Plasma Trimethyllysine in Rats. *J Nutr* 123, 1109–1116.
- De Sousa-Coelho, A.L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* 443, 165–171.
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., and Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal. Chem.* 78, 4281–4290.
- Du, F., Higginbotham, D.A., and White, B.D. (2000). Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* 130, 514–521.
- Dunstan, R.H., Sparkes, D.L., Macdonald, M.M., De Jonge, X.J., Dascombe, B.J., Gottfries, J., Gottfries, C.-G., and Roberts, T.K. (2017). Diverse characteristics of the urinary excretion of amino acids in humans and the use of amino acid supplementation to reduce fatigue and sub-health in adults. *Nutr J* 16.
- Even, P.C., and Nadkarni, N.A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303, R459–R476.
- Even, P.C., Bertin, E., Gangnerau, M.-N., Roseau, S., Tome, D., and Portha, B. (2003). Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R751–R759.
- FAO/WHO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (World Health Organization).

- FAO/WHO/UNU (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand.
- Fedry, J., Blais, A., Even, P.C., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Azzout-Marniche, D., and Tomé, D. (2016). Urinary metabolic profile predicts high-fat diet sensitivity in the C57Bl6/J mouse. *J. Nutr. Biochem.* *31*, 88–97.
- Fischer, L.M., daCosta, K.A., Kwock, L., Stewart, P.W., Lu, T.-S., Stabler, S.P., Allen, R.H., and Zeisel, S.H. (2007). Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am. J. Clin. Nutr.* *85*, 1275–1285.
- Fischer, L.M., da Costa, K.-A., Kwock, L., Galanko, J., and Zeisel, S.H. (2010). Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *Am J Clin Nutr* *92*, 1113–1119.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 223–241.
- Fisher, F., Ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* *26*, 271–281.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol Endocrinol* *24*, 2050–2064.
- de França, S.A., dos Santos, M.P., Przygodda, F., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Magalhães, D.A., Bezerra, K.S., Colodel, E.M., Flouris, A.D., Andrade, C.M.B., et al. (2016). A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. *Lipids* *51*, 303–310.
- Geladi, P., and Kowalski, B.R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* *185*, 1–17.
- Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Amati, F., Lopez-Mejia, I.C., and Pellerin, L. (2019). Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism* *30*, 833–844.e7.
- Green, C.L., Soltow, Q.A., Mitchell, S.E., Derous, D., Wang, Y., Chen, L., Han, J.-D.J., Promislow, D.E.L., Lusseau, D., Douglas, A., et al. (2019). The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction: XIII. Global Metabolomics Screen Reveals Graded Changes in Circulating Amino Acids, Vitamins, and Bile Acids in the Plasma of C57BL/6 Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* *74*, 16–26.
- Habchi, B., Alves, S., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Moslah, B., Paris, A., Lécluse, Y., Gauduchon, P., Lebailly, P., Rutledge, D.N., and Rathahao-Paris, E. (2017). An innovative chemometric method for processing direct introduction high resolution mass spectrometry metabolomic data: independent component–discriminant analysis (IC–DA). *Metabolomics* *13*, 45.
- Hawkins, W.B., Hanson, P.C., Coon, R.W., and Terry, R. (1949). BILE SALT METABOLISM AS INFLUENCED BY PURE AMINO ACIDS AND CASEIN DIGESTS. *J Exp Med* *90*, 461–473.
- Hill, C.M., Laeger, T., Albarado, D.C., McDougal, D.H., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2017). Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. *Sci Rep* *7*.
- Hill, C.M., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2018). Homeostatic sensing of dietary protein restriction: A case for FGF21. *Frontiers in Neuroendocrinology* *51*, 125–131.
- Hill, C.M., Laeger, T., Dehner, M., Albarado, D.C., Clarke, B., Wanders, D., Burke, S.J., Collier, J.J., Qualls-Creekmore, E., Solon-Biet, S.M., et al. (2019). FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism. *Cell Rep* *27*, 2934–2947.e3.
- Hillebrand, J.J.G., de Wied, D., and Adan, R.A.H. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* *23*, 2283–2306.
- von Holstein-Rathlou, S., BonDurant, L., Peltekian, L., Naber, M.C., Yin, T.C., Claffin, K.E., Urizar, A.I., Madsen, A.N., Ratner, C., Holst, B., et al. (2016). FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab* *23*, 335–343.

- Horiuchi, M., Takeda, T., Takanashi, H., Ozaki-Masuzawa, Y., Taguchi, Y., Toyoshima, Y., Otani, L., Kato, H., Sone-Yonezawa, M., Hakuno, F., et al. (2017). Branched-chain amino acid supplementation restores reduced insulinotropic activity of a low-protein diet through the vagus nerve in rats. *Nutr Metab (Lond)* 14.
- Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., and Rutledge, D.N. (2016). Chapter 7 - Independent Components Analysis: Theory and Applications. In *Data Handling in Science and Technology*, C. Ruckebusch, ed. (Elsevier), pp. 225–277.
- Kalhan, S.C., Uppal, S.O., Moorman, J.L., Bennett, C., Gruca, L.L., Parimi, P.S., Dasarathy, S., Serre, D., and Hanson, R.W. (2011). Metabolic and Genomic Response to Dietary Isocaloric Protein Restriction in the Rat. *J Biol Chem* 286, 5266–5277.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115, 1627–1635.
- Khodorova, N.V., Rutledge, D.N., Oberli, M., Mathiron, D., Marcelo, P., Benamouzig, R., Tomé, D., Gaudichon, C., and Pilard, S. (2019). Urinary Metabolomics Profiles Associated to Bovine Meat Ingestion in Humans. *Mol Nutr Food Res* 63, e1700834.
- Kim, K.M., Henderson, G.N., Frye, R.F., Galloway, C.D., Brown, N.J., Segal, M.S., Imaram, W., Angerhofer, A., and Johnson, R.J. (2009). Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 65–70.
- Kimura, N., Fukuwatari, T., Sasaki, R., and Shibata, K. (2006). Comparison of Metabolic Fates of Nicotinamide, NAD⁺ and NADH Administered Orally and Intraperitoneally; Characterization of Oral NADH. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52, 142–148.
- Kurpad, A.V., and Thomas, T. (2011). Methods to assess amino acid requirements in humans. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14, 434–439.
- Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922.
- Laeger, T., Albarado, D.C., Burke, S.J., Trosclair, L., Hedgepeth, J.W., Berthoud, H.-R., Gettys, T.W., Collier, J.J., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2016). Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell Reports* 16, 707–716.
- Lakshmanan, F.L., Perera, W.D., Scrimshaw, N.S., and Young, V.R. (1976). Plasma and urinary amino acids and selected sulfur metabolites in young men fed a diet devoid of methionine and cystine. *Am J Clin Nutr* 29, 1367–
- Lees, E.K., Król, E., Grant, L., Shearer, K., Wyse, C., Moncur, E., Bykowska, A.S., Mody, N., Gettys, T.W., and Delibegovic, M. (2014). Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell* 13, 817–827.
- Lehman, L.J., Olson, A.L., and Rebouche, C.J. (1987). Measurement of ϵ -N-trimethyllysine in human blood plasma and urine. *Analytical Biochemistry* 162, 137–142.
- Mai, K., Andres, J., Biedasek, K., Weicht, J., Bobbert, T., Sabath, M., Meinus, S., Reinecke, F., Möhlig, M., Weickert, M.O., et al. (2009). Free Fatty Acids Link Metabolism and Regulation of the Insulin-Sensitizing Fibroblast Growth Factor-21. *Diabetes* 58, 1532–1538.
- Maida, A., Zota, A., Sjöberg, K.A., Schumacher, J., Sijmonsma, T.P., Pfenninger, A., Christensen, M.M., Gantert, T., Fuhrmeister, J., Rothermel, U., et al. (2016). A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *J Clin Invest* 126, 3263–3278.
- Mercer, L.P., Dodds, S.J., Schweisthal, M.R., and Dunn, J.D. (1989). Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids. *J. Nutr.* 119, 66–74.
- Mercer, L.P., Kelley, D.S., Humphries, L.L., and Dunn, J.D. (1994). Manipulation of Central Nervous System Histamine or Histaminergic Receptors (H1) Affects Food Intake in Rats. *J Nutr* 124, 1029–1036.
- Meyer, J.H., and Hargus, W.A. (1959). Factors influencing food intake of rats fed low-protein rations. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 197, 1350–1352.
- Morton, G.J., Kaiyala, K.J., Foster-Schubert, K.E., Cummings, D.E., and Schwartz, M.W. (2014). Carbohydrate Feeding Dissociates the Postprandial FGF19 Response From Circulating Bile Acid Levels in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E241–E245.

- Nagao, K., Bannai, M., Seki, S., Mori, M., and Takahashi, M. (2009). Adaptational modification of serine and threonine metabolism in the liver to essential amino acid deficiency in rats. *Amino Acids* 36, 555–562.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995). *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,: Fourth Revised Edition, 1995.
- Ortega-Prieto, P., and Postic, C. (2019). Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet* 10.
- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab.* 20, 670–677.
- Pencharz, P.B., and Ball, R.O. (2003). Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 101–116.
- Pezeshki, A., Zapata, R.C., Singh, A., Yee, N.J., and Chelikani, P.K. (2016). Low protein diets produce divergent effects on energy balance. *Sci Rep* 6, 25145.
- Pissios, P., Hong, S., Kennedy, A.R., Prasad, D., Liu, F.-F., and Maratos-Flier, E. (2013). Methionine and choline regulate the metabolic phenotype of a ketogenic diet. *Mol Metab* 2, 306–313.
- Qiu, K., Qin, C.F., Luo, M., Zhang, X., Sun, W.J., Jiao, N., Li, D.F., and Yin, J.D. (2016). Protein Restriction with Amino Acid-Balanced Diets Shrinks Circulating Pool Size of Amino Acid by Decreasing Expression of Specific Transporters in the Small Intestine. *PLoS One* 11.
- Rana, S.K., and Sanders, T.A. (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *Br J Nutr* 56, 17–27.
- Rand, W.M., and Young, V.R. (1999). Statistical analysis of nitrogen balance data with reference to the lysine requirement in adults. *J. Nutr.* 129, 1920–1926.
- Reeds, P.J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* 130, 1835S–40S.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939–1951.
- Restelli, L.M., Oettinghaus, B., Halliday, M., Agca, C., Licci, M., Sironi, L., Savoia, C., Hench, J., Tolnay, M., Neutzner, A., et al. (2018). Neuronal Mitochondrial Dysfunction Activates the Integrated Stress Response to Induce Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Rep* 24, 1407–1414.
- Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7, 22–39.
- Rose, W. (1957). The amino acid requirement of adult men. *Nutr Abstr Rev* 27, 631–647.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J., and Tyzbit, R.S. (1982). Energy Balance and Mitochondrial Function in Liver and Brown Fat of Rats Fed “Cafeteria” Diets of Varying Protein Content. *J Nutr* 112, 1663–1672.
- Santoso, P., Nakata, M., Shiizaki, K., Boyang, Z., Parmila, K., Otgon-Uul, Z., Hashimoto, K., Satoh, T., Mori, M., Kuro-O, M., et al. (2017). Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep* 7, 45819.
- Schaart, M.W., Schierbeek, H., van der Schoor, S.R.D., Stoll, B., Burrin, D.G., Reeds, P.J., and van Goudoever, J.B. (2005). Threonine Utilization Is High in the Intestine of Piglets. *J Nutr* 135, 765–770.
- Shibata, K., Shiotani, M., Onodera, M., and Suzuki, T. (1991). Effects of Protein-Free Diet Feeding or Starving on the Excretion Ratio of (*N*¹-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide + *N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide)/*N*¹-Methylnicotinamide. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1483–1490.
- Shimizu, N., Maruyama, T., Yoshikawa, N., Matsumiya, R., Ma, Y., Ito, N., Tasaka, Y., Kuribara-Souta, A., Miyata, K., Oike, Y., et al. (2015). A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat Commun* 6, 1–14.
- Solon-Biet, S.M., Cogger, V.C., Pulpitel, T., Heblinski, M., Wahl, D., McMahon, A.C., Warren, A., Durrant-Whyte, J., Walters, K.A., Krycer, J.R., et al. (2016). Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework. *Cell Metabolism* 24, 555–565.

- Specter, S.E., Hamilton, J.S., Stern, J.S., and Horwitz, B.A. (1995). Chronic Protein Restriction Does Not Alter Energetic Efficiency or Brown Adipose Tissue Thermogenic Capacity in Genetically Obese (fa/fa) Zucker Rats. *J Nutr* 125, 2183–2193.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., and Häring, H.-U. (2017). Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* 38, 468–488.
- Swick, R.W., and Gribskov, C.L. (1983). The effect of dietary protein levels on diet-induced thermogenesis in the rat. *J. Nutr.* 113, 2289–2294.
- Talukdar, S., Owen, B.M., Song, P., Hernandez, G., Zhang, Y., Zhou, Y., Scott, W.T., Paratala, B., Turner, T., Smith, A., et al. (2016). FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab.* 23, 344–349.
- Tomé, D., and Bos, C. (2007). Lysine Requirement through the Human Life Cycle. *J Nutr* 137, 1642S-1645S.
- Tomé, D., Chaumontet, C., Even, P.C., Darcel, N., Thornton, S.N., and Azzout-Marniche, D. (2020). Protein Status Modulates an Appetite for Protein To Maintain a Balanced Nutritional State-A Perspective View. *J. Agric. Food Chem.* 68, 1830–1836.
- Torres, N., Martínez, L., Alemán, G., Bourges, H., and Tovar, A.R. (1998). Histidase Expression Is Regulated by Dietary Protein at the Pretranslational Level in Rat Liver. *J Nutr* 128, 818–824.
- Véniant, M.M., Sivits, G., Helmering, J., Komorowski, R., Lee, J., Fan, W., Moyer, C., and Lloyd, D.J. (2015). Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* 21, 731–738.
- Vessey, D.A. (1978). The biochemical basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *Biochem J* 174, 621–626.
- Watanabe, K., Tominari, T., Hirata, M., Matsumoto, C., Hirata, J., Murphy, G., Nagase, H., Miyaura, C., and Inada, M. (2017). Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio* 7, 1178–1185.
- Webster, A.J.F. (1993). Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proceedings of the Nutrition Society* 52, 69–76.
- Weir, J.B.D.B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol. (Lond.)* 109, 1–9.
- White, B.D., Porter, M.H., and Martin, R.J. (2000). Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol. Behav.* 69, 383–389.
- WHO/FAO/UNU (1985). Energy and protein requirements. *World Health Organ Tech Rep Ser* 724, 1–206.
- WHO/FAO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1–265, back cover.
- Wold, S., Esbensen, K., and Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2, 37–52.
- Wu, Z., Li, M., Zhao, C., Zhou, J., Chang, Y., Li, X., Gao, P., Lu, X., Li, Y., and Xu, G. (2010). Urinary metabolomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Biosyst* 6, 2157–2163.
- Young, V.R., and Marchini, J.S. (1990). Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am J Clin Nutr* 51, 270–289.
- Young, V.R., Bier, D.M., and Pellett, P.L. (1989). A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 80–92.
- Zapata, R.C., Singh, A., Pezeshki, A., Avirineni, B.S., Patra, S., and Chelikani, P.K. (2019). Low-Protein Diets with Fixed Carbohydrate Content Promote Hyperphagia and Sympathetically Mediated Increase in Energy Expenditure. *Molecular Nutrition & Food Research* 63, 1900088.
- Zhao, X.-Q., Jørgensen, H., Gabert, V.M., and Eggum, B.O. (1996). Energy Metabolism and Protein Balance in Growing Rats Housed in 18°C or 28°C Environments and Fed Different Levels of Dietary Protein. *J Nutr* 126, 2036–2043.

Figure legends:

Figure 1. Effect of protein deficiency on body weight and energy intake. (a) Evolution of body weight; (b) Final body weight; (c) Daily energy intake; (d) Energy intake adjusted to 100 g MAM. Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d, e} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level.

Figure 2. Component of energy expenditure in ad libitum-fed rats: resting energy expenditure (a: REE), energy expenditure of motor activity (b: EE – Act), total energy expenditure (c: TEE), activity level (d) and cost of activity (e). Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level.

Figure 3. Expression of *Fgf21* mRNA in the liver (a) and the hypothalamus (b), and FGF21 plasma concentrations (c) two hours after ingestion of a 4 g test-meal. Correlations between mean group values of *Fgf21* mRNA hypothalamus values vs energy intake (EI) and protein intake (PI) (d), and correlation between *Fgf21* mRNA liver vs energy intake and protein intake (e). Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level

Table 1. Absolute and relative values of energy intake. Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level.

	P3	P5	P8	P12	P15	P20	ANOVA
Cumulated food intake (g)	220.97 $\pm$ 11.18 ^a	280.39 $\pm$ 2.34 ^b	290.94 $\pm$ 6.76 ^{bd}	340.04 $\pm$ 7.96 ^c	320.94 $\pm$ 3.18 ^{cd}	285.03 $\pm$ 8.62 ^b	<0.001
Daily food intake (g/100 g MAM)	12.52 $\pm$ 0.63 ^a	12.54 $\pm$ 0.51 ^a	9.76 $\pm$ 0.14 ^{bc}	9.14 $\pm$ 0.24 ^{cd}	7.99 $\pm$ 0.25 ^d	6.66 $\pm$ 0.22 ^d	<0.001
Daily energy intake (kJ)	189.00 $\pm$ 9.56 ^a	239.98 $\pm$ 2.01 ^b	249.01 $\pm$ 5.79 ^{bd}	291.23 $\pm$ 6.82 ^{ce}	274.88 $\pm$ 2.72 ^{cde}	244.29 $\pm$ 7.39 ^{be}	<0.001
Daily energy intake (kJ/100 g MAM)	185.06 $\pm$ 6.26 ^a	179.65 $\pm$ 5.32 ^a	133.78 $\pm$ 2.61 ^b	127.42 $\pm$ 1.77 ^b	109.24 $\pm$ 2.90 ^c	89.84 $\pm$ 1.55 ^c	<0.001

Table 2. Absolute and relative values of body composition. Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the p<0.05 level.

Diet	P3	P5	P8	P12	P15	P20	Test diet
Initial body weight (g)	58.61 $\pm$ 1.24	56.30 $\pm$ 0.98	58.90 $\pm$ 0.88	57.10 $\pm$ 1.64	58.26 $\pm$ 0.85	58.53 $\pm$ 0.99	NS
Final body weight (g)	85.98 $\pm$ 1.82 ^a	106.7 $\pm$ 2.11 ^a	141.82 $\pm$ 4.31 ^b	168.8 $\pm$ 6.59 ^c	186.1 $\pm$ 1.70 ^c	189.67 $\pm$ 4.35 ^c	<0.001
MAM (g)	101.87 $\pm$ 1.87 ^a	134.06 $\pm$ 3.41 ^b	186.36 $\pm$ 4.94 ^c	228.81 $\pm$ 6.54 ^d	252.27 $\pm$ 5.20 ^d ^e	272.07 $\pm$ 8.05 ^e	<0.001
Fat mass (g)	6.07 $\pm$ 0.42 ^a	10.57 $\pm$ 0.64 ^{ab}	16.33 $\pm$ 2.15 ^{bc}	17.64 $\pm$ 1.75 ^c	16.08 $\pm$ 0.66 ^{bc}	17.66 $\pm$ 2.28 ^c	<0.001
Adiposity (Fat mass g/100 g body weight)	6.74 $\pm$ 0.46 ^a	8.76 $\pm$ 0.45 ^{ab}	9.54 $\pm$ 1.00 ^b	8.51 $\pm$ 0.57 ^{ab}	7.19 $\pm$ 0.27 ^{ab}	7.20 $\pm$ 0.67 ^{ab}	<0.05
Lean body mass (g)	83.88 $\pm$ 1.55 ^a	109.95 $\pm$ 2.81 ^b	152.58 $\pm$ 3.87 ^c	187.74 $\pm$ 5.21 ^d	207.55 $\pm$ 4.31 ^e	223.78 $\pm$ 6.33 ^e	<0.001
Liver (g)	3.35 $\pm$ 0.42 ^a	3.95 $\pm$ 0.13 ^{ab}	5.21 $\pm$ 0.30 ^b	7.13 $\pm$ 0.29 ^c	8.01 $\pm$ 0.39 ^{cd}	8.48 $\pm$ 0.43 ^d	<0.001
Kidney (g)	0.72 $\pm$ 0.03 ^a	0.88 $\pm$ 0.03 ^a	1.12 $\pm$ 0.04 ^b	1.41 $\pm$ 0.03 ^c	1.68 $\pm$ 0.05 ^d	1.73 $\pm$ 0.04 ^d	<0.001
Gastrocnemius muscle	0.81 $\pm$ 0.01 ^a	1.17 $\pm$ 0.01 ^b	1.51 $\pm$ 0.03 ^c	1.81 $\pm$ 0.04 ^d	2.04 $\pm$ 0.06 ^{de}	2.16 $\pm$ 0.09 ^e	<0.001
Carcass (g)	33.42 $\pm$ 0.77 ^a	44.48 $\pm$ 1.00 ^b	61.82 $\pm$ 0.94 ^c	77.17 $\pm$ 1.70 ^d	85.85 $\pm$ 1.76 ^e	93.95 $\pm$ 2.80 ^f	<0.001
Epididymal fat (g)	0.80 $\pm$ 0.09 ^a	1.29 $\pm$ 0.08 ^a	2.08 $\pm$ 0.15 ^b	2.42 $\pm$ 0.23 ^b	2.55 $\pm$ 0.09 ^b	2.79 $\pm$ 0.29 ^b	<0.001
Mesenteric fat (g)	1.15 $\pm$ 0.12 ^a	1.75 $\pm$ 0.14 ^{ab}	2.45 $\pm$ 0.30 ^{bc}	2.77 $\pm$ 0.32 ^{bc}	2.89 $\pm$ 0.17 ^c	3.15 $\pm$ 0.28 ^c	<0.001
Retroperitoneal fat (g)	0.84 $\pm$ 0.07 ^a	1.51 $\pm$ 0.08 ^{ab}	2.4 $\pm$ 0.31 ^{bc}	2.98 $\pm$ 0.31 ^c	2.95 $\pm$ 0.16 ^c	3.30 $\pm$ 0.47 ^c	<0.001
Subcutaneous fat (g)	3.26 $\pm$ 0.28 ^a	6.00 $\pm$ 0.47 ^{ab}	9.39 $\pm$ 1.52 ^b	9.45 $\pm$ 1.03 ^b	7.68 $\pm$ 0.36 ^b	8.40 $\pm$ 1.33 ^b	<0.01
Brown adipose tissue (g)	0.36 $\pm$ 0.01 ^a	0.56 $\pm$ 0.02 ^b	0.57 $\pm$ 0.03 ^b	0.56 $\pm$ 0.03 ^b	0.52 $\pm$ 0.02 ^b	0.52 $\pm$ 0.04 ^b	<0.001

Figure 1. Effect of protein deficiency on body weight and energy intake. (a) Evolution of body weight; (b) Final body weight; (c) Daily energy intake; (d) Energy intake adjusted to 100 g MAM. Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d, e} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level.

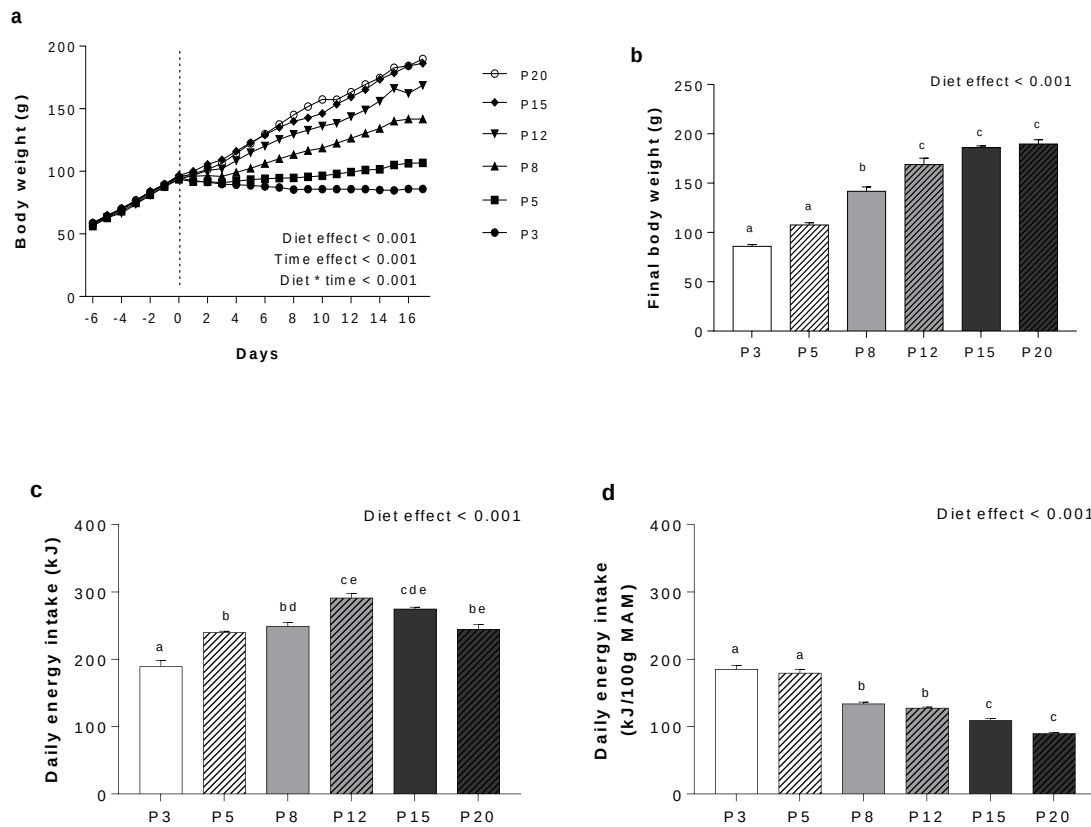


Figure 2. Component of energy expenditure in ad libitum-fed rats: resting energy expenditure (a: REE), energy expenditure of motor activity (b: EE – Act), total energy expenditure (c: TEE), activity level (d) and cost of activity (e). Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level.

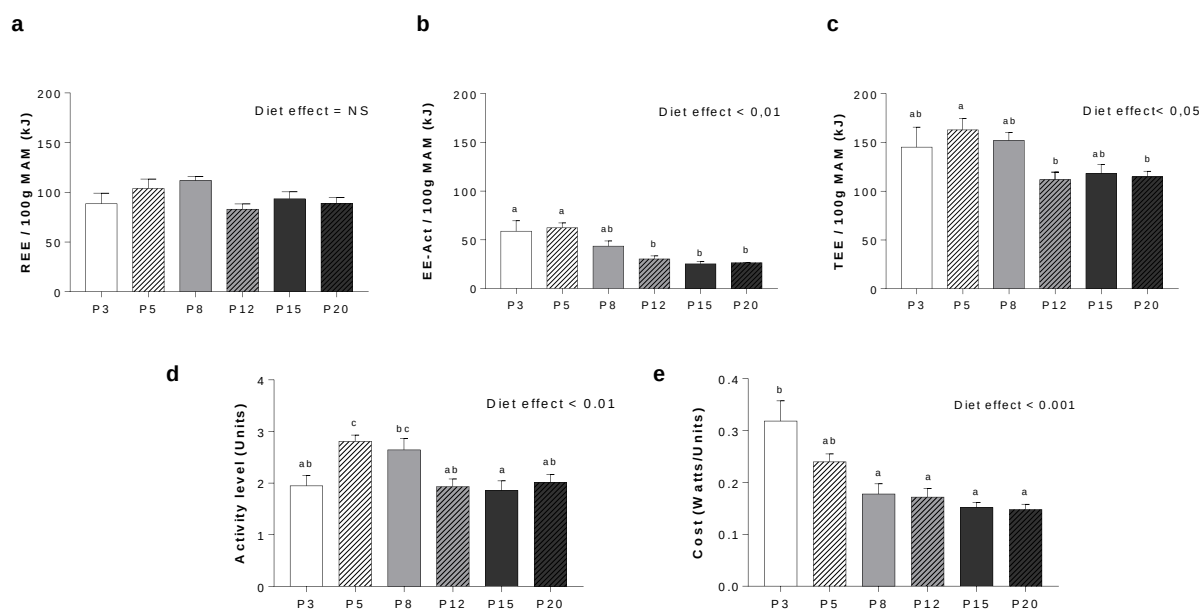
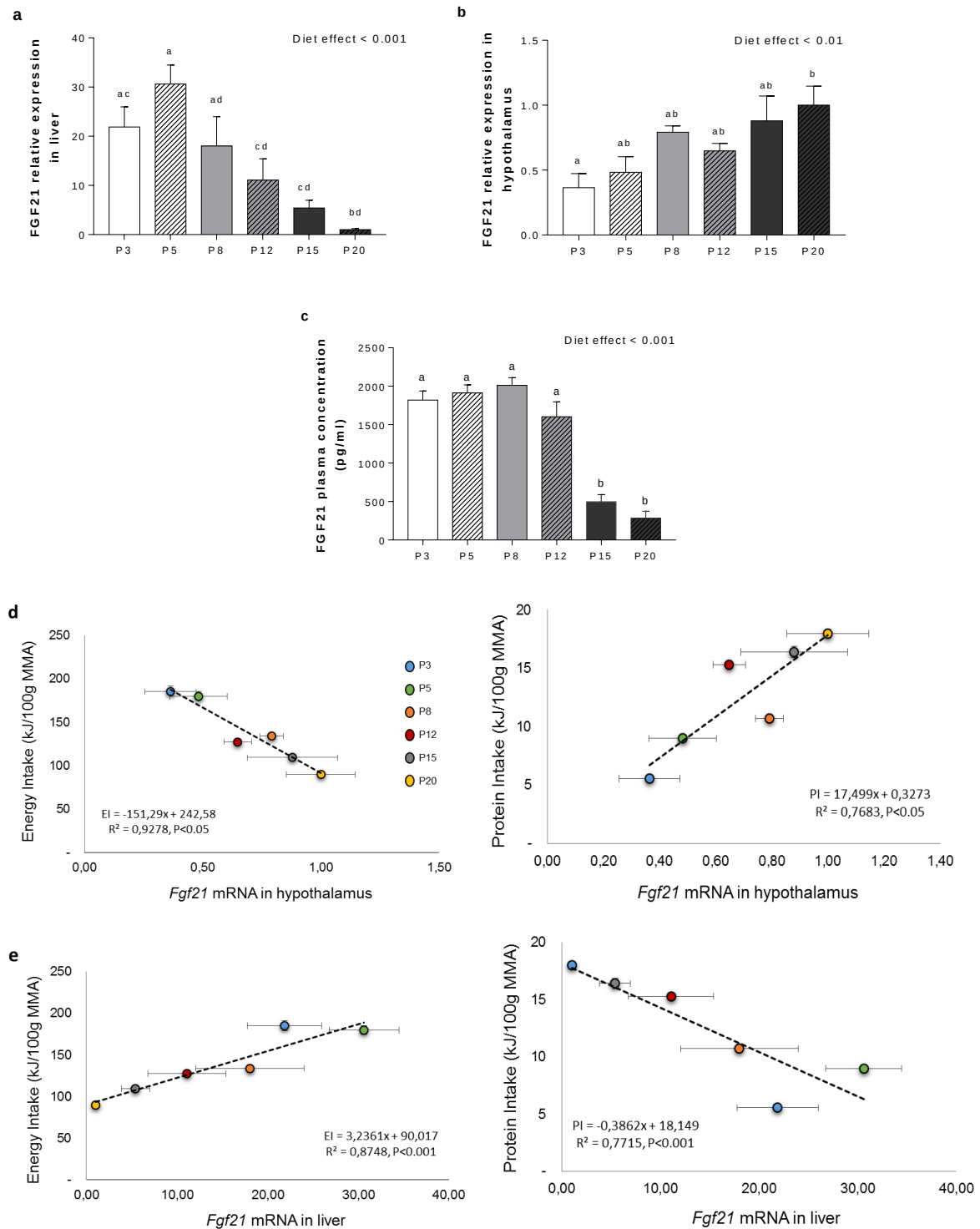


Figure 3. Expression of *Fgf21* mRNA in the liver (a) and the hypothalamus (b), and FGF21 plasma concentrations (c) two hours after ingestion of a 4 g test-meal. Correlations between mean group values of *Fgf21* mRNA hypothalamus values vs energy intake (EI) and protein intake (PI) (d) and correlation between *Fgf21* mRNA liver vs energy intake and protein intake (e). Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$ level.



Severe protein deficiency induces hepatic expression and systemic level of FGF21 but inhibits its hypothalamic expression in growing rats

Joanna Moro¹, Catherine Chaumontet¹, Patrick C. Even¹, Anne Blais¹, Julien Piedcoq¹, Claire Gaudichon¹, Daniel Tomé¹ and Dalila Azzout-Marniche¹

¹UMR PNCA, AgroParisTech, INRAe, Université Paris-Saclay, Paris, 75005, France

Supplementary appendix:

Supplementary Table 1. Macronutrient composition of diets. Diets were produced by the “Atelier de préparation des aliments”, UPAE, INRA, Jouy en Josas, France

	P3	P5	P8	P12	P15	P20
Weight content (g/kg)						
Milk proteins	29	48	77	116	145	193.5
Corn Starch	717.9	701.5	676.6	643.1	618.1	576.4
Sucrose	115.8	113.2	109.1	103.6	99.6	92.8
Soy Oil	40	40	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50	50	50
Choline	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Energy content (%)						
Protein	3	5	8	12	15	20
Carbohydrate	86.6	84.6	81.6	77.6	74.6	69.5
Fat	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
Energy density (kJ/g)	14.54	14.55	14.55	14.56	14.56	14.57

Supplementary Table 2. Primer sequences used for liver, brown adipose tissue, epididymal adipose tissue, muscle and hypothalamus mRNA analysis

Protein	GENES	Full-length name	Forward primer (5' to 3')	Reverse Primer (3' to 5')
-	<i>18S</i>	ribosomal RNA	ACGGAAGGGCACCACCAGGAG	GCACCAC-
ACCa	<i>Acaca</i>	acetyl-CoA carboxylase a	TGGTGCAGAGGTACCGAAGTG	CGTAGTGGCCGTTCTGAAACT
ACCb	<i>Acacb</i>	acetyl-CoA carboxylase b	GGGCTCCCTGGATGACAAC	GCTCTTCCGGGAGGAGTTCT
AGRP	<i>Agrp</i>	agouti related neuropeptide	GTTCCCAGAGTTCCCAGGTCTAA	GTGTCTCAGGTCTGCAGTTA
CART	<i>Cartp</i>	cocaine- and amphetamine-regulated tran-	CCGAGCCCCTGGACATCTACTC	AAA-
CCK	<i>Cck</i>	cholecystokinin	CAGGTCCGCAAAGCTCCTT	TCCAGGCTCTGCAGGTTCT
CD36	<i>Cd36</i>	cluster of differentiation 36	CATGATTAATGGCACAGATGCA	GCAAATGTCAGAG-
CPT1a	<i>Cpt1a</i>	carnitine palmitoyl transferase 1a	TCTCTGGATGCGGTAGAAAAGG	CTCTA-
CPT1b	<i>Cpt1b</i>	carnitine palmitoyl transferase 1b	CAGCCATGCCACCAAGATC	CTTGGGCAGTGATGTTTGGGA
FAS	<i>Fasn</i>	fatty acid synthase	TGCTCCCAGCTGCAGGC	GCCCGGTAGCTCTGGGTGTA
FGF21	<i>Fgf21</i>	fibroblast growth factor 21	CCTGGAGCTCAAAGCCTTGA	AAACTGCAGGCCTCAGGATC
FGF R1	<i>Fgfr1</i>	fibroblast growth factor receptor 1	TGGCACCTGAGGCATTGTT	CCCCAAAAGACCACACATCAC
FGF R2	<i>Fgfr2</i>	fibroblast growth factor receptor 2	CCCAAAAATGTATCCATCGAGACT	TCATCACGTTGTTTTCTGT-
FGF R3	<i>Fgfr3</i>	fibroblast growth factor receptor 3	GCCTGCTGACCCCAAGTG	CCTGTCCAAAGCAGCCTTCT
KLB	<i>KLB</i>	beta-Klotho	CCAGGAGAGAAGGGAAAT-	TCGAATGCGCCTTGATCA
MC4R	<i>Mc4r</i>	melanocortin 4 receptor	CCGAACCCAGAAGAGACCAA	CTAGGAGCAGGGTCA-
NPY	<i>Npy</i>	neuropeptide Y	GGGAGCCTGAGAAACGGC	CCTGGTGGTGGCATGCAT
Y2R	<i>Npy2r</i>	neuropeptide Y receptor Y2	CCGCTCCTGCTTCTGACTC	ACCCAAAGCAGGTCCGATT
PGC-1α	<i>Ppargc1a</i>	PPARG coactivator 1 alpha	CAAGGTCCCCAGGCAGTAGA	GGTGTCTGTAGTGGCTT-
POMC	<i>Pomc</i>	proopiomelanocortin	AGGCCTTTCCCCTAGAGTTCAA	GTCGGCCTTCTCGGTATCC
UCP1	<i>Ucp1</i>	mitochondrial uncoupling protein 1	CGTACCAAGCTGTGCGATGT	GACCCGAGTCGCAGAAAAGA
UCP2	<i>Ucp2</i>	mitochondrial uncoupling protein 2	TGAAAGCCAACCTCATGACAGA	CAATGACGGTGGTGCAGAAG
UCP3	<i>Ucp3</i>	mitochondrial uncoupling protein 3	GGGATCCTGGAACGTGATGA	TGGAGATTCCCGCAGTACCT

Supplementary Table 3. mRNA abundance in liver, brown adipose tissue, epididymal adipose tissue, muscle and hypothalamus of growing rats fed with 3, 5, 8, 12, 15 or 20% protein in diet two hours after meal onset. Values are means $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the p<0.05 level

Diet		P3	P5	P8	P12	P15	P20	Test diet
Liver	FGF21	21.89 $\pm$ 4.10 ^{ac}	30.63 $\pm$ 3.86 ^a	18.02 $\pm$ 5.97 ^{ad}	11.09 $\pm$ 4.33 ^{cd}	5.41 $\pm$ 1.56 ^{cd}	1.00 $\pm$ 0.22 ^{bd}	<0.001
	FGF R1	0.50 $\pm$ 0.17	0.97 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.17	NS
	ACCa	2.69 $\pm$ 0.19 ^a	1.82 $\pm$ 0.11 ^{bc}	2.35 $\pm$ 0.25 ^{ac}	1.17 $\pm$ 0.20 ^b	1.14 $\pm$ 0.21 ^b	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	<0.001
	FAS	3.06 $\pm$ 0.28 ^a	2.08 $\pm$ 0.30 ^{ab}	2.71 $\pm$ 0.38 ^a	1.05 $\pm$ 0.24 ^b	1.26 $\pm$ 0.20 ^b	1.00 $\pm$ 0.26 ^b	<0.001
	CPT1a	2.41 $\pm$ 0.37	2.56 $\pm$ 0.32	1.73 $\pm$ 0.31	1.32 $\pm$ 0.15	1.13 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.17	NS
	MTTP	1.75 $\pm$ 0.17	1.52 $\pm$ 0.23	1.56 $\pm$ 0.17	1.09 $\pm$ 0.18	1.12 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.15	<0.05
	PGC1 α	3.32 $\pm$ 0.68 ^a	1.58 $\pm$ 0.41 ^{ab}	2.65 $\pm$ 0.32 ^{ab}	1.67 $\pm$ 0.31 ^{ab}	0.96 $\pm$ 0.31 ^b	1.00 $\pm$ 0.14 ^b	<0.01
	KLB	2.52 $\pm$ 0.41 ^a	1.49 $\pm$ 0.20 ^{ab}	1.63 $\pm$ 0.26 ^{ab}	1.05 $\pm$ 0.17 ^b	0.92 $\pm$ 0.19 ^b	1.00 $\pm$ 0.15 ^b	<0.001
Brown adipose tissue	FGF21	1.27 $\pm$ 0.33	1.71 $\pm$ 0.22	1.56 $\pm$ 0.31	1 $\pm$ 0.10	1.07 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.17	NS
	UCP1	1.18 $\pm$ 0.35	1.71 $\pm$ 0.16	1.22 $\pm$ 0.14	1.28 $\pm$ 0.35	0.92 $\pm$ 0.16	1.00 $\pm$ 0.20	NS
	UCP2	0.84 $\pm$ 0.14	1.33 $\pm$ 0.21	1.48 $\pm$ 0.29	1.66 $\pm$ 0.30	1.24 $\pm$ 0.26	1.00 $\pm$ 0.21	NS
	UCP3	0.83 $\pm$ 0.10	1.24 $\pm$ 0.16	1.11 $\pm$ 0.14	0.83 $\pm$ 0.12	0.95 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.14	NS
Epididymal adipose tissue	ACCb	1.50 $\pm$ 0.06 ^a	1.46 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.24 $\pm$ 0.13 ^{ac}	1.20 $\pm$ 0.09 ^{ac}	1.02 $\pm$ 0.11 ^{bc}	1.00 $\pm$ 0.14 ^c	<0.01
	FAS	1.68 $\pm$ 0.07 ^a	1.71 $\pm$ 0.08 ^a	1.48 $\pm$ 0.14 ^{ab}	1.35 $\pm$ 0.20 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.20 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.13 ^b	<0.05
	CPT1b	0.76 $\pm$ 0.09	0.84 $\pm$ 0.10	1.08 $\pm$ 0.29	0.75 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.16	NS
	CD36	1.40 $\pm$ 0.14	1.37 $\pm$ 0.12	1.25 $\pm$ 0.10	1.19 $\pm$ 0.17	1.03 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.15	NS
	UCP1	58.90 $\pm$ 40.41	13.88 $\pm$ 6.56	6.79 $\pm$ 1.14	5.45 $\pm$ 1.65	2.18 $\pm$ 0.63	1.00 $\pm$ 0.21	NS
	UCP2	0.59 $\pm$ 0.06 ^a	0.77 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.80 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.83 $\pm$ 0.09 ^{ab}	0.97 $\pm$ 0.02 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.15 ^b	<0.05
	UCP3	1.07 $\pm$ 0.13	0.89 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.17	0.96 $\pm$ 0.14	0.74 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.14	NS
	ACCb	2.49 $\pm$ 0.34 ^a	2.00 $\pm$ 0.53 ^{ab}	1.28 $\pm$ 0.22 ^{ab}	1.23 $\pm$ 0.21 ^{ab}	1.26 $\pm$ 0.11 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.07 ^b	<0.01
Muscle	FAS	9.55 $\pm$ 4.13	10.35 $\pm$ 6.07	3.49 $\pm$ 1.44	7.12 $\pm$ 1.57	2.06 $\pm$ 0.47	1.00 $\pm$ 0.15	NS
	CPT1b	1.34 $\pm$ 0.14	1.12 $\pm$ 0.10	0.96 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.08	1.23 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.06	NS
	CD36	1.06 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.15	0.92 $\pm$ 0.07	1.14 $\pm$ 0.24	1 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.07	NS
	FGF21	0.36 $\pm$ 0.11 ^a	0.48 $\pm$ 0.12 ^{ab}	0.79 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.65 $\pm$ 0.06 ^{ab}	0.88 $\pm$ 0.19 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.15 ^b	<0.01
Hypothalamus	FGF R1	0.48 $\pm$ 0.08	0.63 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.13	0.78 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.22	1.00 $\pm$ 0.16	NS
	FGF R2c	0.51 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.08	0.87 $\pm$ 0.12	0.84 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.11	<0.05
	FGF R3	0.63 $\pm$ 0.09	0.73 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.13	1 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.15	NS

	AGRP	0.41 ± 0.08	0.63 ± 0.14	0.77 ± 0.11	0.59 ± 0.08	0.83 ± 0.14	1.00 ± 0.11	<0.05
	MC4R	0.67 ± 0.06	0.89 ± 0.08	0.87 ± 0.10	0.79 ± 0.07	0.89 ± 0.14	1.00 ± 0.10	NS
	NPY	1.34 ± 0.12	1.30 ± 0.16	1.10 ± 0.23	0.97 ± 0.13	1.11 ± 0.31	1.00 ± 0.13	NS
	NPY2r	0.54 ± 0.09	0.63 ± 0.13	0.85 ± 0.09	0.73 ± 0.06	0.82 ± 0.11	1.00 ± 0.14	NS
	CART	0.33 ± 0.12 ^a	0.60 ± 0.18 ^{ab}	0.91 ± 0.11 ^{ab}	0.80 ± 0.12 ^{ab}	0.82 ± 0.05 ^{ab}	1.00 ± 0.15 ^b	<0.05
	POMC	0.19 ± 0.07 ^a	0.65 ± 0.24 ^{ab}	0.98 ± 0.22 ^b	0.80 ± 0.08 ^{ab}	0.95 ± 0.14 ^{ab}	1.00 ± 0.21 ^b	<0.05
	PGC-1 α	0.85 ± 0.13 ^a	0.88 ± 0.11 ^{ab}	0.93 ± 0.14 ^{ab}	0.54 ± 0.07 ^{ab}	0.88 ± 0.12 ^b	1.00 ± 0.21 ^b	<0.01
Duodenum	CCK	0.98 ± 0.06	0.89 ± 0.10	1.05 ± 0.10	0.83 ± 0.09	0.94 ± 0.13	1.00 ± 0.07	NS

Supplementary Table 4. Glycaemia and insulin levels in growing rats fed with 3, 5, 8, 12, 15 or 20% protein in diet two hours after meal onset. Values are means ± SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Data that do not share the same letter are different at the p<0.05 level

	P3	P5	P8	P12	P15	P20	Test diet
Glycaemia	252 ± 17.83	253 ± 26.97	272 ± 25.42	252 ± 18.93	228 ± 10.64	232.67 ± 9.08	NS
Insulin	803.02 ± 197.17 ^{ab}	639.51 ± 69.77 ^a	790.77 ± 104.02 ^{ab}	1047.40 ± 173.72 ^{ab}	1291.99 ± 157.92 ^b	1087.66 ± 123.11 ^{ab}	<0.01

2.3.3. Résultats complémentaire: effet de la déficience en protéines sur le métabolisme protéique chez le rat en croissance

2.3.3.1. Méthodes

Les rats sont issus du protocole expérimental décrit précédemment (*Article 1*). Afin de mesurer la synthèse protéique, les 36 rats de l'étude ont été nourris avec un repas calibré de leur propre régime test (58.2 kJ) : P3, P5, P8, P12, P15 et P20. 1h30 après la distribution du repas, une injection de valine-¹³C a été réalisée au niveau de la queue. Trente minutes plus tard, les rats ont été euthanasiés, le foie et le muscle gastrocnémien ont été prélevés. Des analyses de spectrométrie de masse ont permis d'étudier les vitesses de synthèse protéique, FSR et ASR. De plus, des analyses d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme protéique ont été réalisées par qPCR, ainsi que des dosages d'AA dans la veine porte et la veine cave réalisés par UPLC.

2.3.3.2. Résultats

Tout d'abord, les résultats de *l'Article 1 p.63* montrent qu'une déficience sévère (3% et 5%) et modérée (8%) en protéines entraîne une diminution du gain de poids corporel dû à une diminution de la masse maigre (**Tableau 2, p.81**). Le poids du foie, des reins, du muscle et de la carcasse sont fortement diminués. De plus, la déficience sévère en protéines (3%) diminue le FSR par rapport au contrôle (20%) dans le muscle, mais aucun impact n'a été observé au niveau du foie (**Figure 1, p.90**). Cependant, lorsque le taux de synthèse protéique est exprimé par organe, on observe que l'ASR est diminué dans le foie et dans le muscle dans le cas d'une déficience sévère de 3% et 5% en protéines.

Nous avons évalué les effets de l'apport protéique sur des marqueurs des différentes voies de la protéolyse, cathepsine D et ULK1, marqueurs de l'autophagie ; l'ubiquitine, marqueur de la voie ubiquitine-protéasome ; calpaïne 2, marqueur de la voie des calpaïnes ; et caspase 3, marqueur de la voie des caspases (**Tableau 1, p.91**). Dans le foie, l'expression des ARNm d'ULK1, de l'ubiquitine et de caspase 3 sont augmentés en cas de restriction sévère en protéine (3% et 5%), alors que l'expression des ARNm de la cathepsine D et de la calpaïne 2 n'est pas modifiée par l'apport protéique. Dans le muscle, la déficience sévère en protéines augmente l'expression des ARNm d'ULK1, de l'ubiquitine et de la calpaïne 2, mais n'a pas d'effet sur la cathepsine D, et la caspase 3.

Puis, nous avons évalués l'effet de la déficience en protéines sur l'état d'activation des voies GCN2 et mTOR, impliquées dans la signalisation des AA, et dans la régulation du métabolisme protéique (**Tableau 1, p.91**). Dans le foie, l'expression des ARNm d'eIF2 α n'est pas modifiée par l'apport en protéines, contrairement à l'expression d'ATF4 et CHOP qui est fortement augmentée en cas de déficience sévère en protéines (3% et 5%). L'expression des ARNm de 4EB-P1 est augmentée chez les rats P3. Dans le muscle, l'expression des ARNm d'eIF2 α , ATF4, CHOP et 4EB-P1 est augmentée chez les rats soumis à un régime à 3% de protéines.

Les analyses de la concentration des AA ont mis en évidence que, les régimes à 3%, 5% et 8% induisent une diminution de la concentration en AAI dans la veine porte, alors qu'aucune différence entre les groupes n'est observée dans la veine cave (**Figure 2, p.90**). En outre, nous observons une diminution des AA non indispensables dans la veine cave lorsque l'apport protéique augmente dans le régime.

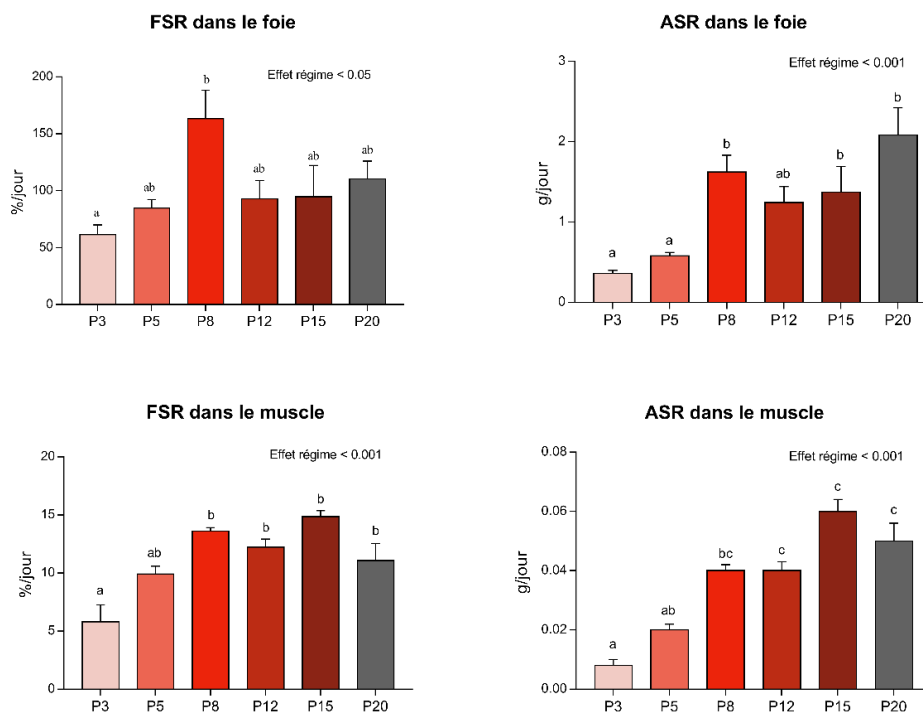


Figure 1. Taux fractionnaire de synthèse protéique (FSR) et taux de synthèse absolue (ASR) dans le foie et le muscle gastrocnémien en réponse à différents niveaux de protéines dans le régime.

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=6 per group). a, b, c, d Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

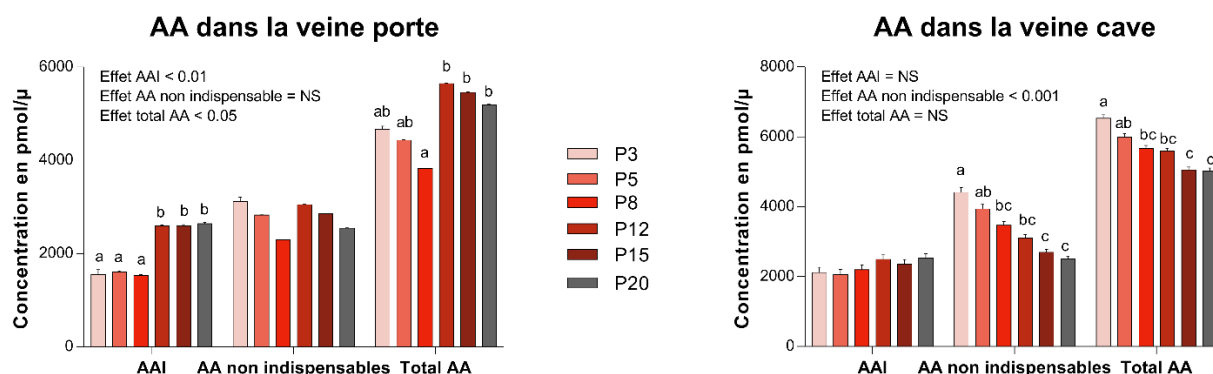


Figure 2. Concentration des acides aminés indispensables et non indispensable dans la veine porte et la veine cave.

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=6 per group). a, b, c, d Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

Tableau 1. Expression relative des ARNm de gènes impliqués dans la protéosynthèse et la protéolyse dans le foie et le muscle gastrocnémien.

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n=6 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

Régime		P3	P5	P8	P12	P15	P20	Effet régime
Foie	eIF2 α	1.56 $\pm$ 0.12	1.54 $\pm$ 0.13	2.30 $\pm$ 0.94	3.57 $\pm$ 2.25	1.42 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.09	NS
	ATF4	3.86 $\pm$ 1.09 ^a	2.48 $\pm$ 0.21 ^{ab}	2.9 $\pm$ 0.85 ^{ab}	1.54 $\pm$ 0.17 ^{ab}	1.48 $\pm$ 0.16 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.06 ^b	<0.05
	CHOP	4.67 $\pm$ 0.35 ^a	3.66 $\pm$ 0.55 ^a	1.90 $\pm$ 0.25 ^b	1.16 $\pm$ 0.14 ^b	1.42 $\pm$ 0.32 ^b	1.00 $\pm$ 0.09 ^b	< 0.001
	TRB3	44.24 $\pm$ 8.36 ^a	26.87 $\pm$ 3.45 ^{ac}	13.53 $\pm$ 3.29 ^{bc}	6.90 $\pm$ 1.68 ^b	2.87 $\pm$ 0.51 ^b	1.00 $\pm$ 0.28 ^b	<0.001
	4E-BP1	2.82 $\pm$ 0.23 ^a	2.54 $\pm$ 0.33 ^{ab}	3.14 $\pm$ 0.14 ^a	2.44 $\pm$ 0.19 ^{ab}	1.69 $\pm$ 0.24 ^{bc}	1.00 $\pm$ 0.19 ^c	<0.001
	Caspase 3	0.32 $\pm$ 0.05 ^a	0.51 $\pm$ 0.08 ^{ac}	0.72 $\pm$ 0.06 ^{bc}	0.85 $\pm$ 0.07 ^{bc}	0.95 $\pm$ 0.08 ^b	1.00 $\pm$ 0.14 ^b	<0.001
	Calpaïne 2	1.44 $\pm$ 0.11	1.41 $\pm$ 0.15	1.21 $\pm$ 0.16	1.01 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.08	<0.05
	Cathespine D	1.63 $\pm$ 0.16	1.63 $\pm$ 0.41	1.40 $\pm$ 0.48	0.55 $\pm$ 0.24	0.89 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.22	NS
	Ubiquitine	1.99 $\pm$ 0.16 ^a	1.97 $\pm$ 0.15 ^a	1.65 $\pm$ 0.06 ^{ac}	1.31 $\pm$ 0.11 ^{bc}	1.31 $\pm$ 0.09 ^{bc}	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	<0.001
	ULK1	1.66 $\pm$ 0.24 ^{ab}	1.92 $\pm$ 0.27 ^a	1.54 $\pm$ 0.19 ^{ab}	0.92 $\pm$ 0.10 ^b	1.16 $\pm$ 0.18 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	<0.01
Muscle	eIF2 α	1.71 $\pm$ 0.13 ^a	1.32 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.05 $\pm$ 0.08 ^b	1.12 $\pm$ 0.08 ^b	1.17 $\pm$ 0.05 ^b	1.00 $\pm$ 0.14 ^b	<0.001
	ATF4	1.68 $\pm$ 0.15 ^a	1.30 $\pm$ 0.14 ^{ab}	1.02 $\pm$ 0.08 ^b	1.10 $\pm$ 0.12 ^b	1.26 $\pm$ 0.12 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	<0.01
	CHOP	2.11 $\pm$ 0.13 ^a	1.57 $\pm$ 0.24 ^{ab}	1.03 $\pm$ 0.08 ^b	1.13 $\pm$ 0.05 ^b	1.39 $\pm$ 0.15 ^b	1.00 $\pm$ 0.12 ^b	<0.001
	TRB3	6.04 $\pm$ 0.81 ^a	2.82 $\pm$ 0.48 ^b	1.76 $\pm$ 0.24 ^{bc}	1.55 $\pm$ 0.24 ^c	1.75 $\pm$ 0.47 ^{bc}	1.00 $\pm$ 0.15 ^c	<0.001
	4E-BP1	2.11 $\pm$ 0.21 ^a	1.43 $\pm$ 0.10 ^b	1.07 $\pm$ 0.08 ^b	1.46 $\pm$ 0.08 ^b	1.19 $\pm$ 0.10 ^b	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	<0.001
	Caspase 3	0.92 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 0.15	1.13 $\pm$ 0.04	1.19 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.04	NS
	Calpaïne 2	1.88 $\pm$ 0.39 ^a	1.18 $\pm$ 0.19 ^{ab}	0.86 $\pm$ 0.05 ^b	1.16 $\pm$ 0.06 ^{ab}	1.43 $\pm$ 0.11 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.06 ^b	<0.05
	Cathespine D	1.46 $\pm$ 0.16	1.09 $\pm$ 0.16	0.96 $\pm$ 0.09	1.13 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.11	NS
	Ubiquitine	1.66 $\pm$ 0.13 ^a	1.29 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.01 $\pm$ 0.08 ^b	1.17 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.25 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.12 ^b	<0.01
	ULK1	2.26 $\pm$ 0.29 ^a	1.53 $\pm$ 0.15 ^b	1.15 $\pm$ 0.08 ^b	1.25 $\pm$ 0.09 ^b	1.44 $\pm$ 0.13 ^b	1.00 $\pm$ 0.06 ^b	<0.001

2.3.3.3. Discussion

La déficience sévère en protéines induit une diminution du taux de synthèse protéique dans le foie et dans le muscle. De façon contradictoire, la voie mTOR, via 4EBP-1, est activée pour 3% d'apport protéique, ce qui semble indiquer une activation de l'étape d'initiation de la traduction. Cependant, l'activation des voies de signalisation étant régulée principalement par des mécanismes de phosphorylation, ces résultats sont en attente de confirmation par les analyses d'état de phosphorylation des protéines mesurées par western blot. En outre, nos résultats mettent en évidence une activation de la voie GCN2, via ATF4-CHOP-TRB3 aussi bien dans le foie que dans le muscle ce qui suggère que l'initiation de la traduction au niveau de la fixation de l'ARN de transfert portant la méthionine est inhibée. Les conséquences sur le taux de synthèse protéique de l'équilibre de l'état d'activation des voies de signalisation mTOR et GCN2 restent méconnues.

Concernant la protéolyse, une augmentation de la voie ubiquitine-protéasome, du système caspase et de l'autophagie est observée dans le foie. Les dosages plasmatiques des AA suggèrent qu'en réponse à une déficience en protéines (3%, 5% et 8%), le catabolisme des protéines hépatique permet d'augmenter les AA plasmatiques afin de compenser la déficience de l'apport alimentaire. Dans le muscle, la voie ubiquitine-protéasome, et l'autophagie sont également augmentée ainsi que le système calpaïne. La voie GCN2, via ATF4-CHOP-TRB3 est activée aussi bien dans le foie que dans le muscle, ce qui confirme l'activation de la dégradation des protéines par les voies ubiquitine-protéasome, et l'autophagie.

Ces résultats montrent que la déficience modérée en protéines n'entraîne pas de modifications majeures du métabolisme protéique. En revanche, en cas de déficience sévère en protéines, il y a un catabolisme des protéines hépatiques afin de compenser la déficience en AAI du régime et fournir des AAI aux différents tissus de l'organisme et l'augmentation du catabolisme des protéines hépatiques et musculaires pourrait permettre l'approvisionnement en AA non indispensables. Ces résultats confirment que le foie et le muscle jouent un rôle majeur pour approvisionner l'organisme en AA, dans l'adaptation de l'organisme à une restriction protéique.

2.4. Conséquences d'une déficience en acides aminés indispensables (lysine et thréonine)

2.4.1. Contexte et objectifs

La déficience en protéines ou AAI entraîne une diminution du gain de poids corporel, une augmentation de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique. L'ensemble de ces effets semblent être médiés par FGF21. Cependant, les conséquences de la déficience en un seul AAI n'est pas clair et l'implication de FGF21 dans les effets métaboliques d'une restriction en un AAI a été peu étudiée. Il a été montré qu'une telle déficience diminuait le gain de poids corporel, mais si certains travaux

ont observé qu'elle diminuait la prise alimentaire et la dépense énergétique, d'autres études ont montré l'effet inverse.

Le turnover protéique, protéosynthèse et protéolyse, est influencé par la disponibilité en AA. Notre précédente étude a montré que les régimes faibles en protéines induisaient une diminution de la protéosynthèse et de la protéolyse. Différents travaux, essentiellement chez le porc, ont montré que la déficience en un AAI diminuait la synthèse protéique. Peu d'études ont porté sur les effets d'une restriction en lysine et thréonine à la fois sur la protéosynthèse et la protéolyse.

Cette étude vise à évaluer les effets d'une restriction en un seul AAI, lysine ou thréonine, sur le métabolisme énergétique, et l'implication de FGF21 dans ces effets. L'objectif de ces travaux est aussi d'évaluer l'impact d'une déficience en un AAI, lysine et thréonine, sur le métabolisme protéique.

2.4.2. **Article 2.** La déficience en lysine et en thréonine induit l'expression hépatique de FGF21 mais affecte différemment la composition corporelle et le métabolisme énergétique chez des rats en croissance

2.4.2.1. *Méthodes*

- Etude 1 : 64 rats en croissance ont été séparés en 8 groupes (n = 8 / groupe), et nourris durant 3 semaines avec un régime expérimental contenant différents niveaux de lysine : 15% (L15), 25% (L25), 40% (L40), 60% (L60), 75% (L75), 100% (P20 et L100) ou 170% (L170) du besoin en lysine.

- Etude 2 : 64 rats en croissance ont été séparés en 8 groupes (n = 8 / groupe), et nourris durant 3 semaines avec un régime expérimental contenant différents niveaux de thréonine : 15% (T15), 25% (T25), 40% (T40), 60% (T60), 75% (T75), 100% (P20 et T100) ou 170% (T170) du besoin en thréonine.

Pour l'ensemble de ces deux études, le poids et la prise alimentaire ont été mesurés quotidiennement. Lors de la 3^{ème} semaine d'expérimentation, les rats ont été placés 24h en cage à calorimétrie indirecte afin de mesurer leur dépense énergétique. A la fin de l'expérimentation, des échantillons de sang, de foie, de muscles, de tissus adipeux blanc, de tissus adipeux brun et d'hypothalamus ont été prélevés afin d'effectuer des mesures d'expression géniques, et des dosages de FGF21.

2.4.2.2. *Résultats et conclusion*

Une déficience sévère en lysine (L15 et L25) induit une diminution du gain de poids corporel qui s'explique par une diminution de la masse maigre sans aucun effet sur la masse grasse (**Figure 1 p.107, Tableau 2 p.109**). Cependant, une fois exprimé par rapport au poids corporel, une augmentation de l'adiposité est observée en cas de déficience sévère et modérée en lysine. De plus, la prise alimentaire et donc l'apport énergétique, est augmentée chez les rats L15 et L25 (**Figure 1 p.107, Tableau 1 p.108**).

Une déficience sévère (T15 et T25) et une déficience modérée (T40) en thréonine induit une forte diminution du gain de poids corporel due à une diminution à la fois de la masse maigre et de la masse grasse, pour les déficiences sévères (**Figure 1 p.107, Tableau 2 p.109**). Malgré une prise alimentaire augmentée en cas de déficience sévère et modérée (T15, T25 et T40), l'adiposité est diminuée chez les rats T15 et T25 (**Tableau 1 p.108, 2 p.109**).

La déficience en lysine n'impacte pas la dépense énergétique totale (DET), alors que la déficience sévère en thréonine (T15) induit une diminution de la DET qui s'explique par une diminution de la dépense énergétique de repos (**Figure 2 p.111**). La déficience sévère en lysine (L15 et L25) et en thréonine (T15 et T25) induit une augmentation de FGF21 hépatique et plasmatique, mais aucune modification de son expression au niveau de l'hypothalamus n'est observée (**Figure 3 p.112, Tableau 3, p.113-114**). Concernant les orientations métaboliques, nous avons observé que la déficience sévère en lysine et thréonine (L15 et T15) entraîne une augmentation de l'expression des ARNm de la FAS mais aucun autre gène impliqué dans la lipogenèse, la lipolyse, la glycogénogenèse ou la glycolyse ne sont modifiés par une déficience en lysine ou thréonine. Les régimes L170 et T170 ne diffèrent pas du groupe contrôle P20 pour l'ensemble des paramètres mesurés.

La diminution du gain de poids corporel ainsi que l'augmentation de la prise alimentaire induites par les régimes faibles en protéines, sont reproduites par une déficience en un seul AAI, lysine ou thréonine. Cependant, la déficience en lysine ou thréonine, ne modifie pas la dépense énergétique malgré une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de FGF21. La déficience en thréonine a un impact plus important que la déficience en lysine sur l'évolution du gain de poids et la composition corporelle. L'étude des orientations métaboliques et de la dépense énergétique ne nous permettent pas d'expliquer la diminution du poids corporel induite par la déficience en lysine et en thréonine malgré l'augmentation de la prise alimentaire.

2.4.2.3. Manuscrit : « Lysine or threonine deficiency induce liver FGF-21 but differently affect body composition and energy metabolism in growing rats

Lysine or threonine deficiency induce liver FGF-21 but differently affect body composition and energy metabolism in growing rats

Gaëtan Roisné-Hamelin¹, Joanna Moro¹, Catherine Chaumontet¹, Patrick C. Even¹, Anne Blais¹, Julien Piedcoq¹, Claire Gaudichon¹, Daniel Tomé¹, Dalila Azzout-Marniche¹

¹UMR PNCA, AgroParisTech, INRAe, Université Paris-Saclay, 16 rue Claude Bernard, 75005 Paris, France.

Corresponding author.

Dalila Azzout-Marniche

UMR PNCA, AgroParisTech,

16 rue Claude Bernard *F-75005 Paris, France*

Telephone 33-1-44087244

Fax: 33-1-44081858

E-mail: dalila.azzout-marniche@agroparistech.fr

Present/permanent address: No changes

Declaration of interest: None

Author disclosures: GRH, JM, CC, PCE, AB, JP, CG, DT, DAM.

Author contributions

JM, DT, DAM: Conceptualization; GRH, JM, PCE, JP: Data curation; GRH, JM: Formal analysis; CG, DT, DAM: Funding acquisition; GRH, JM, DAM: Investigation; CC, PCE, AB, JP, DAM: Methodology; CG, DT, DAM: Project administration; Resources; Software; DAM: Supervision; Validation; Visualization; GRH, JM, DAM - Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing.

Abstract

Objective: The objective of this study is to evaluate the effects of a deficiency in a strictly essential Amino Acid (lysine or threonine; EAA) on food intake, body composition, energy metabolism, and FGF-21 in growing rats.

Methods: Growing rats for three weeks diets with lysine or threonine severely deficient (15% and 25% requirement), moderately deficient (40 and 60% requirement), adequate (75% 100% requirement), and excessive (170% requirement).

Results: Severe lysine and threonine deficient diets, induce a reduction in body weight gain. Moreover, an increase in relative food intake is observed for diets severe deficient diets in EAA. Lysine and threonine deficiencies decrease lean body mass, and only threonine deficiency decreases fat mass. Lysine deficiency did not induce differences in resting metabolic rate (RMR), cost of activity, total energy metabolic rate (TMR) and activity (AMR). Threonine deficiency decreased TMR, supported by a decrease in RMR, without any difference in AMR or cost of activity compared to the control diets. Severe lysine or threonine deficiencies induced an increase in liver mRNA and plasma FGF21 levels.

Conclusions: This study shows that the deficiency in one EAA, lysine or threonine, induce a decrease in body weight gain in growing rats, despite an increased relative food intake, with a more pronounced effect in the case of threonine. Lysine deficiency does not impact energy expenditure, unlike threonine deficiency, which leads to a decrease in TMR and RMR. FGF-21 is involved in the response to EAA, lysine or threonine, deficiency.

Keywords: Lysine, Threonine, Deficiency, Energy intake, Energy expenditure, FGF-21

Abbreviations

AA-Amino Acid; BAT-Brown adipose tissue; BW-Body weight; FA-Fatty acids; EAA-Indispensable amino acid AMR-Activity metabolic rate; AU-Arbitrary unit; EAT-Epididymal adipose tissue; FGF21-Fibroblast growth factor 21; LL-Low lysine; LP- Low protein; LT-Low threonine; MAT-Mesenteric adipose tissue; RMR-Resting metabolic rate; SEM-Standard error of the mean; SCAT-Subcutaneous adipose tissue; TMR-Total metabolic rate; WAT-White adipose tissue

Introduction.

Dietary proteins provide nitrogen and amino acid that support the synthesis of protein and of the various nitrogen and amino acid-related processes in the body. Supplying protein and essential amino acids (EAA) in the diet is mandatory for survival. Maintenance of tissues and of physiological functions required a continuous supply of amino acids and their sufficiency is tightly controlled through sensing and signalling processes that modulate protein and energy metabolism and feeding behavior to maintain a balanced protein status.

A diet deficient in protein does not support protein synthesis and growth in growing rat leading to lower lean mass, but differently affects food and energy intake, body weight, adiposity, and energy expenditure, according to the level of the deficiency. A severe protein deficiency usually induces an aversive response and a decrease in food intake, body weight, adiposity and lean mass, while a moderate protein deficiency can induce an increase in food and energy intake, interpreted as an attempt to increase protein intake but with a risk of energy overfeeding and increased adiposity [1–3]. However, it was observed in some studies that this was also associated to an increased energy expenditure that could be even the signal responsible for the increased energy intake, and could compensate for energy overfeeding and partly preventing the increase in fat mass and adiposity [1–5].

The EAA content of foods and diet is also involved, and animals usually increase their food intake when fed a diet moderately restricted in one or several indispensable amino acids. Low EAA supply and sufficiency is considered as the main signal of deficiency of protein deficient diets, and a diet low in all EAA only was reported to reproduce the effects of a protein deficient diet on body weight, food intake and energy expenditure [6]. Furthermore, a diet deficient in only one EAA, for instance methionine, have been shown to alter growth [7–10], increase or decrease food intake [6–10], modify body composition [7,8,10] and change or not energy expenditure [6]. However, the implication of one or several specific amino acids (AA) on protein deficiency was mainly investigated with a restricted number of EAA and few levels of deficiency.

EAA insufficiency induces the liver expression and release of the fibroblast growth factor 21 (FGF-21) that modulates the metabolic and feeding response to protein and EAA deficiency [1-3,5-10]. FGF21 is under the control of the serine/threonine-protein kinase General control nonderepressible 2 (GCN2) that senses EAA deficiency through the Activating transcription factor 4 (ATF4) pathway. FGF21 is involved in the downstream control of metabolic processes such as lipid oxidation, ketogenesis and glucose uptake, and in the response of energy expenditure to protein or to leucine and methionine restriction. Both energy expenditure and food intake are increased after intracerebroventricular infusion of FGF21, and the increase in food intake induced by low-protein diets is not observed in FGF21-knockout mice. This study aims to assess the effects of different level of deficiency in only one strictly indispensable amino acid (lysine or threonine) on food and energy intake, body weight, body composition, and energy metabolism, and expression of FGF-21 in growing rats.

Material and methods

Animals

Sixty four male *Wistar Han* rats (3 weeks old, weighting 50-55g on their arrival; HsdHan: WIS^t®, Envigo, France), were acclimated to the light and temperature-controlled facility of AgroParisTech (12h/12h reversed light/dark cycle, light on from 00:00 to 12:00, temperature 22±1°C) during one week, before the experiment. During this adaptation period, rats were fed with a standard rat chow diet (“A04” from Safe, 19.30% of protein, composition in Table S.A.). Studies were approved by the Regional Animal Care and Ethical Committee and the Minister of Research and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals (registration number: APAFIS #13436-2017122616504600).

Experimental diets

The food was given to the rats in the form of individual portions pellets to allow measurement of food intake. The pellets were prepared by mixing powder manufactured at the “Atelier de préparation des aliments” (UPAE, INRA, Jouy en Josas, France) and water, three days before been given to the rats. Some pellets were sidelined, to adjust the food intake to the evaporation, and obtain the dry weight ingested by the rats. The composition of the experimental diets is shown in supplemental Table 2. Two groups of diet were formulated at 20% energy equivalent protein (with a mixture of total milk protein and free amino acid) varying either in lysine or in threonine contents only. Diets were designed in reference to lysine or threonine content of 9.2 or 6.2g.kg^{diet}⁻¹, corresponding to the recommended amount of 20% energy as total milk protein diet described in AIN-93G and considered to meet protein and EAA requirement in growing rats, respectively [11]. For each diet, the desired quantity of lysine or of threonine was provided by the corresponding amount of total milk protein, and the diet was completed for all the other amino acid in free crystalline form to the equivalent amount of the 20% energy total milk protein diet. The diets were referenced as Ly or Ty, related the % of the requirement provided by the diet for lysine (Ly) or threonine (Ty). The diets were classified, according to the level of deficiency of lysine and threonine, as severely deficient (15%, 25% of the requirement), moderately deficient (40%, 60% of the requirement), adequate (75%, 100% of the requirement), or excessive (170% of the requirement), and when necessary were corrected by an increase in carbohydrate content to obtain isocaloric diets. Two control diets were a 20% total milk proteins diet (P20) and a control “diet formulation” effect, with 3% total milk proteins, completed to a 20% total milk proteins with free amino acids including lysine and threonine (L/T100).

Experimental design

After the one-week adaptation to the laboratory conditions, the sixty four rats were randomly divided into height groups (n=8/group). These groups were assigned for three weeks to one of the 8 isocaloric diets. At the end of the 3 weeks experimental period, the rats were fed with a calibrated meal (4g, 58.2kJ) of their experimental diet, and they were anesthetized two hours later, with isoflurane. Blood samples

were taken from the portal vein, then from the vena cava. After centrifugation (4°C, 3000rpm, 10min), plasma was collected, aliquoted and stored at -80°C until analysis. Pieces of liver and epididymal adipose tissue (EAT) were frozen in liquid nitrogen (-80°C) for further measurement of mRNA abundance and biochemical analysis.

Food intake, body weight and body composition measurements

On each day, a calibrated meal of 4g (58.2kJ) was given at 12:00 (onset of the night period), to train the rats to quickly ingest this meal. Then, ad libitum access to food was given between 12:30 and 9:00 the next day. Body weight and food intake were measured every morning during the 3 weeks. At the end of the experiment, rats were euthanized, and body composition analyzed by dissection and weighing of tissues and organs.

Energy expenditure measurement by indirect calorimetry

During the third week, each rat was placed 48h in a cage connected to an indirect calorimeter (24h of habituation), to measure energy expenditure and spontaneous motor activity. The rats were housed individually in ventilated cages placed on an activity platform equipped with force transducers producing an electric signal proportional to the intensity of the work produced on the floor by the rat activity (more details in [12]). For gas analysis, the cages (four simultaneously) were ventilated at 1300mL/min (for P3 L/T15 fed rats) or 1000mL/min (for all other groups) and connected each in turn to the gas analyzers. Oxygen consumption and carbon dioxide production were measured in each cage during 2min every 10min (2min by cage and 2min on room air to correct values for room O₂% and CO₂%). Among the 2 days of measurements, the first day was devoted to habituation and the second day to data analysis. From O₂ and CO₂ values, modified Weir formula [13] (to obtain data in Joules.seconds⁻¹, i.e. Watt) was used to estimate the Total Metabolic Rate (TMR), as follow: $TMR(W) = [16.3 \cdot VO_2 \text{ (mL.min}^{-1}) + 4.7 \cdot VCO_2 \text{ (mL.min}^{-1})] / 60$. Spontaneous motor activity was calculated as raw activity data cleared from background noise and multiplied by a diffusion coefficient (to maximize the correlation between spontaneous motor activity and TMR). Cost of activity was determined as the slope of the linear regression between spontaneous motor activity and TMR. Resting Metabolic Rate (RMR) was then obtained as follow: $RMR(W) = TMR(W) - [Activity \text{ (Arbitrary Unit (AU))} \cdot Cost \text{ of activity (AU.W}^{-1})]$. Thus, Activity Metabolic Rate (AMR) was determined as: $AMR(W) = TMR(W) - RMR(W)$. Finally, to compare groups in taking in account differences in body weight and body composition, TMR, RMR and AMR were normalized to the rat Metabolic Active Mass (MAM) (defined as the lean body mass + 20% of fat mass).

Biochemical analysis and mRNA expression measurements

Plasma FGF-21 were determined using an enzyme linked immunoassay (mouse and rat FGF-21 ELISA, BioVendor). For mRNA expression measurements, total RNA were extracted from liver and epididymal

adipose tissue (EAT) using Trizol reagent (Invitrogen). After extraction, RNA concentration was measured using a spectrophotometer at 260nm (Nanodrop). Retro-transcription was performed on 0.4µg of RNA using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Then, to measure gene expression, real time PCR was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on the Step One (Applied Biosystems) on 5ng of cDNA. Finally, gene expression was calculated as $2^{-\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{18s}$. To detect any potential contamination, negative controls, without enzyme or RNA, were performed. Primer Express was used to design the primer sequences of genes. The sequences of the used primers are described in Table S.3.

Statistical Analysis

Data are presented as means + Standard Error of the Mean (SEM). Statistical analysis was performed using R© version 4.0.2 with R© studio version 1.3.959. Repeated measures models were used to analyze the evolution of body weight during the experiment. Final models were retained depending of their Akaike Information Criterion and Bayesian Information Criterion between four variance estimation structure (compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, self-regressive and auto-regressive heterogeneous). Post-hoc analysis were done with bonferonni correction. One way anova were performed to test the diet effect on final body weight, food intake, body composition, energy expenditure, plasma FGF-21 levels and genes expression. Gaussian distribution, homoscedasticity and lack of anormal values were the hypothesis of our statistical model, and were visually checked before analysis. To conclude on the inter-groups differences, post-hoc analysis were done by tukey-HSD method with bonferonni correction. Results of inter-groups are presented by letters. Data that do not share the same letter are statically different at the risk $\alpha=5\%$.

Results

Food intake, body weight, and food efficiency

LL diets increased daily energy intake (kJ) for the L25 and L100 groups, and LT diets for severe deficient groups (figure 1, table 1). When expressed as relative to the metabolic active mass (MAM), for lysine and threonine, severe deficient groups, L/T40 and L/T100 increased relative energy intake. Lysine severe deficient groups (L15 and L25) have a significantly reduced BW gain in 3 and 6d respectively (Figure 1A). Under lysine diets, no difference was significant between moderately deficient (L40 and L60), adequate (L75 and L100) or excessive groups (L170) and the P20 group.

Threonine severe deficient groups (T15 and T25) have a significantly reduced BW gain in 1d, and the lowest moderately deficient group (T40) in 6d (Figure 1B). Threonine excessive group (T170) shown a reduced BW gain from 11d, but remains in the range of control groups. Under threonine diets, no difference was significant between the T60, adequate (T75 and T100) and the P20 group. At the end of the experimental period, lysine severe deficient groups were lighter than the P20 group (Figure 1C). For

threonine, threonine severe deficient groups and the T40 group were lighter than the P20 group (Figure 1D). Under lysine and threonine, no other difference was significant. The L15 group had a reduced food efficiency; and severe threonine deficient groups showed (reduced to negative values).

Body composition

Lysine severe deficient groups have a reduced Lean Body mass (LBM) with a reduced liver, kidney, gastrocnemius muscle and carcass weights (Table 2A). Under lysine diets, there was only an increased absolute fat mass for L60 and L100 groups. When expressed as % of BW (i.e. adiposity), Lysine severe deficient and moderately deficient groups have an increased adiposity. No difference of body composition was found between L75, L170 groups and the P20 group. Under threonine diets, there was a decrease of lean LBM for threonine severe deficient and for the T40 group (Table 2B). Threonine severe deficient groups have a decrease and the T60 group have an increase of absolute fat mass. When expressed as adiposity, only severe deficient diets remain significantly reduced. No difference was found between T75, T170 groups and the P20 group for all organs and tissues.

Energy expenditure

No effects of lysine was found on resting metabolic rate (RMR) or cost of activity, and, despite a significant diet effect, no group was different from the P20 group in term of total metabolic rate (TMR) or activity metabolic rate (AMR) (Figure 2A,C,E,G). For threonine diets, T15 and T75 groups have a reduced TMR and RMR (Figure 2B,D). Despite a significant diet effect, no group was found significantly different from the P20 group for AMR or the cost of activity under threonine diets (Figure 2F,H).

Expression of genes in liver, adipose tissue, and hypothalamus

In the liver, under lysine diets, no diet effect was observed for mRNA expression of glycolysis genes (GK and L-PK), and glycogenesis genes (GS) (Table 4A). For fatty acid (FA) oxidation, a diet effect was observed on ACOX and CPT1a expression ($p=0.032$), however, no group was significantly different from the P20 one. Moreover, no effect was observed on CD36 expression. For lipogenesis, no diet effect was observed for ACC and MTP expression, but the L15 group had a higher expression of FAS ($p=0.025$). Severe deficient lysine groups had a strong higher expression of FGF21 mRNA ($p=5.734 \times 10^{-5}$). No significant difference of mRNA expression was observed between moderately low, adequate, or excessive groups for all genes.

Under threonine diets, no diet effect was observed on the liver relative mRNA expression of glycolysis genes (GK and L-PK) (Table 4B). The T75 group had a higher expression of glycogenesis gene (GS; $p=0.006$). For FA oxidation, no diet effect was found on CD36 and ACOX. However, the T60 group had a higher CPT1a expression ($p=0.001$). For lipogenesis, no diet effect was found on ACC expression, but the T15 had a FAS higher expression ($p=0.005$). Although a diet effect was observed on MTP ($p=0.027$), no group was significantly different from the P20 group. Severe deficient threonine groups

have a strong higher expression of FGF21 mRNA in the liver ($p=0.000$). No other difference was found significant with the P20 group.

In the epididymal adipose tissue (EAT), under lysine diets, no diet effect was observed on the relative mRNA expression of FA oxidation (CD36) (Table 4A). Despite a significant diet effect, no group was found significantly different from the P20 group for lipogenesis genes (ACCa and FAS; $p=0.026$ and $p=0.006$). For the genes involves in the browning of white adipose tissue, a significant diet effect was observed for UCP1, without group different from the P20 one ($p=0.044$). No diet was observed on the expression of UCP3. Moreover, we observed that the L170 had a higher expression of UCP2 in the EAT. For threonine, no diet effect was observed on the relative mRNA expression of FA oxidation (CD36) and lipogenesis (ACCa and FAS) genes (Table 4B). Furthermore, despite a significant diet effect ($p=0.005$), no group was significantly different from the P20 group for UCP1, and no diet effect was found on UCP2 and UCP3.

In the hypothalamus, despite a significant diet effect ($p<0.05$), no group was found significantly different from the P20 group for the FGF21 mRNA relative expression under lysine diets. For threonine diets, no diet effect was observed on FGF21 expression.

Plasma FGF-21

For both lysine and threonine diets, there was a strong increase of the plasma level of FGF-21 only for severe deficient groups (Figure 3A,B). For lysine diets, comparatively to the P20 group, the level is about 41 and 54 times higher for L15 and L25 respectively, and for threonine diets, the level is about 96 and 99 times higher for T15 and T25 respectively. There was no effect of an excess, or a moderately deficient diet on the plasma level of FGF-21, and that there was no difference between all control groups.

Discussion

The present study investigated in growing rats the consequence of lysine or threonine deficiency, the two strictly indispensable amino acids, on food intake, body weight, body composition, energy expenditure and metabolism, and FGF-21 expression and plasma level.

In the present study, a severe EAA (either lysine or threonine) deficiency cause a decrease of body weight gain. However, this reduction of body weight gain is not due to a reduced food intake as, relative to their body weight, deficient rats have an increased food and energy intake. Rats submitted to severe deficiency of either lysine or threonine showed increased relative food and energy intake but lower BW gain, as previously observed for lysine on gilt [7]. In contrast, threonine deficiency induced both lower food intake and lower BW gain in chicks [8,9], and lower BW gain in Pekin Ducks [10]. Moreover, as previously observed for piglets [14], for only marginally lysine or threonine deficiency no modification of either food intake or BW gain was observed in rat in the present study. These results confirm that deficiency in one EAA induces an appetite for protein or for the corresponding EAA through a reward

driven [15], and the specific appetite for the deficient EAA was supported by the observation that an intragastric lysine load during lysine restriction was reported to stimulate dopaminergic system in rats [16].

However, even when the EAA deficiency induces a higher food intake, this does not allow to compensate for the lower BW gain, and this is also associated to a lower food efficiency, as previously observed for lysine deficiency in chick [8], and for threonine deficiency in Pekin ducks [10] and in rats [6]. EAA deficiency induce a decrease of metabolic active mass, due a lower lean body mass. However, lysine and threonine severe deficiency acts differently on fat mass. Indeed, there is a decrease of fat mass and adiposity under very low threonine diets, whereas there is no difference of fat mass, and so an increased adiposity, under very low lysine diets. Interestingly, both lysine and threonine deficiency induced reduced lean body mass, but adiposity that was increased by lysine was decreased by threonine deficiency. It has been reported that lysine deficiency induced a reduced breast muscle growth on chick [8], and did not modify fat to lean ratio on gilt [7], and that threonine deficiency decreased the relative weight of breast muscle and abdominal fat, without changing the relative weight of thigh muscle, and increase liver total lipid, triglycerides and cholesterol, on Pekin Ducks [10].

These changes of body composition did not lead to modifications of energy expenditure. Indeed, lysine deficiency did modify energy expenditure, whereas threonine deficiency induced a decrease of total metabolic rate and resting metabolic rate, without affecting activity metabolic rate and the cost of activity. Lysine and threonine deficiency showed no or minor change of the components of energy expenditure (TMR, RMR, AMR and cost of activity) and this is in line with other results reporting no effect of lysine deficiency on energy expenditure [6]. For threonine deficiency, compared to the control group both AMR and cost of activity were not different, but TMR and RMR were reduced while an increase of TMR was previously observed [6]. However, the latter study was conducted at temperature below the thermoneutrality reported to increase RMR by non-shivering thermogenesis, and to change the activity pattern [18, 19]. In contrast, the present study was conducted near the thermoneutrality of rats and it can be concluded that threonine deficiency reduce TMR and RMR near thermoneutrality but as it lower resistance to cold temperature TMR and RMR when animals are kept at lower temperature.

In accordance with the absence or minor change in energy expenditure, in white adipose tissue (WAT; here EAT), EAA deficiency did not induced difference in the expression of genes involved in different metabolic pathways. The lack of difference of mRNA expression in EAT for UCP1, specific to the BAT [20], UCP3 mainly specific to skeletal muscle [21], and UCP2 with an ubiquitous expression [21], indicate no stimulation of the browning of WAT. In addition, there was also no difference in mRNA expression in the liver of genes involved in glycogenolysis, glycolysis, and glycogenogenesis pathways, indicating that glucose metabolism and liver glucose storage were not altered by EAA deficiency. No

difference was observed in lipid oxidation, but despite no diet effect on ACC and MTTP, EAA deficiency induced a higher expression of FAS in the liver, as previously reported under low protein diets [5]. Thus, the higher energy intake induced by EAA deficiency is not oxidized but lead to a higher liver fatty-acid synthesis, in agreement with the observed higher adiposity induced by lysine deficiency.

A main result is that EAA deficiency alone induces an important increase of liver mRNA expression and plasma levels of FGF-21. This result agrees with the idea that the increased plasma FGF-21 induced by a low protein or amino acid diet [1, 5] can be reproduced by a deficiency in only one EAA, lysine and threonine. It was previously observed that intraperitoneal threonine or tryptophan but not histidine or phenylalanine, were effective to reverse the increase of plasma FGF-21 [6] and the present study showed that lysine and threonine deficiency are involved as signal for the expression and release of FGF21 by the liver. In contrast, in the hypothalamus, lysine and threonine deficiency did not modify FGF21 mRNA expression, as previously observed for a low protein diet [5]. It has been proposed that the impact of protein restriction on feeding behavior could be mediated by the hepatic FGF-21 signal to the brain through FGF21 receptors (FGFR) and β -Klotho (KLB) [2] and this pathway could be also involved in the increase in food intake induced by EAA deficiency.

The present study focused on lysine and threonine deficiency, which are the two limiting EAA in cereal and further studies should investigate other EAA, such as methionine, the main limiting amino acids of legume, or tryptophan, that is limiting in corn. In the present study, threonine deficiency displayed a more pronounced impact that could originate from its implication in intestine morphology. For instance, threonine has an essential role in mucins, the glycoproteins of mucus covering and protecting the gut epithelium, accounting for 29% of mucins amino acid composition [22]. Although the consequence of threonine deficiency on gut morphology remains debated as no change were reported on weight length of the small intestine, and mucosal morphology in the proximal and distal jejunum, while an increase in the paracellular permeability and structural and functional alterations were observed in piglets [14].

Acknowledgements We thank Morgane Dufay for her helps in looking after the animals.

Units All units are in international system of units, except the values of energy expenditure, expressed in Watts (J/s).

References

- [1] Laeger, T., Albarado, D.C., Burke, S.J., Trosclair, L., Hedgepeth, J.W., Berthoud, H.-R., et al., 2016. Metabolic responses to dietary protein restriction require an increase in FGF21 that is delayed by the absence of GCN2. *Cell Reports* 16(3): 707–16, Doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.044.

- [2] Hill, C.M., Laeger, T., Dehner, M., Albarado, D.C., Clarke, B., Wanders, D., et al., 2019. FGF21 signals protein status to the brain and adaptively regulates food choice and metabolism. *Cell Reports* 27(10): 2934-2947.e3, Doi: 10.1016/j.celrep.2019.05.022.
- [3] Chalvon-Demersay, T., Even, P.C., Tomé, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., et al., 2016. Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 36: 60–7, Doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.002.
- [4] Chaumontet, C., Recio, I., Fromentin, G., Benoit, S., Piedcoq, J., Darcel, N., et al., 2018. The protein status of rats affects the rewarding value of meals due to their protein content. *The Journal of Nutrition* 148(6): 989–98, Doi: 10.1093/jn/nxy060.
- [5] Moro, J., Chaumontet, C., Even, P., Blais, A., Piedcoq, J., Gaudichon, C., et al., 2020. The consequences of LP diet on food intake, energy expenditure and hepatic and hypothalamic FGF21 are reproduced by lysine or threonine deficiency in rats. *Current Developments in Nutrition* 4(Supplement_2): 648–648, Doi: 10.1093/cdn/nzaa049_041.
- [6] Yap, Y.W., Rusu, P.M., Chan, A.Y., Fam, B.C., Jungmann, A., Solon-Biet, S.M., et al., 2020. Restriction of essential amino acids dictates the systemic metabolic response to dietary protein dilution. *Nature Communications* 11(1): 2894, Doi: 10.1038/s41467-020-16568-z.
- [7] Díaz, J.A.C., Vallet, J.L., Boyd, R.D., Lents, C.A., Prince, T.J., DeDecker, A.E., et al., 2017. Effect of feeding three lysine to energy diets on growth, body composition and age at puberty in replacement gilts. *Animal Reproduction Science* 184: 1–10, Doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.06.007.
- [8] Bastianelli, D., Quentin, M., Bouvarel, I., Relandeau, C., Lescoat, P., Picard, M., et al., 2007. Early lysine deficiency in young broiler chicks. *Animal* 1(4): 587–94, Doi: 10.1017/S1751731107685073.
- [9] Han, Y., Baker, D.H., 1993. Effects of sex, heat stress, body weight, and genetic strain on the dietary lysine requirement of broiler chicks. *Poultry Science* 72(4): 701–8, Doi: 10.3382/ps.0720701.
- [10] Jiang, Y., Xie, M., Fan, W., Xue, J., Zhou, Z., Tang, J., et al., 2019. Transcriptome analysis reveals differential expression of genes regulating hepatic triglyceride metabolism in pekin ducks during dietary threonine deficiency. *Frontiers in Genetics* 10: 710, Doi: 10.3389/fgene.2019.00710.
- [11] National Research Council (US) Subcommittee on laboratory animal nutrition, 1995. Nutrient requirements of laboratory animals : Fourth revised edition, 1995. Washington (DC): National Academies Press (US).
- [12] Even, P.C., Nadkarni, N.A., 2012. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303(5): R459-476, Doi: 10.1152/ajpregu.00137.2012.
- [13] Weir, J.B. de V., 1949. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *The Journal of Physiology* 109(1–2): 1–9.
- [14] Hamard, A., Mazurais, D., Boudry, G., Le Huërou-Luron, I., Sève, B., Le Floc'h, N., 2010. A moderate threonine deficiency affects gene expression profile, paracellular permeability and glucose absorption capacity in the ileum of piglets. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 21(10): 914–21, Doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.07.004.

- [15] Tomé, D., Chaumontet, C., Even, P.C., Darcel, N., Azzout-Marniche, D., 2019. Protein status modulates the rewarding value of foods and meals to maintain an adequate protein intake. *Physiology & Behavior* 206: 7–12, Doi: 10.1016/j.physbeh.2019.03.012.
- [16] Tsurugizawa, T., Uematsu, A., Uneyama, H., Torii, K., 2013. Reversible brain response to an intragastric load of l-lysine under l-lysine depletion in conscious rats. *British Journal of Nutrition* 109(7): 1323–9, Doi: 10.1017/S0007114512003078.
- [17] National Research Council (US) (Nom), 2011. Terrestrial environment. Guide for the care and use of laboratory animals, National Academies Press (US).
- [18] Le, N.-M.P., Brown, J.W., 2008. Characterization of the thermoneutral zone of the laboratory rat. *The FASEB Journal* 22(S1): 956.19-956.19, Doi: 10.1096/fasebj.22.1_supplement.956.19.
- [19] Even, P.C., Blais, A., 2016. Increased cost of motor activity and heat transfer between non-shivering thermogenesis, motor activity, and thermic effect of feeding in mice housed at room temperature - Implications in pre-clinical studies. *Frontiers in Nutrition* 3: 43, Doi: 10.3389/fnut.2016.00043.
- [20] Ricquier, D., Bouillaud, F., 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal* 345(Pt 2): 161–79.
- [21] Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., et al., 1997. Uncoupling protein-3 : A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Letters* 408(1): 39–42, Doi: 10.1016/S0014-5793(97)00384-0.
- [22] Faure, M., Moënnnoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Breuillé, D., Ballèvre, O., 2005. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *The Journal of Nutrition* 135(3): 486–91, Doi: 10.1093/jn/135.3.486.

Figure 1. Effect of lysine or threonine deficiency on body weight gain, final body weight and energy intake. 1. Evolution of body weight under LL diets. 2. Final body weight for LL diet. 3. Daily energy intake for LL diets. 4. Evolution of body weight under LT diets. 5. Final body weight for the LT diets. 6. Daily energy intake for LT diets. Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$. Values are expressed as means + SEM

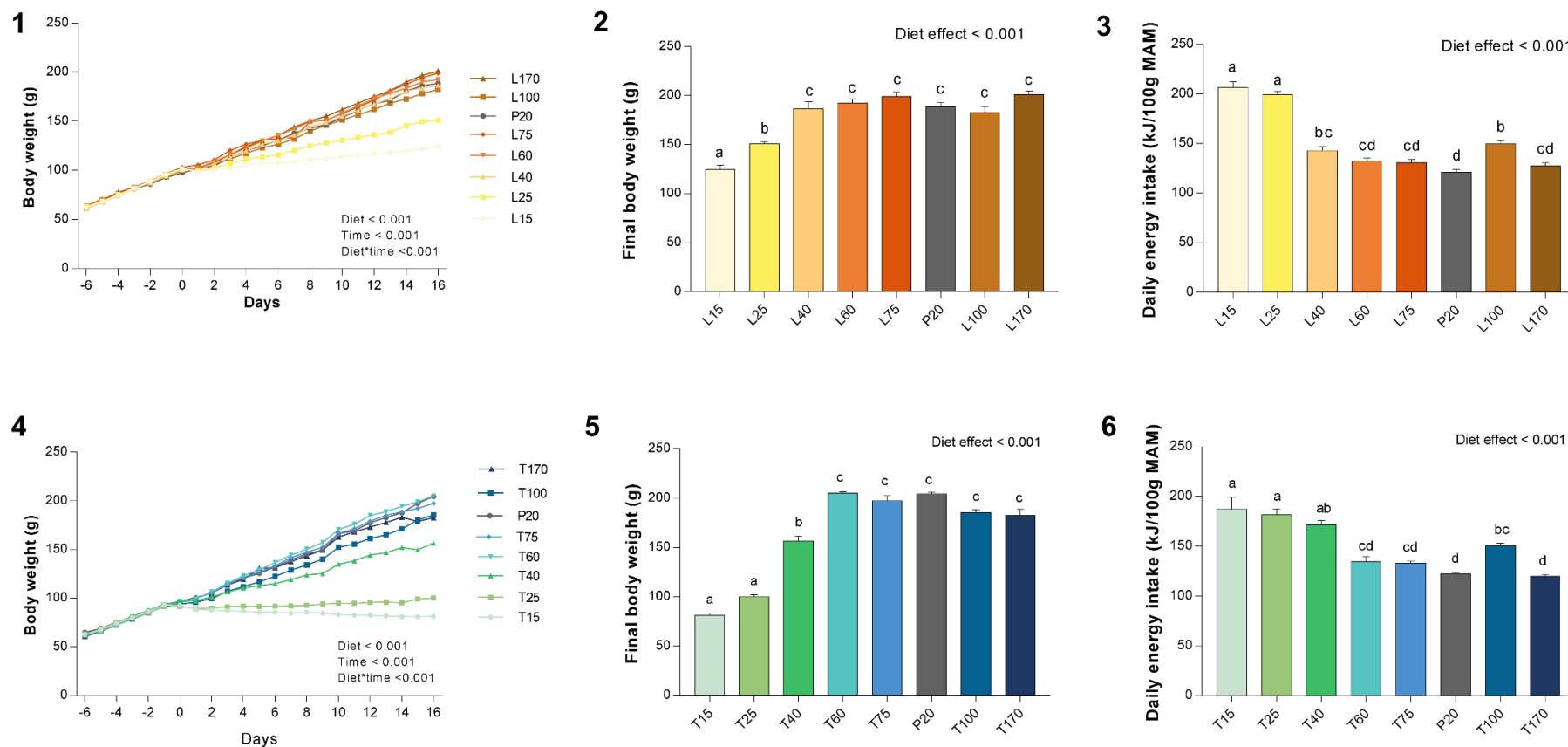


Table 1. Absolute and relative values of energy and food intake. **1.** For LL diets. **2.** For LT diets. Values are expressed as means + SEM. Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$. Bold values are those significantly different from the P20 group.

1

Diet	L15	L 25	L40	L60	L75	P20	L100	L170	Diet Effect
Cumulated food intake (g)	285.38±10.92 ^b	367.40±4.00^a	333.33±5.46 ^{ab}	341.80±6.29 ^{ab}	331.67±11.18 ^{ab}	305.03±5.68 ^b	361.09±11.04^a	332.53±10.03 ^{ab}	<0.001
Daily food intake (g/100g _{MAM})	14.19±0.42^a	13.70±0.22^a	9.82±0.27^{bc}	9.09±0.20 ^{cd}	8.98±0.21 ^{cd}	8.31±0.19 ^d	10.30±0.20^b	8.74±0.23 ^{cd}	<0.001
Daily energy intake (kJ)	244.09±9.34 ^c	314.45±3.43^a	285.29±4.68 ^{ab}	292.74±5.38 ^{ab}	284.06±9.58 ^{ab}	261.42±4.86 ^{bc}	308.84±9.44^a	285.00±8.60 ^{ab}	<0.001
Daily energy intake (kJ/100g _{MAM})	206.39±5.96^a	199.38±3.28^a	142.85±3.96^{bc}	132.37±2.95 ^{cd}	130.72±3.04 ^{cd}	121.12±2.78 ^d	149.83±2.97^b	127.40±3.37 ^{cd}	<0.001
Food efficiency (kJ/kJ)	0.03±0.01^c	0.09±0.01 ^b	0.13±0.01 ^{ab}	0.13±0.01 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}	0.10±0.01 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ab}	0.14±0.01 ^a	<0.001

2

Diet	T15	T 25	T40	T60	T75	P20	T100	T170	Diet Effect
Cumulated food intake (g)	172.92±9.97^d	207.85±9.40^d	335.35±7.59 ^{abc}	346.69±13.24 ^{ab}	333.19±9.26 ^{abc}	306.79±5.84 ^{bc}	349.61±11.26^a	295.37±7.52 ^c	<0.001
Daily food intake (g/100g _{MAM})	12.87±0.82^a	12.47±0.43^a	11.78±0.32^{ab}	9.25±0.35 ^{cd}	9.12±0.15 ^{cd}	8.40±0.10 ^d	10.35±0.17^{bc}	8.22±0.14 ^d	<0.001
Daily energy intake (kJ)	147.89±8.53^c	177.90±8.04^c	289.02±6.50 ^{ab}	296.93±11.34 ^a	285.37±7.93 ^{ab}	262.93±5.00 ^{ab}	299.02±9.63 ^a	253.15±6.45 ^b	<0.001
Daily energy intake (kJ/100g _{MAM})	187.25±12.00^a	181.47±6.19^a	171.36±4.67^{ab}	134.68±5.02 ^{cd}	132.84±2.12 ^{cd}	122.45±1.46 ^d	150.52±2.42^{bc}	119.69±2.03 ^d	<0.001
Food efficiency (kJ/kJ)	-0.10±0.01^c	-0.04±0.01^{bc}	0.08±0.01 ^{ab}	0.13±0.01 ^a	0.16±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a	0.12±0.00 ^a	0.14±0.01 ^a	<0.001

Table 2. Absolute and relative values of body composition. **1.** For the LL diets. **2.** For the LT diets. Values are expressed as means + SEM. Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$. Bold values are those significantly different from the P20 group.

1

Diet	L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	170	Diet Effect
Initial body weight (g)	62.34±0.82	61.73±1.09	61.73±1.09	61.00±0.89	63.61±0.69	63.33±0.94	62.64±1.14	62.51±0.70	0.5888
Final Body weight (g)	128.64±3.36^d	174.24±3.05^c	217.63±6.03 ^b	240.88±6.70 ^a	232.13±3.65 ^{ab}	228.79±5.90 ^{ab}	223.96±7.00 ^{ab}	240.74±3.77 ^a	< 0.001
MAM (g)	70.46±2.03^d	96.34±1.43^c	126.53±3.17 ^b	138.88±3.76 ^{ab}	138.18±1.81 ^{ab}	135.93±4.02 ^{ab}	130.65±3.69 ^{ab}	142.22±2.34 ^a	<0.001
Fat mass (g)	13.02±0.72 ^c	20.40±1.22 ^{ab}	21.39±1.56 ^{ab}	23.73±1.30^a	18.98±1.67 ^{abc}	15.45±1.15 ^{bc}	22.10±2.29^a	21.22±1.40 ^{ab}	<0.001
Adiposity (%)	10.09±0.40^b	11.66±0.55^{bc}	9.78±0.54^{bc}	9.86±0.47^{bc}	8.13±0.64 ^{ab}	6.42±0.42 ^a	9.76±0.80^{bc}	8.83±0.60 ^{ab}	<0.001
Lean body mass (g)	67.86±1.91^d	92.26±1.30^c	122.25±2.96 ^b	134.13±3.66 ^{ab}	134.39±1.65 ^{ab}	132.84±3.90 ^{ab}	126.25±3.33 ^{ab}	137.97±2.44 ^a	<0.001
Liver (g)	3.90±0.15^c	7.11±0.37^c	7.11±0.37 ^b	8.88±0.43 ^{ab}	8.73±0.27 ^a	8.34±0.28 ^{ab}	7.76±0.40 ^{ab}	9.04±0.30 ^a	<0.001
Kidney (g)	1.10±0.04^d	1.38±0.03^{cd}	1.67±0.06 ^{ac}	1.78±0.06 ^a	1.74±0.04 ^{ab}	1.76±0.07 ^{ab}	1.46±0.14 ^{bc}	1.80±0.04 ^a	<0.001
Gastrocnemius muscle (g)	1.18±0.04^c	1.52±0.04^b	2.00±0.04 ^a	2.08±0.09 ^a	2.08±0.05 ^a	2.09±0.07 ^a	2.17±0.14 ^a	2.19±0.06 ^a	<0.001
Carcass (g)	44.8±1.19^d	59.48±0.91^c	77.09±1.64 ^b	83.35±2.40 ^{ab}	84.5±1.18 ^{ab}	84.44±2.84 ^{ab}	78.6±1.62 ^b	86.71±1.79 ^a	<0.001
Epididymal fat (g)	1.76±0.12 ^c	2.67±0.22 ^{bc}	3.36±0.34 ^{ab}	3.90±2.29^a	3.01±2.88 ^{ab}	2.65±0.20 ^{bc}	3.25±0.37 ^{ab}	3.70±0.26 ^{ab}	<0.001
Mesenteric fat (g)	1.97±0.14 ^c	2.94±0.19 ^{ab}	3.21±0.17 ^{ab}	3.84±0.22^a	3.04±0.26 ^{ab}	2.65±0.09 ^{bc}	3.36±0.31 ^{ab}	3.33±0.24 ^{ab}	<0.001
Retroperitoneal fat (g)	1.88±0.16 ^d	3.35±0.20 ^{abc}	3.71±0.30 ^{abc}	4.56±0.38^a	3.10±0.43 ^{bcd}	2.31±0.17 ^{cd}	4.15±0.50^{ab}	3.66±0.28 ^{ac}	<0.001
Subcutaneous fat (g)	7.41±0.41 ^b	11.44±0.77 ^a	11.10±0.85 ^{ab}	11.43±0.78 ^a	9.81±1.07 ^{ab}	7.84±0.90 ^{ab}	11.34±1.24 ^a	10.53±0.72 ^{ab}	<0.001
Brown adipose tissue (g)	0.43±0.03	0.53±0.04	0.52±0.04	0.53±0.03	0.44±0.03	0.44±0.03	0.50±0.06	0.43±0.03	NS

Diet	T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170	Diet Effect
Initial body weight (g)	62.71±1.79	62.44±1.67	62.74±1.68	63.31±1.72	61.21±1.56	64.95±1.23	60.59±1.69	63.77±2.28	NS
Final Body weight (g)	81.63±1.68^d	102.14±2.16^d	180.89±4.12^c	241.79±3.69 ^a	233.59±55.46 ^{ab}	230.96±5.91 ^{ab}	215.61±7.32 ^b	227.25±7.13 ^{ab}	<0.001
MAM (g)	44.29±1.13^d	57.67±1.27^d	106.86±2.08^c	141.28±3.21 ^a	137.71±2.83 ^{ab}	137.87±4.06 ^{ab}	126.01±4.61 ^b	135.19±4.67 ^{ab}	<0.001
Fat mass (g)	2.94±0.26^d	5.16±0.43^d	16.48±0.75 ^c	26.47±1.45^a	23.43±1.76 ^{ab}	19.89±1.82 ^{bc}	21.05±1.60 ^{abc}	19.21±1.92 ^{bc}	<0.001
Adiposity (%)	3.60±0.31^c	5.00±0.35^c	8.94±0.34 ^{ab}	10.94±0.57 ^a	10.0±0.63 ^{ab}	8.58±0.70 ^{ab}	9.69±0.44 ^{ab}	8.29±0.70 ^b	<0.001
Lean body mass (g)	43.70±1.24^d	56.78±1.40^d	103.63±2.62^c	136.01±3.77 ^a	133.07±3.34 ^{ab}	134.11±4.26 ^{ab}	121.96±4.85 ^b	131.35±4.83 ^{ab}	<0.001
Liver (g)	2.77±0.10^d	3.07±0.08^d	6.11±0.31^c	8.47±0.20 ^{ab}	7.91±0.25 ^{ab}	8.75±0.35 ^a	7.33±0.36^{bc}	8.12±0.37 ^{ab}	<0.001
Kidney (g)	0.74±0.01 ^c	0.88±0.02^c	1.41±0.03^b	1.70±0.04 ^a	1.69±0.05 ^a	1.78±0.06 ^a	1.65±0.05 ^a	1.72±0.05 ^a	<0.001
Gastrocnemius muscle (g)	0.84±0.02^c	1.07±0.02^c	1.78±0.05^b	2.23±0.08 ^a	2.19±0.09 ^a	2.28±0.09 ^a	2.13±0.16 ^{ab}	2.23±0.08 ^a	<0.001
Carcass (g)	29.43±0.71^c	38.42±0.86^c	68.31±1.26^b	84.85±2.12 ^a	82.25±1.95 ^a	84.31±2.41 ^a	77.16±2.88 ^a	83.37±2.71 ^a	<0.001
Epididymal fat (g)	0.31±0.19^c	0.54±0.05^c	2.31±0.29 ^b	4.27±0.35 ^a	3.84±0.26 ^a	3.28±0.45 ^{ab}	3.26±0.40 ^{ab}	3.04±0.35 ^{ab}	<0.001
Mesenteric fat (g)	0.44±0.05^d	0.76±0.06^d	2.46±0.14 ^c	4.06±0.34^a	3.80±0.27 ^{ab}	3.31±0.35 ^{bc}	3.25±0.23 ^{bc}	3.41±0.37 ^{bc}	<0.001
Retroperitoneal fat (g)	0.16±0.04^c	0.39±0.07^c	2.06±0.15 ^b	4.62±0.31 ^a	4.08±0.38 ^a	3.44±0.49 ^{ab}	3.61±0.46 ^a	3.17±0.43 ^{ab}	<0.001
Subcutaneous fat (g)	2.03±0.19^c	3.60±0.28^c	9.35±0.59 ^b	12.98±0.68 ^a	11.70±1.11 ^{ab}	9.86±0.70 ^{ab}	10.92±0.66 ^{ab}	9.59±0.94 ^b	<0.001
Brown adipose tissue (g)	0.18±0.02^b	0.27±0.03^b	0.50±0.04 ^a	0.55±0.05 ^a	0.51±0.06 ^a	0.47±0.03 ^a	0.54±0.06 ^a	0.48±0.03 ^a	<0.001

Figure 2. Total metabolic rate (TMR), resting metabolic rate (RMR), activity metabolic rate (AMR) and cost of activity, as obtained by indirect calorimetry. **1.** Under lysine diets. **2.** Under threonine diets Values are expressed as means + SEM. Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$.

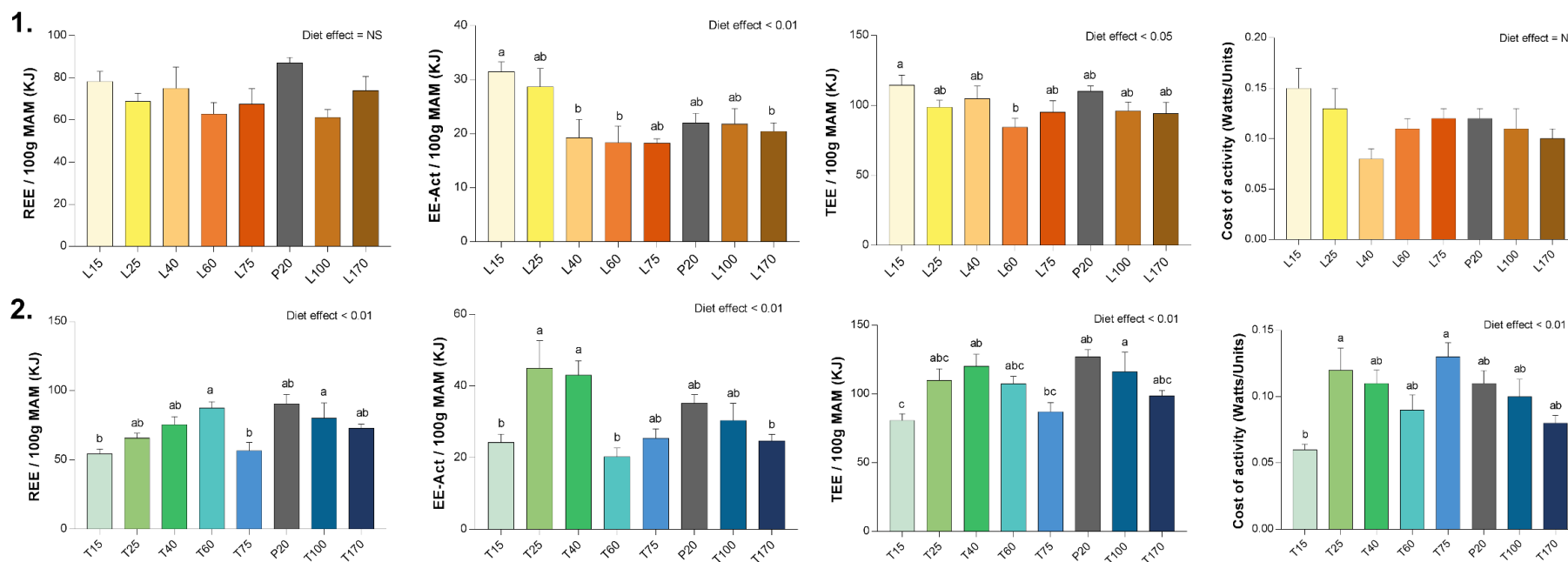


Figure 3. Effect of lysine or threonine deficiency on plasma FGF-21 levels **1.** Plasma FGF-21 levels for the lysine diets. **2.** Plasma FGF-21 levels for the threonine diets. Values are expressed as means + SEM. Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$.

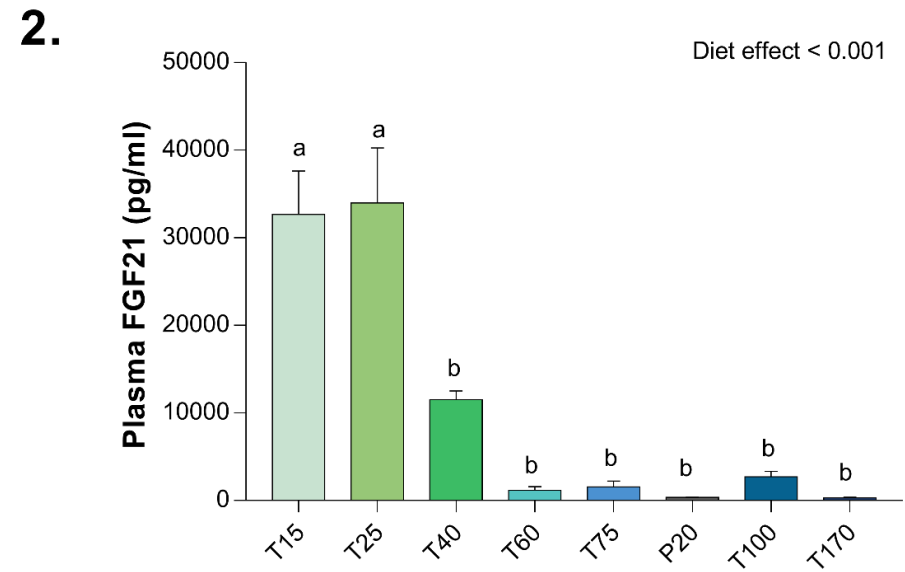
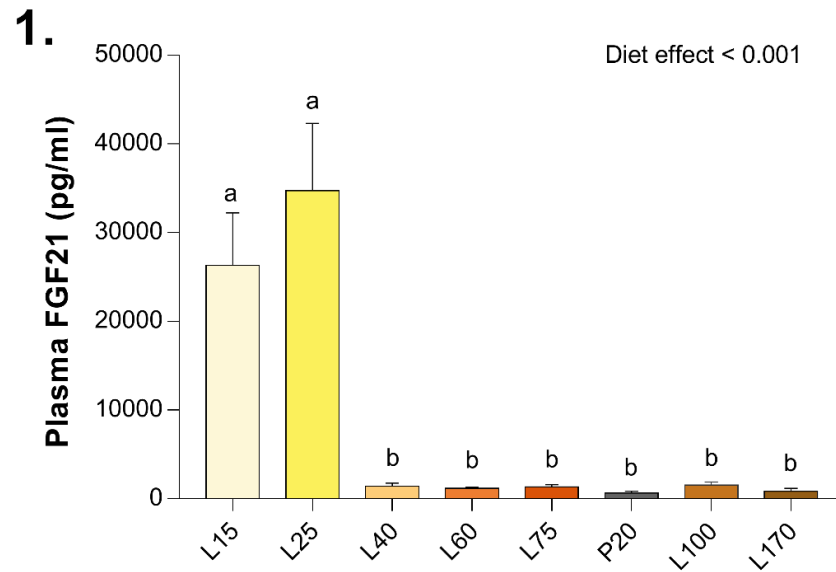


Table 3. Relative expression of mRNA as determined by RT-qPCR. **1.** For the LL diets. **2.** For the LT diets. Values are expressed as means + SEM. Data that do not share the same letter are different at the $p < 0.05$. Bolt values are those significantly different from the P20 group.

1	Diet	L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	L170	Diet Effect
Liver	GK	0.95±0.34	0.89±0.31	0.87±0.31	0.60±0.21	0.70±0.26	1.00±0.35	0.58±0.20	0.90±0.32	NS
	L-PK	1.26±0.45	1.24±0.44	0.94±0.33	1.03±0.37	1.14±0.43	1.00±0.35	1.16±0.41	0.83±0.31	NS
	GS	0.85±0.30	0.70±0.25	0.85±0.30	0.73±0.26	0.75±0.28	1.00±0.35	0.87±0.31	0.85±0.30	NS
	CD36	1.09±0.39	0.60±0.21	0.73±0.26	0.62±0.22	0.77±0.31	1.00±0.35	0.68±0.24	0.72±0.27	NS
	CPT1a	1.62±0.57 ^a	0.85±0.30 ^{ab}	0.98±0.35 ^{ab}	0.67±0.24 ^b	0.64±0.24 ^b	1.00±0.35 ^{ab}	0.74±0.26 ^b	1.13±0.40 ^{ab}	<0.05
	ACOX	1.28±0.45 ^a	0.65±0.23 ^b	0.75±0.26 ^{ab}	0.68±0.24 ^a	0.75±0.28 ^{ab}	1.00±0.35 ^{ab}	0.79±0.28 ^{ab}	1.25±0.44 ^{ab}	<0.05
	ACC	1.55±0.55	1.03±0.37	0.89±0.32	0.92±0.32	0.91±0.34	1.00±0.35	1.09±0.38	1.07±0.41	NS
	FAS	3.50±1.24^a	2.09±0.74 ^{ab}	1.78±0.63 ^{ab}	1.71±0.61 ^{ab}	1.78±0.67 ^{ab}	1.00±0.35 ^b	1.96±0.69 ^{ab}	1.85±0.70 ^{ab}	<0.05
	MTTP	1.35±0.48	0.98±0.35	0.90±0.32	0.84±0.30	0.89±0.34	1.00±0.35	0.90±0.32	1.39±0.49	NS
	FGF21	10.82±4.09^a	10.58±3.74^a	1.11±0.39 ^b	0.67±0.24 ^b	1.59±0.30 ^b	1.00±0.35 ^b	0.98±0.35 ^b	0.87±0.31 ^b	<0.001
EAT	ACC	1.11±0.39 ^{ab}	1.20±0.43 ^{ab}	0.90±0.32 ^{ab}	1.02±0.36 ^{ab}	0.54±0.19 ^b	1.00±0.35 ^{ab}	0.80±0.28 ^{ab}	1.32±0.47 ^a	<0.05
	FAS	1.35±0.48 ^{ab}	1.48±0.52 ^{ab}	0.90±0.32 ^{ab}	1.18±0.42 ^{ab}	0.74±0.26 ^b	1.00±0.35 ^{ab}	0.95±0.34 ^{ab}	1.48±0.52 ^a	<0.01
	UCP1	4.63±1.64	3.14±1.11	0.76±0.27	1.25±0.44	1.19±0.48	1.00±0.35	1.22±0.46	3.09±1.09	<0.05
	UCP2	0.98±0.35 ^b	1.16±0.41 ^{ab}	1.22±0.43 ^{ab}	1.00±0.35 ^b	0.76±0.27 ^b	1.00±0.35 ^b	1.06±0.38 ^{ab}	1.63±0.57^a	<0.01
	UCP3	1.23±0.44	0.99±0.35	0.85±0.30	1.06±0.37	0.80±0.28	1.00±0.35	0.94±0.33	1.35±0.48	NS
Hypothalamus	FGF21	1.62±0.29 ^{ab}	0.82±0.16 ^{ab}	0.86±0.14 ^{ab}	0.51±0.20 ^a	1.13±0.48 ^{ab}	1.00±0.28 ^{ab}	1.88±0.37 ^b	1.25±0.19 ^{ab}	<0.05

2	Diet	T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170	Diet Effect
Liver	GK	0.37±0.13	0.90±0.32	1.24±0.44	1.42±0.54	1.28±0.45	1.00±0.35	1.43±0.50	1.09±0.41	NS
	L-PK	0.96±0.34	0.90±0.32	1.67±0.59	1.70±0.64	1.21±0.43	1.00±0.35	1.47±0.52	0.98±0.37	NS
	GS	1.07±0.38 ^b	1.48±0.41 ^b	1.99±0.70 ^{ab}	2.19±0.77 ^{ab}	2.76±0.97^a	1.00±0.35 ^b	2.05±0.73 ^{ab}	1.05±0.53 ^{ab}	<0.01
	CD36	1.81±0.64	1.28±0.45	0.96±0.34	1.54±0.58	1.68±0.59	1.00±0.35	0.49±0.53	0.96±0.36	NS
	CPT1a	1.03±0.36 ^b	1.10±0.39 ^b	1.75±0.62 ^{ab}	2.52±0.89^a	2.19±0.77 ^{ab}	1.00±0.35 ^b	1.57±0.55 ^{ab}	1.10±0.39 ^b	<0.01
	ACOX	1.06±0.37	0.78±0.28	1.00±0.35	1.60±0.61	1.49±0.53	1.00±0.35	1.19±0.42	1.28±0.48	NS
	ACC	1.28±0.45	1.05±0.37	1.24±0.44	1.77±0.67	1.32±0.47	1.00±0.35	1.70±0.60	1.02±0.39	NS
	FAS	3.01±1.06^a	2.15±0.76 ^{ab}	2.29±0.81 ^{ab}	1.98±0.75 ^{ab}	1.31±0.46 ^{ab}	1.00±0.35 ^b	2.20±0.78 ^{ab}	0.99±0.37 ^b	<0.001
	MTTP	1.01±0.36 ^{ab}	0.86±0.30 ^b	0.98±0.35 ^{ab}	1.42±0.50 ^a	1.15±0.41 ^{ab}	1.00±0.35 ^{ab}	1.17±0.41 ^{ab}	0.99±0.35 ^{ab}	<0.05
	FGF21	17.23±6.09^{ab}	21.86±8.26^a	13.81±4.88 ^{abc}	1.80±0.68 ^{bc}	5.37±1.90 ^{bc}	1.00±0.35 ^c	4.36±1.54 ^{bc}	1.31±0.49 ^{bc}	<0.001
EAT	ACC	0.76±0.27	1.41±0.50	0.55±0.19	0.60±0.23	0.40±0.15	1.00±0.35	0.55±0.20	0.97±0.40	NS
	FAS	0.64±0.23	0.94±0.33	0.66±0.23	0.67±0.25	0.44±0.18	1.00±0.35	0.62±0.22	0.95±0.39	NS
	UCP1	5.33±1.89 ^a	5.81±2.37 ^a	3.20±1.13 ^{ab}	0.75±0.28 ^{ab}	1.36±0.55 ^{ab}	1.00±0.35 ^{ab}	0.62±0.22 ^b	3.22±1.32 ^{ab}	<0.01
	UCP2	1.22±0.43	1.28±0.45	0.68±0.24	0.86±0.35	0.72±0.27	1.00±0.35	0.76±0.27	0.91±0.37	NS
	UCP3	0.34±0.12	0.99±0.35	0.70±0.25	0.56±0.21	0.41±0.15	1.00±0.35	0.54±0.19	0.54±0.22	NS
Hypothalamus	FGF21	0.88±0.22	1.08±0.20	0.85±0.15	1.27±0.28	1.25±0.29	1.00±0.23	1.45±0.44	1.33±0.29	NS

Supplemental Table.1. Composition of the experimental diets. **1.** Composition of LL diets. **2.** Composition of LT diets.

1.

	L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	L170
Amino acid content (g/kg)								
Histidine	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3,28	3.28
Isoleucine	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6,26	6.26
Leucine	13.56	13.56	13.56	13.56	13.56	13.56	13,56	13.56
Lysine	1.52	2.51	4.03	6.07	7.59	10.13	10,13	17.33
Threonine	6.11	6.11	6.11	6.11	6.11	6.11	6,11	6.11
Tryptophan	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2,98	2.98
Valine	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7,90	7.90
Arginine	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22	5,22	5.22
Methionine	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3,43	3.43
Phenylalanine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56
Alanine	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4,77	4.77
Aspartic acid	10.28	10.28	10.28	10.28	10.28	10.28	10,28	10.28
Cysteine	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1,34	1.34
Glutamic acid	27.27	27.27	27.27	27.27	27.27	27.27	27,27	27.27
Glycine	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38	2,38	2.38
Proline	12.52	12.52	12.52	12.52	12.52	12.52	12,52	12.52
Serine	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45	7,45	7.45
Tyrosine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56
Weight content (g/kg)								
Milk proteins	29	48	77	116	145	193.5	29	193.5
Starch	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4
Sucrose	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8
Soy Oil	40	40	40	40	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50	50	50	50	50
Choline	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Energy content (%)								
Protein	19.8	19.8	19.8	19.9	19.9	20	19.8	20.2
Carbohydrate	69.1	69	68.9	68.8	68.8	68.5	69.1	68.2
Fat	10.1	10.2	10.2	10.3	10.3	10.4	10.1	10.5
Energy density (kJ/g)	15	14.95	14.87	14.77	14.77	14.57	15	14.45

2. Supplemental Table 2

	T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170
Amino acid content (g/kg)								
Histidine	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3,28	3.28
Isoleucine	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6,26	6.26
Leucine	13.56	13.56	13.56	13.56	13.56	13.56	13,56	13.56
Lysine	10.13	10.13	10.13	10.13	10.13	10.13	10,13	10.13
Threonine	0.92	1.52	2.43	3.66	4.58	6.11	6,11	15.31
Tryptophan	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2,98	2.98
Valine	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7,90	7.90
Arginine	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22	5,22	5.22
Methionine	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3,43	3.43
Phenylalanine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56
Alanine	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4,77	4.77
Aspartic acid	10.28	10.28	10.28	10.28	10.28	10.28	10,28	10.28
Cysteine	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1,34	1.34
Glutamic acid	27.27	27.27	27.27	27.27	27.27	27.27	27,27	27.27
Glycine	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38	2,38	2.38
Proline	12.52	12.52	12.52	12.52	12.52	12.52	12,52	12.52
Serine	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45	7,45	7.45
Tyrosine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56
Weight content (g/kg)								
Milk proteins	29	48	77	116	145	193.5	29	193.5
Starch	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4
Sucrose	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8
Soy Oil	40	40	40	40	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50	50	50	50	50
Choline	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Energy content (%)								
Protein	20.2	20.3	20.5	20.7	20.9	20	20.2	20
Carbohydrate	68.3	68.2	68.1	67.9	67.7	68.5	68.3	68.5
Fat	10.4	10.4	10.4	10.3	10.3	10.4	10.4	10.4
Energy density (kJ/g)	14.60	14.62	14.65	14.70	14.73	14.57	14.60	14.57

Supplemental Table 3. Primers sequences used for mRNA expression measurement in liver and EAT.

Protein	Genes	Full-length name	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (3' to 5')
	18S	Ribosomal RNA	ACGGAAGGGCACCACCAGGAG	GCACCACCACCCACGGAAACG
Liver				
GK	GK	Glucokinase	CCCTGAGTGGCTTACAGTTC	ACGGATGTGGAGTGTGAAGC
L-PK	L-PK	Puryvate kinase	CTGGAACACCTCTGCCTTCTG	CACAATTTCCACCTCCGACTC
GS	GS	Glycogen synthase	TGCTGGGTCGCTACCTATGTG	TCTGCCTCTCGCCTGCTT
CD36	<i>Cd36</i>	Cluster of differentiation 36	CATGATTAATGGCACAGATGCA	GCAAATGTCAGAGGAAAAGAACCT
Cpt1a	<i>Cpt1a</i>	Carnitine palmitoyl transferase 1a	TCTCTGGATGCGGTAGAAAAGG	CTCTATATCCCTGTTCGATTCTGT
ACOX	ACOX	Acyl CoA oxydase	AAGAGTTCATTCTCAACAGCCC	CTTGACAGACTCTGAGCTGC
ACCb	ACCb	Acetyl-Coa carboxylase b	GGGCTCCCTGGATGACAAC	GCTCTTCCGGGAGGAGTTCT
FAS	<i>Fasn</i>	Fatty acid synthase	TGCTCCCAGCTGCAGGC	GCCCCGTAGCTCTGGGTGTA
MTTP	MTTP	Microsomal triglyceride transfert protein	AGGGTGGTCTAGCCATTGACA	CAGCCACCCGATTTTTCACT
FGF21	<i>Fgf21</i>	Fibroblast growth factor 21	CCTGGAGCTCAAAGCCTTGA	AAACTGCAGGCCTCAGGATC
EAT				
CD36	<i>Cd36</i>	Cluster of differentiation 36	CATGATTAATGGCACAGATGCA	GCAAATGTCAGAGGAAAAGAACCT
ACCa	ACCa	Acetyl-Coa carboxylase a	TGGTGCAGAGGTACCGAAGTG	CGTAGTGGCCGTCTGAAACT
FAS	<i>Fasn</i>	Fatty acid synthase	TGCTCCCAGCTGCAGGC	GCCCCGTAGCTCTGGGTGTA
UCP1	<i>Ucp1</i>	Mitochondrial uncoupling protein 1	CGTACCAAGCTGTGCGATGT	GACCCGAGTCGCAGAAAAGA
UCP2	<i>Ucp2</i>	Mitochondrial uncoupling protein 2	TGAAAGCCAACCTCATGACAGA	CAATGACGGTGGTGCAGAAG
UCP3	<i>Ucp3</i>	Mitochondrial uncoupling protein 3	GGGATCCTGGAACGTGATGA	TGGAGATTCCCGCAGTACCT

2.4.3. Résultats complémentaires: effet de la déficience en acides aminés indispensables (lysine et thréonine) sur le métabolisme protéique chez le rat en croissance

2.4.3.1. Méthodes

Les rats sont issus du protocole expérimental décrit précédemment (**Article 2**). Afin de mesurer la synthèse protéique, les 64 rats de l'étude 1 (lysine) et les 64 rats de l'étude 2 (thréonine) ont été nourris avec un repas calibré de leur propre régime test (58.2 kJ) : L/T15, L/T25, L/T40, L/T60, L/T75, P20, L/T100 et L/T170. 1h30 après la distribution du repas, une injection de valine-¹³C a été réalisée au niveau de la queue. Trente minutes plus tard, les rats ont été euthanasiés, le foie et le muscle gastrocnémien ont été prélevés. Des analyses de spectrométrie de masse ont permis d'étudier les vitesses de synthèse protéique, FSR et ASR. De plus, des analyses d'expression de gènes impliqués dans le métabolisme protéique ont été réalisées par qPCR, ainsi que des dosages d'AA dans la veine porte et la veine cave réalisés par UPLC.

2.4.3.2. Résultats principaux

Les résultats de l'**Article 2 p.94**, montrent qu'une déficience sévère en lysine et thréonine (L/T15 et L/T25) et modérée (L/T40) entraîne une diminution du gain de poids corporel dû à une diminution de la masse maigre (**Tableau 2, p.109-110**). Le poids du foie, des reins, du muscle et de la carcasse sont diminués. De plus, la déficience en lysine ou thréonine ne modifie pas le FSR dans le foie. Mais une restriction sévère (L15, T15 et T25) diminue le FSR dans le muscle (**Figure 1, p.119**). Lorsque le taux de synthèse protéique est exprimé par tissu, l'ASR est diminué par une restriction sévère en lysine et thréonine dans le foie et dans le muscle. L'ASR dans le muscle est également impacté par des déficiences plus modérées (T40, T60 et T75).

Nous avons évalué les effets de l'apport en AAI sur des marqueurs des différentes voies de la protéolyse, ULK1, marqueurs de l'autophagie ; l'ubiquitine, marqueur de la voie ubiquitine-protéasome ; calpaïne 2, marqueur de la voie des calpaïnes ; et caspase 3, marqueur de la voie des caspases (**Tableau 1, p.120; Tableau 2, p.121**). Dans le foie, la déficience en lysine et en thréonine ne modifie pas l'expression des ARNm d'ULK1, de l'ubiquitine, de la calpaïne 2 et de la caspase 3, par rapport au contrôle P20. Dans le muscle, une déficience sévère en lysine (L15) induit l'augmentation de l'expression des ARNm de l'ubiquitine, d'ULK1 et de la calpaïne 2, contrairement à la déficience en thréonine qui n'induit aucun effet sur l'expression de ces gènes. Puis, nous avons évalués l'effet de la déficience en lysine et thréonine sur l'initiation de la traduction via l'état d'activation de la voie GCN2 et mTOR. Une déficience sévère en lysine et en thréonine (L15 et T15) augmente l'expression des ARNm de 4E-BP1 par rapport aux rats P20 dans le foie et le muscle. Ces résultats doivent être confirmés par la mesure de l'état de phosphorylation des protéines par western blot. Dans le foie et dans le muscle, une déficience sévère en lysine induit une augmentation des ARNm des cibles de GCN2 (eIF2 α , ATF4, CHOP et TRB3). Une déficience

sévère en thréonine induit une augmentation des ARNm de TRB3 dans le foie et dans le muscle, ainsi qu'une augmentation des ARNm de CHOP dans le muscle.

Les dosages plasmatiques d'AA indiquent que la déficience en lysine dans les régimes entraîne une diminution de sa concentration dans la veine porte et la veine cave (**Tableau 3, p.122**). Le régime L170 augmente la concentration plasmatique de lysine dans la veine porte et la veine cave, par rapport au groupe contrôle P20. Cependant, aucune différence n'est observée dans l'ensemble des AAI et AA non indispensables. De façon étonnante, la concentration de la thréonine dans la veine porte est diminuée chez les rats T15 par rapport aux rats T60 et T75, mais aucune différence n'est observée par rapport au groupe contrôle, P20. Dans la veine cave, on observe une augmentation de la concentration de la thréonine chez les rats T40 par rapport au T170. Dans la veine porte et la veine cave, l'ensemble des AAI et non indispensables diminuent proportionnellement selon la déficience d'apport en thréonine dans le régime.

La protéosynthèse et la protéolyse ne sont pas modifiées lorsque l'apport en lysine ou en thréonine est en excès (L/T170).

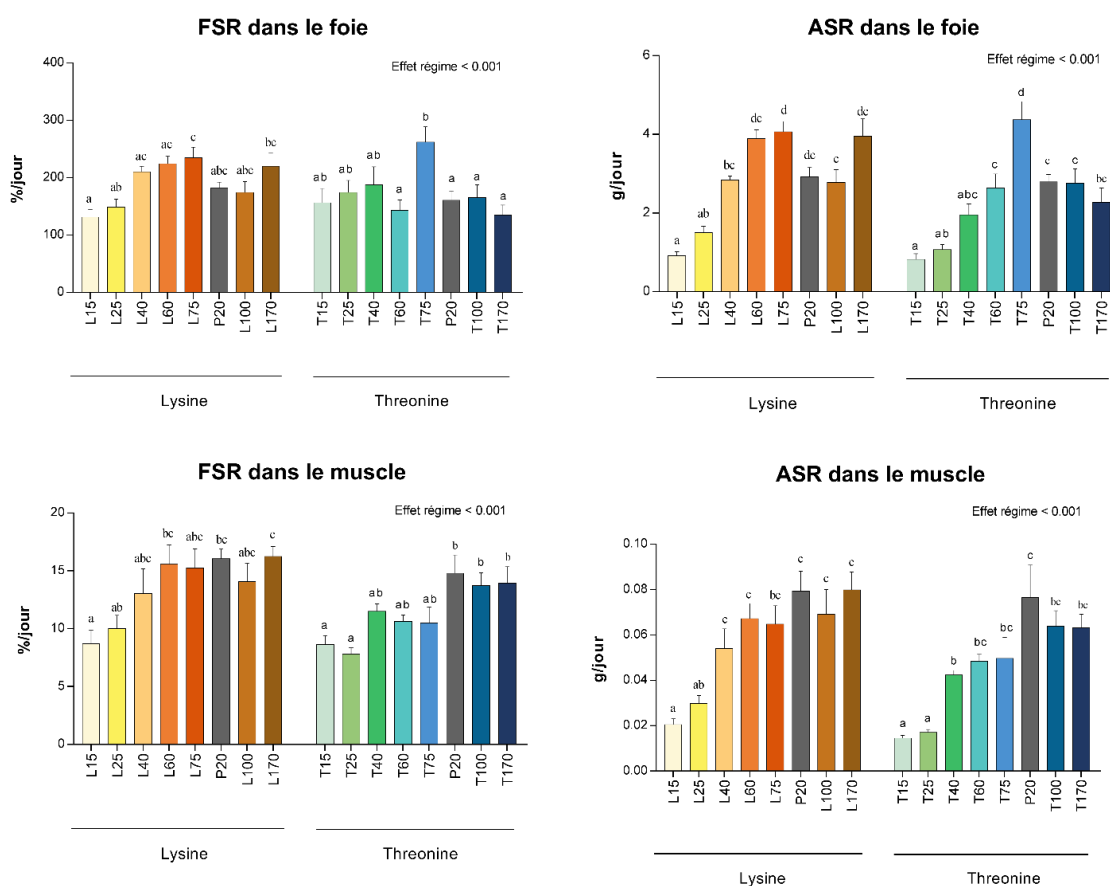


Figure 1. Taux fractionnaire de synthèse protéique (FSR) et taux de synthèse absolue (ASR) dans le foie et le muscle gastrocnémien en réponse à différents niveaux de lysine et thréonine dans le régime.

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n = 8 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

Tableau 1. Expression relative des ARNm de gènes impliqués dans la protéosynthèse et la protéolyse dans le foie

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n = 8 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

Ré- gime		L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	L170	Effet régime
Foie	eIF2 α	1.26 $\pm$ 0.22 ^a	0.74 $\pm$ 0.04 ^b	0.70 $\pm$ 0.12 ^b	0.66 $\pm$ 0.04 ^b	0.73 $\pm$ 0.05 ^b	1.00 $\pm$ 0.11 ^{ab}	0.75 $\pm$ 0.04 ^b	1.23 $\pm$ 0.45 ^{ab}	<0.001
	ATF4	1.65 $\pm$ 0.35 ^a	0.93 $\pm$ 0.10 ^b	0.83 $\pm$ 0.16 ^b	0.56 $\pm$ 0.06 ^b	0.74 $\pm$ 0.05 ^b	0.73 $\pm$ 0.05 ^b	1.00 $\pm$ 0.19 ^b	0.93 $\pm$ 0.27 ^b	<0.001
	CHOP	3.55 $\pm$ 0.71 ^a	1.74 $\pm$ 0.26 ^b	0.82 $\pm$ 0.16 ^c	0.72 $\pm$ 0.04 ^c	0.72 $\pm$ 0.04 ^c	0.96 $\pm$ 0.17 ^c	1.00 $\pm$ 0.14 ^c	2.14 $\pm$ 1.08 ^b	<0.001
	TRB3	15.11 $\pm$ 5.00 ^a	7.32 $\pm$ 1.67 ^{ab}	1.05 $\pm$ 0.86 ^b	0.74 $\pm$ 0.04 ^b	0.68 $\pm$ 0.08 ^b	1.00 $\pm$ 0.27 ^b	2.73 $\pm$ 1.18 ^b	2.48 $\pm$ 0.56 ^b	<0.001
	4E-BP1	1.71 $\pm$ 0.36 ^a	1.12 $\pm$ 0.11 ^{ab}	0.78 $\pm$ 0.18 ^b	0.70 $\pm$ 0.06 ^b	0.92 $\pm$ 0.07 ^b	1.00 $\pm$ 0.14 ^b	0.94 $\pm$ 0.15 ^b	1.25 $\pm$ 0.48 ^b	<0.01
	Caspase3	0.85 $\pm$ 0.12	0.68 $\pm$ 0.03	0.68 $\pm$ 0.11	0.61 $\pm$ 0.10	0.76 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.11	0.82 $\pm$ 0.26	2.87 $\pm$ 0.14	NS
	Calpaïn2	1.63 $\pm$ 0.29 ^a	0.79 $\pm$ 0.13 ^b	0.79 $\pm$ 0.12 ^b	0.80 $\pm$ 0.05 ^b	0.81 $\pm$ 0.08 ^b	1.00 $\pm$ 0.10 ^{ab}	0.91 $\pm$ 0.24 ^b	2.64 $\pm$ 0.10 ^{ab}	<0.01
	Ub	0.94 $\pm$ 0.18	0.69 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.12	0.61 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.16	0.68 $\pm$ 0.14	1.67 $\pm$ 1.04	NS
	ULK1	1.42 $\pm$ 0.23	0.86 $\pm$ 0.05	0.70 $\pm$ 0.10	0.85 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.10	0.87 $\pm$ 0.07	1.23 $\pm$ 0.36	NS
Ré- gime		T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170	Effet régime
Foie	eIF2 α	1.34 $\pm$ 0.26	1.03 $\pm$ 0.13	0.90 $\pm$ 0.05	1.17 $\pm$ 0.26	1.45 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.16	0.96 $\pm$ 0.14	1.08 $\pm$ 0.12	NS
	ATF4	2.37 $\pm$ 0.42	1.77 $\pm$ 0.48	1.32 $\pm$ 0.35	1.30 $\pm$ 0.29	1.42 $\pm$ 0.51	1.00 $\pm$ 0.21	1.16 $\pm$ 0.27	2.20 $\pm$ 0.66	NS
	CHOP	2.47 $\pm$ 0.91	1.66 $\pm$ 0.33	1.56 $\pm$ 0.26	1.03 $\pm$ 0.23	1.64 $\pm$ 0.21	1.00 $\pm$ 0.17	2.11 $\pm$ 1.07	1.04 $\pm$ 0.09	NS
	TRB3	38.62 $\pm$ 10.92 ^a	25.81 $\pm$ 4.75 ^{ab}	19.33 $\pm$ 6.22 ^{ab}	2.49 $\pm$ 0.88 ^b	2.58 $\pm$ 0.28 ^b	1.00 $\pm$ 0.21 ^b	9.03 $\pm$ 5.38 ^b	6.87 $\pm$ 4.78 ^b	<0.001
	4E-BP1	1.99 $\pm$ 0.19 ^a	1.58 $\pm$ 0.12 ^{ab}	1.58 $\pm$ 0.14 ^{ab}	1.47 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.68 $\pm$ 0.17 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.14 ^b	1.55 $\pm$ 0.18 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.10 ^b	<0.001
	Caspase3	0.56 $\pm$ 0.07 ^b	0.57 $\pm$ 0.06 ^b	0.90 $\pm$ 0.12 ^{ab}	1.43 $\pm$ 0.22 ^a	1.19 $\pm$ 0.23 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.13 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.18 ^{ab}	0.86 $\pm$ 0.14 ^{ab}	<0.01
	Calpaïn2	1.36 $\pm$ 0.16	1.26 $\pm$ 0.18	1.43 $\pm$ 0.14	1.94 $\pm$ 0.33	2.01 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.15	1.84 $\pm$ 0.37	1.24 $\pm$ 0.17	<0.05
	Ub	1.28 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.13	1.24 $\pm$ 0.19	1.77 $\pm$ 0.31	1.32 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.11	1.70 $\pm$ 0.37	1.02 $\pm$ 0.16	NS
	ULK1	1.09 $\pm$ 0.12	0.73 $\pm$ 0.09	1.04 $\pm$ 0.10	1.46 $\pm$ 0.25	1.11 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.10	1.08 $\pm$ 0.19	1.01 $\pm$ 0.11	NS

Tableau 2. Expression relative des ARNm de gènes impliqués dans la protéosynthèse et la protéolyse dans le muscle

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n = 8 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

Ré- gime		L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	L170	Effet régime
Muscle	eIF2 α	2.27 $\pm$ 0.28 ^a	1.37 $\pm$ 0.11 ^b	1.45 $\pm$ 0.26 ^{ab}	1.34 $\pm$ 0.13 ^b	1.04 $\pm$ 0.14 ^b	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	1.48 $\pm$ 0.14 ^{ab}	1.43 $\pm$ 0.21 ^{ab}	<0.001
	CHOP	3.46 $\pm$ 0.42 ^a	2.15 $\pm$ 0.28 ^b	1.75 $\pm$ 0.29 ^{bc}	1.46 $\pm$ 0.16 ^{bc}	1.27 $\pm$ 0.16 ^{bc}	1.00 $\pm$ 0.08 ^c	1.61 $\pm$ 0.11 ^{bc}	1.28 $\pm$ 0.13 ^{bc}	<0.001
	TRB3	21.76 $\pm$ 7.90 ^a	6.75 $\pm$ 2.52 ^b	1.09 $\pm$ 0.11 ^b	0.87 $\pm$ 0.16 ^b	0.93 $\pm$ 0.21 ^b	1.00 $\pm$ 0.27 ^b	1.36 $\pm$ 0.16 ^b	0.78 $\pm$ 0.09 ^b	<0.001
	4E-BP1	2.36 $\pm$ 0.39 ^a	1.22 $\pm$ 0.11 ^b	1.41 $\pm$ 0.25 ^b	1.05 $\pm$ 0.07 ^b	0.86 $\pm$ 0.08 ^b	1.00 $\pm$ 0.09 ^b	1.23 $\pm$ 0.26 ^b	1.10 $\pm$ 0.12 ^b	<0.001
	Caspase3	0.95 $\pm$ 0.12	0.94 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.14	1.09 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.14	1.00 $\pm$ 0.13	1.19 $\pm$ 0.18	1.01 $\pm$ 0.09	NS
	Calpaïn2	1.89 $\pm$ 0.25 ^a	1.25 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.51 $\pm$ 0.24 ^{ab}	1.42 $\pm$ 0.20 ^{ab}	1.02 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.10 ^b	1.48 $\pm$ 0.21 ^{ab}	1.34 $\pm$ 0.19 ^{ab}	<0.05
	Ub	2.47 $\pm$ 0.33 ^a	1.14 $\pm$ 0.06 ^b	1.48 $\pm$ 0.22 ^b	1.25 $\pm$ 0.13 ^b	0.87 $\pm$ 0.09 ^b	1.00 $\pm$ 0.09 ^b	1.44 $\pm$ 0.19 ^b	1.28 $\pm$ 0.12 ^b	<0.001
	ULK1	1.82 $\pm$ 0.33 ^a	0.96 $\pm$ 0.09 ^b	1.43 $\pm$ 0.20 ^{ab}	1.17 $\pm$ 0.12 ^{ab}	0.87 $\pm$ 0.11 ^b	1.00 $\pm$ 0.09 ^b	1.36 $\pm$ 0.23 ^{ab}	1.16 $\pm$ 0.09 ^{ab}	<0.01
Ré- gime		T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170	Effet régime
Muscle	eIF2 α	1.39 $\pm$ 0.13 ^{ac}	1.41 $\pm$ 0.19 ^c	0.91 $\pm$ 0.09 ^{abc}	0.84 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.82 $\pm$ 0.06 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.13 ^{abc}	1.13 $\pm$ 0.11 ^{abc}	0.91 $\pm$ 0.17 ^{abc}	<0.01
	ATF4	0.65 $\pm$ 0.10	0.94 $\pm$ 0.25	2.01 $\pm$ 1.07	1.34 $\pm$ 0.29	1.91 $\pm$ 0.51	1.00 $\pm$ 0.16	1.99 $\pm$ 0.24	0.93 $\pm$ 0.13	NS
	CHOP	1.61 $\pm$ 0.19 ^{ab}	2.23 $\pm$ 0.52 ^a	1.11 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.01 $\pm$ 0.10 ^b	1.04 $\pm$ 0.10 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.11 ^b	1.26 $\pm$ 0.23 ^{ab}	1.17 $\pm$ 0.37 ^{ab}	<0.05
	TRB3	1.80 $\pm$ 0.47	1.07 $\pm$ 0.27	1.45 $\pm$ 0.33	1.28 $\pm$ 0.20	1.47 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.22	1.62 $\pm$ 0.34	0.55 $\pm$ 0.12	NS
	4E-BP1	1.91 $\pm$ 0.36 ^a	1.30 $\pm$ 0.14 ^{ab}	0.80 $\pm$ 0.10 ^b	0.75 $\pm$ 0.08 ^b	0.93 $\pm$ 0.12 ^b	1.00 $\pm$ 0.10 ^b	0.94 $\pm$ 0.10 ^b	0.87 $\pm$ 0.14 ^b	<0.001
	Caspase3	0.62 $\pm$ 0.10	0.61 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.16	0.86 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.11	NS
	Calpaïn2	0.90 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.11	0.84 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.16	0.97 $\pm$ 0.08	0.77 $\pm$ 0.12	NS
	Ub	1.36 $\pm$ 0.12 ^a	1.26 $\pm$ 0.17 ^{ab}	0.78 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.69 $\pm$ 0.06 ^b	0.66 $\pm$ 0.07 ^b	1.00 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.12 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0.82 $\pm$ 0.17 ^{ab}	<0.001
	ULK1	1.05 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.14	0.76 $\pm$ 0.09	0.67 $\pm$ 0.05	0.80 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.26	0.92 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.38	NS

Tableau 3. Concentration en acides aminés (pmol/μl) dans la veine porte et la veine cave, (1) selon l'apport en lysine, (2) selon l'apport en thréonine.

Les données sont présentées en moyenne ± SEM (n = 8 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec p<0.05.

1.	Régime	L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	L170	Effet régime
Veine porte	Lysine	39.7 ± 11.5 ^a	40.7 ± 2.4 ^a	171.0 ± 46.1 ^{ab}	297.4 ± 16.0 ^{bc}	390.1 ± 18.0 ^c	415.9 ± 63.5 ^c	351.6 ± 20.6 ^c	642.5 ± 40.7 ^d	<0.001
	AAI	3371 ± 194	2921 ± 164	2622 ± 151	2909 ± 158	2793 ± 147	2678 ± 138	2957 ± 157	2974 ± 148	NS
	AA non indispensables	3534 ± 109	3582 ± 113	2829 ± 83	2708 ± 81	2694 ± 84	2558 ± 76	2643 ± 84	2339 ± 73	NS
	Total AA	6905 ± 105 ^a	6504 ± 94 ^{ab}	5452 ± 80 ^{ab}	5618 ± 84 ^{ab}	5487 ± 79 ^{ab}	5236 ± 73 ^{ab}	5600 ± 87 ^{ab}	5313 ± 60 ^b	<0.01
Veine cave	Lysine	27.5 ± 5.2 ^a	33.4 ± 2.4 ^a	159.0 ± 34.6 ^{ab}	268.2 ± 14.6 ^{bc}	363.1 ± 18.7 ^c	396.1 ± 32.7 ^c	303.3 ± 21.8 ^c	565.6 ± 33.3 ^d	<0.001
	AAI	3122 ± 182	2687 ± 155	2784 ± 163	2825 ± 156	2809 ± 151	2425 ± 127	2117 ± 147	2725 ± 137	NS
	AA non indispensables	3288 ± 105	3027 ± 96	2965 ± 90	2603 ± 81	2649 ± 91	2262 ± 74	2461 ± 82	2211 ± 74	NS
	Total AA	6411 ± 99	5715 ± 86	5750 ± 86	5429 ± 83	5459 ± 83	4687 ± 69	5179 ± 81	4937 ± 56	NS
2.	Régime	T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170	Effet régime
Veine porte	Thréonine	808 ± 44 ^a	990 ± 41 ^{ab}	1054 ± 78 ^{ab}	1153 ± 53 ^b	1152 ± 87 ^b	963 ± 47 ^{ab}	843 ± 35 ^{ab}	850 ± 45 ^{ab}	<0.001
	AAI	2673 ± 111 ^a	2980 ± 136 ^a	3579 ± 173 ^{ab}	4432 ± 212 ^b	4814 ± 208 ^b	4656 ± 224 ^b	3518 ± 160 ^{ab}	3921 ± 182 ^{ab}	<0.001
	AA non indispensables	1685 ± 46 ^a	1781 ± 54 ^a	2249 ± 64 ^{ab}	2490 ± 60 ^{bc}	2630 ± 66 ^{bc}	2974 ± 80 ^c	2514 ± 78 ^{bc}	3128 ± 115 ^c	<0.001
	Total AA	4358 ± 157 ^a	4762 ± 190 ^a	5828 ± 237 ^{ab}	6923 ± 272 ^b	7445 ± 274 ^b	7630 ± 304 ^b	6033 ± 239 ^b	7050 ± 297 ^{ab}	<0.001
Veine cave	Thréonine	854 ± 59 ^{ab}	994 ± 35 ^{ab}	1116 ± 69 ^a	1081 ± 69 ^{ab}	1147 ± 112 ^a	913 ± 42 ^{ab}	815 ± 48 ^{ab}	779 ± 49 ^b	<0.01
	AAI	3621 ± 115 ^a	3749 ± 161 ^a	4617 ± 218 ^{ab}	5617 ± 265 ^b	5549 ± 267 ^b	5703 ± 285 ^b	3919 ± 200 ^{ab}	4436 ± 218 ^{ab}	<0.001
	AA non indispensables	2206 ± 82 ^a	2490 ± 88 ^a	2969 ± 97 ^{ab}	3357 ± 104 ^b	3503 ± 105 ^b	3918 ± 115 ^b	3259 ± 110 ^{ab}	3774 ± 142 ^b	<0.001
	Total AA	7180 ± 247 ^{ad}	6240 ± 249 ^{acd}	7587 ± 316 ^{abcd}	8974 ± 369 ^{bcd}	9052 ± 373 ^{bcd}	9621 ± 400 ^c	7179 ± 310 ^{dcd}	8210 ± 361 ^{bcd}	<0.001

2.4.3.3. Discussion

La déficience sévère en lysine et en thréonine induit une diminution du taux de synthèse protéique dans le foie. De plus, le taux de synthèse protéique au niveau du muscle est impacté par une déficience modérée en thréonine. L'analyse de la voie GCN2 dans le foie et dans le muscle montre que la déficience sévère en lysine et thréonine augmente l'expression de gènes cibles de GCN2 : eIF2 α , ATF4, CHOP et TRB3 en cas de déficience sévère en lysine, et CHOP et TRB3 en cas de déficience sévère en thréonine. La voie GCN2 semble être activée en cas de déficiences en un AAI ayant pour rôle de bloquer l'étape d'initiation de la traduction de la synthèse protéique

La protéolyse n'est pas modifiée par une déficience en lysine et en thréonine dans le foie. Etonnement, la thréonine, ayant un impact plus marqué que la lysine sur le taux de synthèse protéique dans le muscle, ne présente aucune modification de l'expression des gènes de la protéolyse, contrairement à la lysine, dont une déficience sévère augmente les gènes de la protéolyse. Les résultats de la protéolyse dans le foie et les dosages des AA plasmatiques suggèrent qu'en réponse à une déficience en lysine, il n'y a pas d'induction du catabolisme des protéines hépatiques, ce qui ne permet pas de compenser la déficience de l'apport alimentaire. La diminution de la concentration en lysine observée dans la veine porte se traduit par une diminution dans la veine cave. Une déficience d'apport en thréonine entraîne une diminution de l'ensemble des AAI dans la veine porte. La thréonine est un AA qui compose les mucines, des glycoprotéines du mucus intestinal [276]. Ces protéines permettent de faciliter la digestion. En cas de déficience en thréonine, l'impact sur le mucus diminue la digestion des protéines alimentaires, ayant pour conséquence une diminution des AAI qui arrive au niveau de la veine porte. Nos résultats indiquent que la protéolyse n'est pas activée au niveau du foie lors d'une restriction en thréonine ne permettant pas d'augmenter la concentration en AAI dans la veine cave chez les rats soumis à une déficience sévère.

Ces résultats montrent que la déficience sévère en un seul AAI suffit à diminuer le taux de synthèse protéique dans le foie et dans le muscle. Cependant, il ne semble pas y avoir d'effets sur la protéolyse, ce qui suggère que la diminution de la synthèse protéique est le principal mécanisme impliqué dans la diminution de la masse maigre. La déficience en un seul AAI ne permet pas de reproduire les effets de la déficience sévère en protéines et montrent qu'il y a des effets spécifiques de la déficience en lysine et en thréonine.

2.5. Recherches de biomarqueurs du besoin en protéines et acides aminés indispensables

2.5.1. Contexte et objectifs

La qualité et la quantité de l'apport protéique est une préoccupation majeure dans le contexte actuel du fait des transitions démographiques, économiques et nutritionnelles mondiales. Les apports alimentaires

doivent permettre de couvrir les besoins en protéines et en neuf AAI, dont deux sont strictement indispensables, la lysine et la thréonine. Dans les pays en voie de développement, le risque de déficience en AAI et particulièrement en lysine est important. En effet, dans ces pays les sources protéiques proviennent principalement des céréales, or les protéines de céréales présentent des déficiences en certains AAI. La consommation de régimes déficients en AAI a un impact majeur sur la santé de l'individu. En effet, la synthèse des protéines corporelles dépend essentiellement d'un apport équilibré en AAI. Une protéine ne pourra être synthétisée seulement si tous les AA qui la composent sont disponibles en quantité suffisante. Il est donc important que le besoin en AAI soit couvert par l'alimentation, ou qu'en cas de déficience en AAI cela puisse être rapidement détecté.

Un certain nombre de travaux se sont intéressés à cette question du besoin en protéines et en AAI et différentes méthodes ont été développées pour le mesurer : la méthode du bilan azoté, la méthode factorielle, la méthode du bilan du traceur ainsi que les méthodes utilisant la perfusion d'isotopes stables. Cependant, ces méthodes sont lourdes et invasives et les valeurs des besoins diffèrent fortement selon la méthode utilisée. Il est donc nécessaire de développer des approches plus précises et non invasives qui permettent de mesurer facilement et rapidement l'état de suffisance/déficience en AAI. L'émergence de nouvelles technologies et des sciences "omiques", telle que la métabolomique, semblent prometteuses pour développer une nouvelle méthode de mesure des besoins en AAI.

L'objectif de ces études est de déterminer des biomarqueurs du besoin en AAI dans le plasma et les urines, en utilisant un modèle de rats en croissance soumis à un régime déficient en protéines/AAI durant 3 semaines.

2.5.2. **Article 3.** Identification de biomarqueurs du besoin en protéines et AA

2.5.2.1. *Méthodes*

Les rats sont issus de l'expérimentation 1 (**Article 1**). 36 rats en croissance ont été nourris durant 3 semaines avec un régime expérimental contenant différents niveaux d'apport en protéines : 3% (P3), 5% (P5), 8% (P8), 12% (P12), 15% (P15), ou 20% (P20) de protéines. Lors de la 3^{ème} semaine d'expérimentation, les rats ont été placés en cages métaboliques afin de collecter les urines sur 24h. A la fin de l'expérimentation, le sang au niveau de la veine porte et de la veine cave ont été prélevés. Le profil du métabolome a été analysé dans les urines, la veine cave et la veine porte grâce à des analyses LC-MS. Les données de spectres de masse obtenues pour les échantillons d'urine, de veine porte et de veine cave, ont permis d'obtenir 3 matrices. Chaque matrice a été prétraitée. Les données ont été normalisées avec la méthode PQN et centrées-réduites avec Pareto. Une fois, les données prétraitées, deux méthodes d'analyses multivariées ont été appliquées : un modèle quantitatif, la régression PLS et un modèle qualitatif, ICDA. Enfin, pour chaque métabolite discriminant identifié par PLS ou ICDA, l'effet des régimes a été testé par ANOVA à un facteur.

2.5.2.2. *Résultats principaux et conclusion*

Les deux méthodes d'analyses multivariées, PLS et ICDA, nous ont permis d'identifier des métabolites discriminants entre les différents groupes de régimes. La variation du niveau d'apport en protéines a une influence sur le métabolome. La déficience en protéines entraîne une diminution des AAI et une augmentation de certains AA non indispensables (ornithine, serine) dans les plasmas, ainsi qu'une augmentation des systèmes enzymatiques du catabolisme de certains AA induisant la production de métabolites de dégradation dans les plasmas et les urines (indoxyl-sulfate, nicotinamide, carnitine, cadaverine, pipicolate). La restriction protéique entraîne également une modification du cycle entérohépatique des acides biliaires avec une diminution des acides biliaires dans la veine porte, ainsi qu'une augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs et des monosaccharides dans les plasmas et les urines. La comparaison des profils métabolomiques des plasmas et des urines indique que la majorité des molécules retrouvées dans le plasma se retrouve aussi dans les urines.

Ces résultats indiquent que des métabolites sont spécifiques de l'état de déficience et de suffisance en AAI. Certains types de biomarqueurs comme les métabolites de dégradation des AA semblent être des candidats intéressants et spécifiques du besoin en protéines/AAI. Ainsi, il semblerait qu'en analysant ces métabolites dans les fluides biologiques il soit possible de déterminer le statut en AAI. De plus, les urines semblent suffisantes pour déterminer des biomarqueurs de ce besoin. La collecte d'urine est une méthode simple à mettre en œuvre et non invasive qui pourrait facilement être utilisée afin de mesurer le besoin en AAI dans des populations fragiles (enfants, personnes âgées), ou dans des pays en voie de développement où les cas de malnutritions sont nombreux.

2.5.2.3. *Manuscrit : « Identification of biomarkers of protein and amino acid deficiency*

Identification of biomarkers of protein and amino acid deficiency

Joanna Moro¹, Nadezda Khodorova, Daniel Tomé, Claire Gaudichon, Catherine Tardivel, Jean-Charles Martin², Dalila Azzout-Marniche^{1*} and Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse¹

¹UMR PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, 75005, France

² Aix Marseille Univ, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France.

Corresponding author:

Dalila Azzout-Marniche,
UMR PNCA, AgroParisTech
16 rue Claude Bernard
F-75005 Paris, France
Telephone 33-1-44087244
Fax: 33-1-44081858

E-mail: dalila.azzout_marniche@agroparistech.fr

Financial support statement:

Supported by the UMR Nutrition Physiology and Ingestive Behavior AlimH department of Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

Declarations of interest: none

Author disclosures:

JM, DA-M, J-CM, and DJRB have no conflicts of interest.

Author contributions:

The authors responsibilities were as follows—JM, DA-M, J-CM, and DJRB: conducted the research; JM, DA-M, and DJRB: interpreted the data; JM, DA-M and DJRB: wrote the manuscript; JM and DA-M designed the study; JM and DJRB had primary responsibility for the final content; and all authors: read and approved the final manuscript.

Abstract

Aim: Dietary intakes must be sufficient to cover protein and essential amino acid (EAA) requirements. Different methods have been developed to measure them: nitrogen balance method, factorial method, or AA tracer studies. However, these methods are invasive and imprecise. FAO recommends the development of new methods to measure EAA requirement using, in particular, metabolomics. The aim of this study is to determine protein/EAA requirement in plasma and urine of growing rats.

Materials and methods: 36 weanling rats were fed with diets containing 3%, 5%, 8%, 12%, 15% and 20% protein during 3 weeks. During experimentation, urine was collected using metabolic cages, and blood of portal vein and vena was taken at the end of experiment. Metabolomics analyses were performed using LC-MS, and data were analyzed with multivariate analysis model: PLS and ICDA. Each discriminant metabolite identified by PLS or ICDA was tested by one-way ANOVA to evaluate the diet effect.

Results: The two multivariate analysis methods, PLS and ICDA, allowed us to identify discriminating metabolites between different diet groups. Protein deficiency leads to a decrease in EAA and an increase in some non-essential AA in plasma, as well as an increase in the AA catabolism enzyme systems inducing the production of breakdown metabolites in plasma and urine. Protein restriction also leads to a modification of the enterohepatic cycle of bile acids with a decrease in bile acids in the portal vein, as well as an increase in Krebs cycle intermediates and monosaccharides in plasma and urine. Most molecules are found in both plasma and urine.

Conclusion: These results indicate that metabolites are specific for the state of EAA deficiency and sufficiency. Some types of biomarkers such as AA degradation metabolites appear to be interesting and specific candidates for protein/EAA requirement. Moreover, it would appear that by analyzing these metabolites in urine it is possible to determine EAA status.

1. Introduction

The quality and the quantity of protein intake has become a particularly sensitive issue in the context of current debates on both the increase in the world population, the problem of under-nutrition in populations of children worldwide, and the need to a rebalancing between animal and vegetable food sources. Food proteins provide the amino acids (AA) necessary for the synthesis of proteins and various nitrogenous molecules in the body. Proteins are major structural constituents of tissues having a role in structure, transport, an immune role or even an enzyme, hormone, transporter or receptor role. In healthy adult humans, the body protein compartment is estimated to be 15% of the individual's weight. Every day there is a renewal of the protein pool by proteolysis and proteosynthesis estimated at 250-300g per day (2% on average). The maintenance of tissues and the many physiological functions of adults and the support of growth in young, require the maintenance of a balanced body free AA pool, renewed by food intake and body proteolysis. Indeed, protein deficiency induce a large decrease in lee index, a growth index.

In humans, 20 AA are said to be "proteinogenic". Among these 20 AA, 9 are considered essential (EAA), their carbon skeleton not or poorly being synthesized by the body and must therefore be provided by food. Protein synthesis depends critically on a balanced intake of dietary AAs, and in particular in EAA, a protein can only be synthesized if all the AAs which compose it are available in sufficient quantity. The ability to supply EAAs at a level sufficient to cover nutritional needs, which therefore requires precise data on the needs in each EAA. Therefore, FAO recommended to consider AA as individual nutrients (FAO 2011). However, until now, the determination of protein and amino-acid requirement remain a major goal of nutrition.

Different work has focused on the development of a method to measure EAA requirements. First, proteins (by AA) are the main nitrogen-contained compounds in the diet and the body. Thus, the body need can be seen as the nitrogen retention of the intakes and the needs were assessed using nitrogen balance method (. FAO, WHO, UNU, 1985). This method consists in making the difference between nitrogen inputs and losses (urinary, faecal, and others) (Rand and Young, 1999; Young and Marchini, 1990). However, this method presents some limits to determine EAA requirements because of the underestimation of losses and overestimation of intake and a low number of subjects in each study (Kurpad and Thomas, 2011). Alternative methods have therefore been proposed, using isotopic tracers. The first one is the direct AA oxidation, based on the labelling of the carbon-13 test AA that is perfused on the subject and on the measure of oxidative losses in the form of CO₂ during fasting state and fed state (Young

et al., 1989). The second one is the indicator AA oxidation method, measuring the oxidation of indicator AA, usually phenylalanine, depending on the level of intake of EAA studied (Pencharz and Ball, 2003; Young et al., 1989).

However, these different methods provide a wide range of EAA requirement values. Data of EAA requirement obtained with isotopic methods are superior to data determined with nitrogen balance (WHO/FAO/UNU, 1985). According to EAA, the results obtained are more or less divergent. In the case of lysine, the requirement estimated with the indicator AA oxidation method is almost four times higher than that estimated with the nitrogen balance (45 mg/kg/d vs 12 mg/kg/d) (WHO/FAO/UNU, 2007). This wide range of needs estimation does not allow for the determination of inter-individual variability and therefore to define nutritional recommendations. In order to clarify this requirement, FAO has established different characteristics to develop new methods. These characteristics are as follows: methods directly applicable to humans, in different physio-pathological conditions, applicable to each EAA, minimally invasive and with a reasonable cost (FAO/WHO/UNU, 2013). The emergence of new technologies and “omics” sciences, as metabolomics, seem to hold promise for developing a new method of measuring the requirement for AA.

The aim of this study was to determine biomarkers in plasma and urine of EAA and protein sufficiency using a model of growing rats fed with low protein/AA diet during three weeks,. The hypothesis was that AA deficiency will induce an increase in the enzymatic systems of catabolism of other AA inducing the production of degradation metabolites in biological fluids that can disappeared when the protein intake reached the requirement and thus these metabolites can be used as a biomarkers.

2. Material and methods

2.1 Animals

The study was approved by the Regional Animal Care and Ethical Committee and the Minister of Research and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals (registration number: APAFIS#13436-2017122616504600).

Thirty-six male Wistar Han rats (HsdHan[®]: WIST, Envigo, France), aged of 3 weeks, weighing 50-55 g on arrival, were housed individually in the light and temperature-controlled animal facility of AgroParisTech (12-hour light/12-hour dark cycle, lights on from 00:00 to 12:00, 22°C). Rats were fed with a standard rat chow diet (Régime croquettes from Safe, 16.10% of

protein) during one week of adaptation before being switched to their experimental diet for three weeks.

2.2 Pellet preparation

Food pellets were prepared in the laboratory using powder manufactured at the “Atelier de préparation des aliments” (UPAE, INRA, Jouy en Josas, France). Powder and water were mixed to form a dough to prevent powder crumbling and to measure food intake. This dough was cut into pellets and left to dry for 3 days before being given to the rats. During these 3 days, the progressive loss of water was calculated to adjust the dry weight of the pellets.

2.3 Experimental design

After one week of adaptation to the laboratory conditions, the thirty-six rats were divided into six groups ($n = 6/\text{group}$) and were assigned one of the 6 isocaloric diets containing respectively 3, 5, 8, 12, 15 or 20% milk protein, noted P3, P5, P8, P12, P15 and P20 with P stands for protein (Table 1). Each day during 3 weeks, a calibrated meal of 4g (58.2 kJ) was given at 12:00 am (onset of the night period). This calibrated meal is given to train the rats to rapidly ingest a small amount of food. Ad libitum access to food and water was given between 12:30 am and 9:00 am the next day. Food intake and body weight were measured daily during three weeks. In the 3rd week, each rat was placed during 48h in metabolic cage (24h of adaptation and 24h of measurement) to collect urine for metabolomics analysis.

At the end of the study, at 11:00, the rats were fed with 4-gram pellet (58.2 kJ) of their test-diet, to standardize the energy intake, and two hours later, they were anesthetized with Isoflurane. Blood was taken from the portal vein and from the vena cava. The blood samples were collected on heparin, centrifuged (4°C, 3000 rpm, 10 min) and plasma was stored at -80°C until metabolomics analysis. Thereafter, body composition was analyzed by dissection and weighing of the main tissues and organs.

2.4 Urine sampling

During 24h of measurement, rats were housed individually in metabolic cages. These metabolic cages have a perforated bottom for the collection and separation of urine and feces. Feces and urine pass through a collection funnel and are both separated and collected in two different tubes. The cages are equipped with feeding bowls and bottles, and the rats were fed ad libitum with their respective diets.

2.5 Metabolomics sample preparation and liquid-Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) analysis of urine and plasma

Plasma and urine samples were analyzed by LC-HRMS on two different columns: C18 and HILIC. The acquisitions were made in positive and negative mode in order to be as exhaustive as possible. Four result matrices were therefore obtained before being compiled. The following workflow was applied to all samples:

On C18 column, samples were analyzed during 16 minutes gradient with solvent A and B, H₂O and 0.1% formic acid; and acetonitrile and 0.1% formic acid, respectively.

On HILIC column, samples were analyzed during 27 minutes gradient with solvent A and B, 16 mM ammonium formate; and acetonitrile and 0.1% formic acid, respectively.

All samples were analyzed in FullScan and some were also analyzed in MS/MS to facilitate the annotation of compounds. A pool of all samples was injected every 5 samples to correct instrumental variation during the assay sequence.

Data extraction were made by XCMS from raw data acquired in FullScan. Data were cleaned with visual verification of EIC (Extracted Ion Chromatogram) and variables present in the benches and of poorly integrated or very noisy peaks were removed. Data were normalized to pools injected every 5 samples with Van Der Kloet normalization using R scripts. Variables with coefficients of variation greater than 30% in the pools were removed. Finally, the selected variables were matched with the internal database of the laboratory.

2.6 LC-MS data processing and analysis

The collected data were separated into three data sets, containing the Mass Spectra of (1) the urine samples (*Urine* data set), (2) the portal vein samples (*VP* data set) and (3) the vena cava data set (*VC* data set), and 3 matrices, of respective dimensions 36×245 , 36×141 , and 36×141 were obtained. They were first pretreated, before applying multivariate analysis methods.

2.6.1 Data pretreatment

The Mass Spectra were first pretreated with the Probabilistic Quotient Normalisation method (PQN) (Dieterle et al., 2006), using the median signal as a reference vector. PQN is a normalization method enabling to reduce uncontrolled variations due to instrumental factors in the signals. Pareto scaling (van den Berg et al., 2006) was then applied to the normalized data. Pareto scaling is a pretreatment method where the intensity of each centered m/z variable is divided by the square root of its standard deviation, what enables to give more weight to small-intensity variables which are potentially significant. Multivariate analysis methods were then applied to the pretreated data.

2.6.2 Development of a multivariate model

The chemometrical data analysis carried out in metabolomics is usually based on qualitative models, *i.e.*, one wants to check whether the presence or absence of a nutriment, for example, has an influence on the metabolome. This can be analyzed either by unsupervised methods, such as Principal Components Analysis (PCA) (Wold et al., 1987), or by supervised methods, such as Partial Least Squares for Discriminant Analysis (PLS-DA) (Ballabio and Consonni, 2013). However, a range of ingested protein concentration being available in the present study, it was found interesting to check whether a pertinent quantitative model between the mass spectra and the corresponding concentrations could be obtained. Therefore, both a quantitative and a qualitative models were calculated. The quantitative model used in this study was Partial Least Squares (PLS) regression (Geladi and Kowalski, 1986). As to the qualitative model, a novel method was developed recently, which consists of a supervised version of Independent Component Analysis (ICA) (Jouan-Rimbaud Bouveresse and Rutledge, 2016), called Independent Component-Discriminant Analysis (ICDA) (Habchi et al., 2017). It has been shown to perform at least as well as PLS-DA, but has the additional advantage of simplifying interpretation of the obtained factors, and was hence used in this study.

2.6.2.1 PLS

PLS is a multivariate quantitative analysis, which relates one vector, denoted as $\mathbf{y}$ (here, the concentration of ingested proteins) to a matrix denoted as $\mathbf{X}$ (here the mass spectra) by calculating the parameters of a linear model. The idea underlying the use of a quantitative method in this metabolomic study is as follows: one wants to check whether a low-protein diet has an impact on the metabolome. Since different concentrations of proteins are available, this influence, if it exists, is likely to be dependent on the amount of ingested proteins. This can be checked by applying a quantitative model such as PLS. The calculation of a PLS model implies the determination of new variables, called Latent Variables (LVs), which are linear combinations of the original variables (the pretreated m/z), having several interesting properties: 1) they are orthogonal, and 2) they are sorted in decreasing amount of covariance between $\mathbf{X}$ and $\mathbf{y}$. Therefore, the first A LVs contain systematic variation due to information relating the two matrices, and are important for the model, while the latter LVs are related to random variation due to noise, and should not be included in the model. One important factor in the construction of a PLS model is the determination of the number A of LVs to include in the model. In the present study, due to the relatively small number of analyzed samples, this was achieved by cross-

validation. Once the optimal number of LVs is obtained, the final model can be constructed. The regression coefficients can then be used as indicators of the original variables importance.

2.6.2.2 ICDA

ICDA is a method deriving from Independent Components Analysis (ICA). In order to apply ICA, one has to assume that the experimental data are equal to a linear combination of pure component signals. With only the experimental data at hand, ICA aims at finding both the pure sources as well as the proportions of these sources in each of the experimental signals. The pure components are obtained in a so-called "Signal matrix" (equivalent to the Loadings matrix in PCA), while the proportions are obtained in a "Proportions matrix" (equivalent to the Scores matrix in PCA). The ICDA method combines the power of ICA to obtain pure interpretable component with the inclusion of information about the samples in the model in order to orient the ICs towards discrimination. This method has been successfully used in a number of studies (Habchi et al., 2017; Khodorova et al., 2019). Here it has been applied by splitting the samples into 3 groups: 1) very low protein concentrations (3 and 5%); 2) low protein concentration (8 and 12 %); and 3) normal protein concentration (15 and 20%). The use of three groups rather than 6 groups (one per concentration) has been made after a careful data inspection, where it could be seen that 3 groups were likely to yield a better discrimination than 6 groups. A schematic presentation of ICDA is presented in Figure xx.

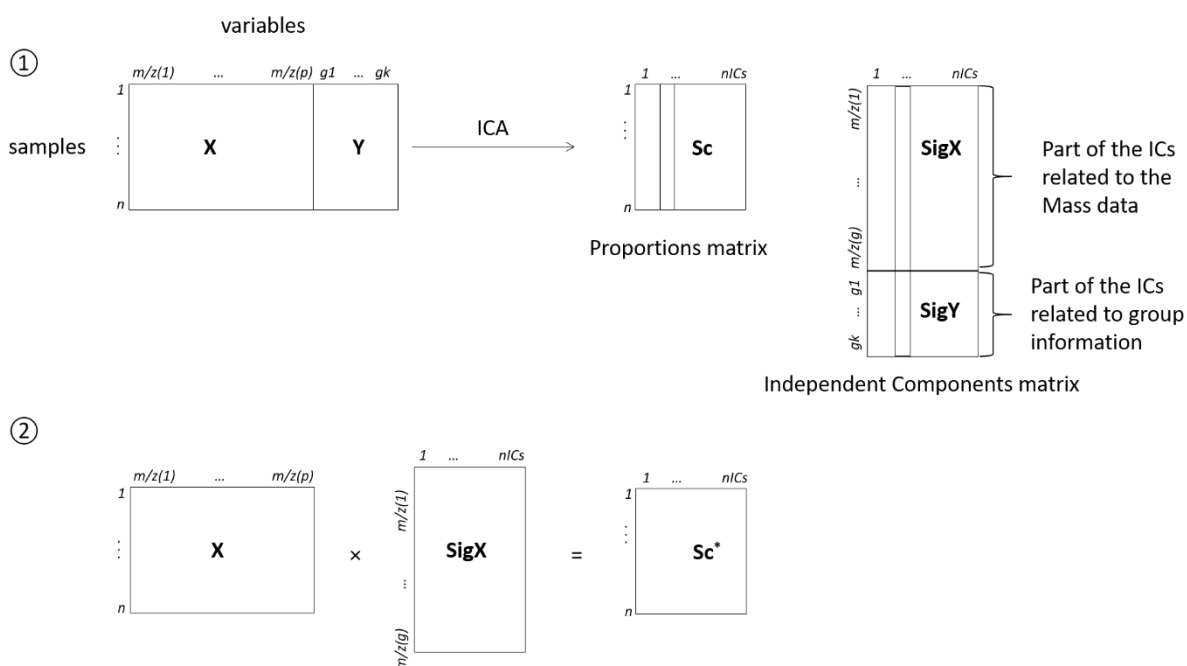


Figure 1 – Schematic representation of ICDA. *X* is the matrix of mass spectra; *Y* is the group information matrix (there are as many columns as groups, and for each group, there is a 0 value if the corresponding sample does not belong to this group, and a 1 if it does).

In the first step, the **X** and **Y** matrices are concatenated, and an ICA model is calculated on the obtained matrix. As explained earlier, ICA yields two matrices, namely a Proportion matrix and a Signal matrix: A signals are calculated (on the columns of the Signal matrix). Investigation of the Proportions on each IC can help detecting those ICs which are discriminating one group *versus* the others. The starting matrix being a concatenation of two matrices, the Signal matrix can also be considered as the concatenation of two "sub-signal" matrices **SigX** and **SigY**. Investigation of the variables with high intensities (in absolute value) on a discriminating IC in **SigX** helps detecting the important original (m/Z) variables. Investigation of the variables with a high intensity in **SigY** helps to find out which group is discriminated by the corresponding IC, what can also be seen on the Proportions plots. Yet these proportions have been calculated by using both the information from **X** and from **Y**, and it is highly probable that the information in **Y** enhances the observed discrimination. Therefore, in step 2, new proportions are calculated, by projecting the **X** matrix only on the **SigX** signals, *i.e.*, by using only the information from the mass spectra. The new proportions obtained are more realistic; they can be plotted, and if a discrimination can still be observed, it means that there is information in the (urine or plasma) samples which is related to the amount of ingested proteins.

2.6.4 Analysis by univariate ANOVA model for discriminant metabolites

Statistically, LC-HRMS matrix were analyzed, firstly, with multivariate methods such as ICDA and PLS, in order to determine a set of discriminant molecules. In order to determine if some biomarkers could signify AA deficiency on their own, we performed a second univariate statistical test, an ANOVA. This test was used on each discriminant molecules find with multivariate methods to see if there is a difference between groups, and if this molecules could act as a marker of AA deficiency.

For each discriminant metabolites identified by PLS or ICDA, the effects of the diets were tested by one-way ANOVA using R[®] software. Pairwise comparisons were performed with Post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

Plasma (portal vein and vena cava) and urine samples were analyzed using LC-HRMS, and the MS data obtained were pretreated and analyzed using PLS and ICDA method.

3.1. Urinary and plasma biomarkers obtained with PLS method

In urine, portal vein and vena cava samples, the six protein groups (P3, P5, P8, P12, P15 and P20) were separated along LV1 (Fig. 1). The S-Plot and QQ-plot were used to select the most relevant variables for the separation of groups. The selection of discriminant variables was based on correlations and covariance in the S-plots, and contributions to the LV which are greater than ± 1 , 2 and 3 standard deviation of all the contributions to each component in the QQ-plots.

For urine samples, PLS method revealed that forty-two features were associated with the consumed diets. After using an ANOVA test, twenty-four molecules were considered to have different intensities according to group membership. The details on each feature are reported in Table 2. Among these molecules, eleven had their intensities decrease when the percentage of protein in the diet increased (which means that these biomarkers are less present when the protein intake increases), namely 3-methyl-2-oxovalerate, 4-methyl-2-oxovaleric acid, azelate, creatine, D-mannose, D-raffinose, galactose, phosphoric acid, pyridoxine, raffinose and succinic acid; while twelve others compounds had their intensities increase when percentage of protein increased, *namely* anthranilate, cadaverine, homogentisic acid, isovaleroylglycine, kynurenic acid, L-gulonolactone, n-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, pipercolate, uracil, xanthurenate indoxyl sulfate and putrescine). One other compound was group specific, *namely* pantothenate. This indicate that its concentration is not linear and does not depend on the percentage of protein. This molecule is decreased from P5 to P20, but P3 is not different from P12, P15 and P20.

For plasma portal vein samples, nineteen discriminant molecules were observed between groups. After ANOVA test, sixteen variables were significantly different between groups. Among these molecules, eight decreased in intensity when percentage of protein intake increased, *namely* betaine, fucose, lysoPC (18:0), l-carnitine, l-histidine, l-serine, malate and o-acetyl-carnitine, while eight increased in intensity when protein in diet increased, *namely* L-methionine, L-phenylalanine, L-threonine, L-tyrosine, n-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, taurocholic acid, taurocholic acid sodium salt hydrate and tryptophan.

For plasma vena cava, twenty-two discriminant molecules were observed between groups. Fifteen molecules were statistically significant after ANOVA test. Eight molecules decreased in intensity when protein intake increased, *namely* 2-hydroxyisocaproic acid, betaine, fucose, lysoPC (18:0), l-histidine, l-ornithine, l-serine and malate. On the contrary, seven other molecules increased in intensity when protein intake increased, *i.e.* 3-isopropylmalic acid, l-lysine, l-methionine, l-phenylalanine, l-threonine, l-tyrosine, n-methyl-2-pyridone-5-carboxamide.

3.2 Urinary and plasma biomarkers obtained with ICDA method

In urine, plasma portal vein and vena cava, 3 different diet groups (very low protein, 3 and 5%; low protein, 8 and 12%, and normal protein diet, 15 and 20%) were separated along IC1 and IC2 (Fig. 2), after source signal extraction by ICDA based on 3 groups, from the data obtained by LC-HRMS. Similarly to what was done after PLS modelling, the S-Plot and QQ-plot were used to select the most relevant variables for the separation of groups. The selection of discriminant variables was based on correlations and covariance on S-plots, and on contributions to the IC which are greater than ± 1 , 2 and 3 standard deviation of all the contributions to each component in QQ-plots.

For urine samples, ICDA method revealed that fifty-four features were associated with the consumed diets. After ANOVA test, a total of thirty-five variables were considered statistically different between groups. The detailed on each feature is reported in Table 2. Among these variables, sixteen metabolites, namely, 4-pyridoxate, anthranilate, cadaverine, homogentisic acid, indoxyl sulfate, isovaleoylglycine, kynurenic acid, l-gulonolactone, l-leucine, n-acetylputrescine, n-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, pipecolate, putrescine, spermidine, uracil and xanthurenate were up-regulated when the percentage of protein increased. Eighteen metabolites, namely, 3-methyl-2-oxovalerate, 4-methyl-2-oxovaleric acid, alpha d-glucose, azelate, d-mannose, d-raffinose, galactitol, galactose, iso-maltose, l-carnitine, pantothenate, phosphoric acid, proline-leucine, pyridoxine, raffinose, succinic acid, sucrose and creatine, were down regulated when protein in the diet increased. One metabolite, tyramine, was group specific, decreased in P3, P5, increased in P8, P12 and again declined in P15, P20.

For plasma portal vein, thirty variables were found significant between groups with ICDA analysis. After ANOVA test, twenty-two variables were discriminant. Eleven metabolites increased in intensity when the percentage of protein in the diet increased, as indoxyl sulfate, l-lysine, l-methionine, l-phenylalanine, l-threonine, l-tyrosine, n-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, taurocholic acid, taurocholic acid sodium salt hydrate, tryptophan and l-valine. Eleven other metabolites decreased in intensity when the protein in the diet decreased, as betaine, fucose, lysoPC (18:0), l-carnitine, l-histidine, l-serine, o-acetyl-carnitine, pyroglutamate, l-ornithine, l-arginine and citrulline.

Finally, for plasma vena cava, thirty-four variables were revealed by ICDA. After ANOVA, nineteen molecules remained statically different between groups. On the one hand, nine variables increased in intensity when the percentage of protein in the diet increased, namely, l-leucine, l-lysine, l-methionine, l-phenylalanine, l-threonine, l-tyrosine, n-acetylserotonin, n-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, and tryptophan. On the other hand, ten variables decreased in

intensity when the protein in the diet decreased, *namely* betaine, fucose, lysoPC (16:0), lysoPC (18:0), L-arginine, L-glutamine, L-histidine, L-ornithine, L-serine, and malate.

4. Discussion

This study addressed the consequences of three weeks of protein restriction on plasma and 24-hour urine markers of protein deficiency. These metabolomics analyses revealed that protein restriction caused observable perturbation to the plasma and urinary metabolic profiles of rats. In response to a protein deficient diet, several adaptive mechanisms were set up.

Plasma and urine metabolomics analysis revealed an impact on AA metabolism. First of all, low protein diet (3% and 5% of protein) induced a decrease in the concentrations of most EAA in portal vein (L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-threonine, tryptophan and L-valine), in vena cava (L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-threonine) and L-leucine in urine. Portal vein being the reflection of food intake, the low protein diet led to a decrease in EAA (Horiuchi et al., 2017; Qiu et al., 2016). The same profile was found in vena cava. In contrary to the other EAA, L-histidine is increased in portal vein and vena cava under protein restriction which is consistent with the findings reported by Torres and its colleagues (Torres et al., 1999). They have shown that serum histidine concentration was inversely proportional to the protein content of the diet. They have highlighted that there is a low activity of histidase, enzyme that catalyzes the deamination of L-histidine to *trans*-urocanic acid, under low protein diet (Torres et al., 1998). This increase in histidine could be also due to an increase in protein catabolism with a higher degradation of proteins containing high concentration of histidine (Mercer et al., 1989). The elevated creatine in restricted rat's urine suggested an increase in muscle breakdown. The protein intake does not cover protein needs, thus muscle protein were mobilized. Others proteinogenic AA, L-ornithine and L-serine, were increased in plasma under protein restriction which can be explained by the increase in protein catabolism. A similar increase in serine plasmatic was found in rats fed protein or amino acid restriction diet (Adibi et al., 1973; Kalhan et al., 2011; Nagao et al., 2009). Kalhan and its colleagues have shown that the increase in serine concentration was due to an increase in *de novo* synthesis with an increase in enzymes involved in serine biosynthesis in liver (Kalhan et al., 2011). Serine is a precursor of several molecules as AA, lipids or ceramides whose demand could be increased in case of protein restriction.

Our results have shown that protein restriction diets induced an increase in the enzymatic systems of catabolism of certain AA inducing the production of degradation metabolites found in

plasma and urine. Notably, tryptophan pathway was impacted by protein restriction. Indoxyl sulfate, produced from tryptophan by intestinal bacteria (Watanabe et al., 2017) were decreased in portal vein and urine, and n-acetyl-serotonine were decreased in vena cava. It has been already reported that plasma and urine indoxyl sulfate was decreased in response to threonine deficient diet in the case of caloric restriction (Green et al., 2019). Tryptophan metabolism is connected to nicotinamide metabolism that is impacted by protein deficiency. Kimura et al., and Shibata et al., have reported that excretion of nicotinamide metabolites, as N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide (2-Py), in plasma and urine has been modified by protein status (Kimura et al., 2006; Shibata et al., 1991). Shibata and al. have shown that rats fed with inadequate AA diets reveal an increase in N-methylnicotinamide (MNA) and a decrease in urinary 2-Py and 4-Py (N-methyl-4-pyridone-3-carboxamide). In our case, MNA and 4-Py were not found in plasma nor urine. The decrease of 2-Py and 4-Py seems to be the result of a decrease in the activity of 2-Py-forming and 4-Py forming MNA oxidase. The excretion ratio of (2-Py + 4-Py)/MNA has been used as a marker of amino acid adequacy in rats (Shibata et al., 1991). Thus, the modification of 2-Py in our study will more likely reflects the protein deficiency.

Lysine degradation pathway was also impacted by protein deficient diet. L-carnitine and o-acetyl-l-carnitine hydrochloride was inversely correlated to protein deficiency. While, other metabolites as cadaverine and pipecolate were decreased when protein decrease in the diet.

In addition to the impact of protein restriction on AA metabolism, enterohepatic cycle of bile acids was modified by protein deficiency. Betaine was decreased when protein increase in the diet in portal vein and vena cava. Moreover, conjugated bile acids such as taurocholic acid and taurocholic acid sodium salt hydrate were decreased in portal vein when protein decrease in the diet. Some studies were interested in the effects of protein on plasma bile acids. An intervention study on 10 volunteers has shown that high-fat, high-protein diet increases plasma concentration of some bile acids (deoxycholic acid, chenodeoxycholic acid and cholic acid), compared to control and high-fat, low-protein diet (Bortolotti et al., 2009). However, another study on 16 healthy human subject fed with a diet composed with carbohydrates, or proteins, or lipids with equal total caloric content, has reported an increase in plasma total bile acid levels only after a diet composed with lipid compared to carbohydrate or protein diet (Morton et al., 2014).

Krebs cycle intermediates are increased with low protein diet, as malate in plasma and succinic acid in urine. Other studies based on the effect of protein-energy malnourished rats have shown that there is a decrease in Krebs cycle intermediate. This difference is probably due to the energy deficiency (Bollard et al., 2005; Wu et al., 2010).

The last group of markers found in urine correspond to monosaccharides. In our study, protein deficiency is made at the expense of carbohydrates. Low protein diet was high in carbohydrates compared to normal protein diet. This increase in carbohydrates in the low protein diet resulted in an increase in carbohydrates in the urine, where different monosaccharides were found, as glucose, raffinose, galactose, sucrose, mannose and isomaltose.

The metabolomic profile of portal vein is very close to that of the vena cava. The same EAA, Krebs cycle intermediate and metabolic products of nicotinamide adenine dinucleotide degradation were found in the portal and vena cava plasma. Only certain AA degradation metabolites differ between portal vein and vena cava. The comparison of metabolomics profile between plasma and urine indicate that most of the metabolites present in the plasma were found in urine. Thus the urinary metabolome seems sufficient to determine biomarkers of AA sufficiency. Moreover, the FAO recommends the use of a non-invasive method to measure AA requirement. Urine collection would thus be a simple to implement and non-invasive method that could be easily used to measure requirement in fragile populations (children, elderly) or in developing countries where malnutrition is significant.

In summary, this study has shown that AA deficient diets have an important impact on the metabolism of growing rats. Metabolomics analysis provides different biomarkers that could be used to determine protein and AA deficiency. These metabolites could be interesting candidates. Further research will be necessary to validate these markers, and it would be interesting to study whether some biomarkers may be specific for the deficiency of a certain type of AA.

Acknowledgments

We thank Morgane Dufay who took care of the animals and metabolomics platform BIOMET for metabolomics analysis.

References

- Adibi, S.A., Modesto, T.A., Morse, E.L., and Amin, P.M. (1973). Amino acid levels in plasma, liver, and skeletal muscle during protein deprivation. *Am. J. Physiol.* 225, 408–414.
- AFSSA (2007). Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Aparecida de França, S., Dos Santos, M.P., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C., Kettelhut, I. do C., Lopes, C.F., and Kawashita, N.H. (2009). Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 25, 1186–1192.
- Arch, J.R.S., Hislop, D., Wang, S.J.Y., and Speakman, J.R. (2006). Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)* 30, 1322–1331.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437.

- Ballabio, D., and Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* 5, 3790–3798.
- Beck, B., Dollet, J.-M., and Max, J.-P. (1989). Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: Effects on food intake and body weight in rats. *Physiology & Behavior* 45, 761–765.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., and van der Werf, M.J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142.
- Blais, A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Tomé, D., and Even, P.C. (2018). Low-protein diet-induced hyperphagia and adiposity are modulated through interactions involving thermoregulation, motor activity, and protein quality in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314, E139–E151.
- Bollard, M.E., Stanley, E.G., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2005). NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed* 18, 143–162.
- Bortolotti, M., Kreis, R., Debard, C., Cariou, B., Faeh, D., Chetiveaux, M., Ith, M., Vermathen, P., Stefanoni, N., Lê, K.-A., et al. (2009). High protein intake reduces intrahepatocellular lipid deposition in humans. *Am J Clin Nutr* 90, 1002–1010.
- Boutry, C., Bos, C., and Tomé, D. (2008). Les besoins en acides aminés. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 22, 151–160.
- Carbone, J.W., McClung, J.P., and Pasiakos, S.M. (2019). Recent Advances in the Characterization of Skeletal Muscle and Whole-Body Protein Responses to Dietary Protein and Exercise during Negative Energy Balance. *Adv Nutr* 10, 70–79.
- Chalvon-Demersay, T., Even, P.C., Tomé, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., and Azzout-Marniche, D. (2016). Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 36, 60–67.
- Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Blais, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Gaudichon, C., and Even, P.C. (2019). Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 316, R486–R501.
- Davis, A.T., Kruggel, E.M., and Randall, S. (1993). Excess Dietary Lysine Increases Skeletal Muscle and Plasma Trimethyllysine in Rats. *J Nutr* 123, 1109–1116.
- De Sousa-Coelho, A.L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* 443, 165–171.
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., and Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabolomics. *Anal. Chem.* 78, 4281–4290.
- Du, F., Higginbotham, D.A., and White, B.D. (2000). Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* 130, 514–521.
- Dunstan, R.H., Sparkes, D.L., Macdonald, M.M., De Jonge, X.J., Dascombe, B.J., Gottfries, J., Gottfries, C.-G., and Roberts, T.K. (2017). Diverse characteristics of the urinary excretion of amino acids in humans and the use of amino acid supplementation to reduce fatigue and sub-health in adults. *Nutr J* 16.
- Even, P.C., and Nadkarni, N.A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303, R459–R476.
- Even, P.C., Bertin, E., Gangnerau, M.-N., Roseau, S., Tome, D., and Portha, B. (2003). Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R751–759.
- FAO/WHO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (World Health Organization).
- FAO/WHO/UNU (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March–2 April, 2011, Auckland, New Zealand.
- Fedry, J., Blais, A., Even, P.C., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Azzout-Marniche, D., and Tomé, D. (2016). Urinary metabolic profile predicts high-fat diet sensitivity in the C57Bl6/J mouse. *J. Nutr. Biochem.* 31, 88–97.
- Fischer, L.M., daCosta, K.A., Kwock, L., Stewart, P.W., Lu, T.-S., Stabler, S.P., Allen, R.H., and Zeisel, S.H. (2007). Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1275–1285.
- Fischer, L.M., da Costa, K.-A., Kwock, L., Galanko, J., and Zeisel, S.H. (2010). Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *Am J Clin Nutr* 92, 1113–1119.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 223–241.

- Fisher, M., Ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol Endocrinol* 24, 2050–2064.
- de França, S.A., dos Santos, M.P., Przygodda, F., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Magalhães, D.A., Bezerra, K.S., Colodel, E.M., Flouris, A.D., Andrade, C.M.B., et al. (2016). A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. *Lipids* 51, 303–310.
- Geladi, P., and Kowalski, B.R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* 185, 1–17.
- Geller, S., Arribat, Y., Netzhualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Amati, F., Lopez-Mejia, I.C., and Pellerin, L. (2019). Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism* 30, 833–844.e7.
- Green, C.L., Soltow, Q.A., Mitchell, S.E., Deros, D., Wang, Y., Chen, L., Han, J.-D.J., Promislow, D.E.L., Lusseau, D., Douglas, A., et al. (2019). The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction: XIII. Global Metabolomics Screen Reveals Graded Changes in Circulating Amino Acids, Vitamins, and Bile Acids in the Plasma of C57BL/6 Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 74, 16–26.
- Habchi, B., Alves, S., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Moslah, B., Paris, A., Lécluse, Y., Gauduchon, P., Lebaillly, P., Rutledge, D.N., and Rathahao-Paris, E. (2017). An innovative chemometric method for processing direct introduction high resolution mass spectrometry metabolomic data: independent component–discriminant analysis (IC–DA). *Metabolomics* 13, 45.
- Hawkins, W.B., Hanson, P.C., Coon, R.W., and Terry, R. (1949). BILE SALT METABOLISM AS INFLUENCED BY PURE AMINO ACIDS AND CASEIN DIGESTS. *J Exp Med* 90, 461–473.
- Hill, C.M., Laeger, T., Albarado, D.C., McDougal, D.H., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2017). Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. *Sci Rep* 7.
- Hill, C.M., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2018). Homeostatic sensing of dietary protein restriction: A case for FGF21. *Frontiers in Neuroendocrinology* 51, 125–131.
- Hill, C.M., Laeger, T., Dehner, M., Albarado, D.C., Clarke, B., Wanders, D., Burke, S.J., Collier, J.J., Qualls-Creekmore, E., Solon-Biet, S.M., et al. (2019). FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism. *Cell Rep* 27, 2934–2947.e3.
- Hillebrand, J.J.G., de Wied, D., and Adan, R.A.H. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23, 2283–2306.
- von Holstein-Rathlou, S., BonDurant, L., Peltekian, L., Naber, M.C., Yin, T.C., Claflin, K.E., Urizar, A.I., Madsen, A.N., Ratner, C., Holst, B., et al. (2016). FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab* 23, 335–343.
- Horiuchi, M., Takeda, T., Takanashi, H., Ozaki-Masuzawa, Y., Taguchi, Y., Toyoshima, Y., Otani, L., Kato, H., Sone-Yonezawa, M., Hakuno, F., et al. (2017). Branched-chain amino acid supplementation restores reduced insulinotropic activity of a low-protein diet through the vagus nerve in rats. *Nutr Metab (Lond)* 14.
- Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., and Rutledge, D.N. (2016). Chapter 7 - Independent Components Analysis: Theory and Applications. In *Data Handling in Science and Technology*, C. Ruckebusch, ed. (Elsevier), pp. 225–277.
- Kalhan, S.C., Uppal, S.O., Moorman, J.L., Bennett, C., Gruca, L.L., Parimi, P.S., Dasarathy, S., Serre, D., and Hanson, R.W. (2011). Metabolic and Genomic Response to Dietary Isocaloric Protein Restriction in the Rat. *J Biol Chem* 286, 5266–5277.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115, 1627–1635.
- Khodorova, N.V., Rutledge, D.N., Oberli, M., Mathiron, D., Marcelo, P., Benamouzig, R., Tomé, D., Gaudichon, C., and Pilard, S. (2019). Urinary Metabolomics Profiles Associated to Bovine Meat Ingestion in Humans. *Mol Nutr Food Res* 63, e1700834.
- Kim, K.M., Henderson, G.N., Frye, R.F., Galloway, C.D., Brown, N.J., Segal, M.S., Imaram, W., Angerhofer, A., and Johnson, R.J. (2009). Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 65–70.
- Kimura, N., Fukuwatari, T., Sasaki, R., and Shibata, K. (2006). Comparison of Metabolic Fates of Nicotinamide, NAD⁺ and NADH Administered Orally and Intraperitoneally; Characterization of Oral NADH. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52, 142–148.

- Kurpad, A.V., and Thomas, T. (2011). Methods to assess amino acid requirements in humans. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14, 434–439.
- Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922.
- Laeger, T., Albarado, D.C., Burke, S.J., Trosclair, L., Hedgepeth, J.W., Berthoud, H.-R., Gettys, T.W., Collier, J.J., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2016). Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell Reports* 16, 707–716.
- Lakshmanan, F.L., Perera, W.D., Scrimshaw, N.S., and Young, V.R. (1976). Plasma and urinary amino acids and selected sulfur metabolites in young men fed a diet devoid of methionine and cystine. *Am J Clin Nutr* 29, 1367–1371.
- Lees, E.K., Król, E., Grant, L., Shearer, K., Wyse, C., Moncur, E., Bykowska, A.S., Mody, N., Gettys, T.W., and Delibegovic, M. (2014). Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell* 13, 817–827.
- Lehman, L.J., Olson, A.L., and Rebouche, C.J. (1987). Measurement of ϵ -N-trimethyllysine in human blood plasma and urine. *Analytical Biochemistry* 162, 137–142.
- Mai, K., Andres, J., Biedasek, K., Weicht, J., Bobbert, T., Sabath, M., Meinus, S., Reinecke, F., Möhlig, M., Weickert, M.O., et al. (2009). Free Fatty Acids Link Metabolism and Regulation of the Insulin-Sensitizing Fibroblast Growth Factor-21. *Diabetes* 58, 1532–1538.
- Maida, A., Zota, A., Sjøberg, K.A., Schumacher, J., Sijmonsma, T.P., Pfenninger, A., Christensen, M.M., Gantert, T., Fuhrmeister, J., Rothermel, U., et al. (2016). A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *J Clin Invest* 126, 3263–3278.
- Mercer, L.P., Dodds, S.J., Schweisthal, M.R., and Dunn, J.D. (1989). Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids. *J. Nutr.* 119, 66–74.
- Mercer, L.P., Kelley, D.S., Humphries, L.L., and Dunn, J.D. (1994). Manipulation of Central Nervous System Histamine or Histaminergic Receptors (H1) Affects Food Intake in Rats. *J Nutr* 124, 1029–1036.
- Meyer, J.H., and Hargus, W.A. (1959). Factors influencing food intake of rats fed low-protein rations. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 197, 1350–1352.
- Morton, G.J., Kaiyala, K.J., Foster-Schubert, K.E., Cummings, D.E., and Schwartz, M.W. (2014). Carbohydrate Feeding Dissociates the Postprandial FGF19 Response From Circulating Bile Acid Levels in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E241–E245.
- Nagao, K., Bannai, M., Seki, S., Mori, M., and Takahashi, M. (2009). Adaptational modification of serine and threonine metabolism in the liver to essential amino acid deficiency in rats. *Amino Acids* 36, 555–562.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995). *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,: Fourth Revised Edition, 1995.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases with accession numbers AB021975 and AB025718. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492, 203–206.
- Ortega-Prieto, P., and Postic, C. (2019). Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet* 10.
- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab.* 20, 670–677.
- Pencharz, P.B., and Ball, R.O. (2003). Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 101–116.
- Pezeshki, A., Zapata, R.C., Singh, A., Yee, N.J., and Chelikani, P.K. (2016). Low protein diets produce divergent effects on energy balance. *Sci Rep* 6, 25145.
- Pissios, P., Hong, S., Kennedy, A.R., Prasad, D., Liu, F.-F., and Maratos-Flier, E. (2013). Methionine and choline regulate the metabolic phenotype of a ketogenic diet. *Mol Metab* 2, 306–313.
- Qiu, K., Qin, C.F., Luo, M., Zhang, X., Sun, W.J., Jiao, N., Li, D.F., and Yin, J.D. (2016). Protein Restriction with Amino Acid-Balanced Diets Shrinks Circulating Pool Size of Amino Acid by Decreasing Expression of Specific Transporters in the Small Intestine. *PLoS One* 11.
- Rana, S.K., and Sanders, T.A. (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *Br J Nutr* 56, 17–27.
- Rand, W.M., and Young, V.R. (1999). Statistical analysis of nitrogen balance data with reference to the lysine requirement in adults. *J. Nutr.* 129, 1920–1926.
- Reeds, P.J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* 130, 1835S–40S.

- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939–1951.
- Restelli, L.M., Oettinghaus, B., Halliday, M., Agca, C., Licci, M., Sironi, L., Savoia, C., Hench, J., Tolnay, M., Neutzner, A., et al. (2018). Neuronal Mitochondrial Dysfunction Activates the Integrated Stress Response to Induce Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Rep* 24, 1407–1414.
- Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7, 22–39.
- Rose, W. (1957). The amino acid requirement of adult men. *Nutr Abstr Rev* 27, 631–647.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J., and Tyzbit, R.S. (1982). Energy Balance and Mitochondrial Function in Liver and Brown Fat of Rats Fed “Cafeteria” Diets of Varying Protein Content. *J Nutr* 112, 1663–1672.
- Santoso, P., Nakata, M., Shiizaki, K., Boyang, Z., Parmila, K., Otgon-Uul, Z., Hashimoto, K., Satoh, T., Mori, M., Kuro-O, M., et al. (2017). Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep* 7, 45819.
- Schaart, M.W., Schierbeek, H., van der Schoor, S.R.D., Stoll, B., Burrin, D.G., Reeds, P.J., and van Goudoever, J.B. (2005). Threonine Utilization Is High in the Intestine of Piglets. *J Nutr* 135, 765–770.
- Shibata, K., Shiotani, M., Onodera, M., and Suzuki, T. (1991). Effects of Protein-Free Diet Feeding or Starving on the Excretion Ratio of (*N*¹-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide + *N*¹-methyl-4-pyridone-3-carboxamide)/*N*¹-Methylnicotinamide. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1483–1490.
- Shimizu, N., Maruyama, T., Yoshikawa, N., Matsumiya, R., Ma, Y., Ito, N., Tasaka, Y., Kuribara-Souta, A., Miyata, K., Oike, Y., et al. (2015). A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat Commun* 6, 1–14.
- Solon-Biet, S.M., Cogger, V.C., Pulpitel, T., Heblinski, M., Wahl, D., McMahon, A.C., Warren, A., Durrant-Whyte, J., Walters, K.A., Krycer, J.R., et al. (2016). Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework. *Cell Metabolism* 24, 555–565.
- Specter, S.E., Hamilton, J.S., Stern, J.S., and Horwitz, B.A. (1995). Chronic Protein Restriction Does Not Alter Energetic Efficiency or Brown Adipose Tissue Thermogenic Capacity in Genetically Obese (fa/fa) Zucker Rats. *J Nutr* 125, 2183–2193.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., and Häring, H.-U. (2017). Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* 38, 468–488.
- Swick, R.W., and Gribskov, C.L. (1983). The effect of dietary protein levels on diet-induced thermogenesis in the rat. *J. Nutr.* 113, 2289–2294.
- Talukdar, S., Owen, B.M., Song, P., Hernandez, G., Zhang, Y., Zhou, Y., Scott, W.T., Paratala, B., Turner, T., Smith, A., et al. (2016). FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab.* 23, 344–349.
- Tomé, D., and Bos, C. (2007). Lysine Requirement through the Human Life Cycle. *J Nutr* 137, 1642S–1645S.
- Tomé, D., Chaumontet, C., Even, P.C., Darcel, N., Thornton, S.N., and Azzout-Marniche, D. (2020). Protein Status Modulates an Appetite for Protein To Maintain a Balanced Nutritional State—A Perspective View. *J. Agric. Food Chem.* 68, 1830–1836.
- Torres, N., Martínez, L., Alemán, G., Bourges, H., and Tovar, A.R. (1998). Histidase Expression Is Regulated by Dietary Protein at the Pretranslational Level in Rat Liver. *J Nutr* 128, 818–824.
- Torres, N., Beristain, L., Bourges, H., and Tovar, A.R. (1999). Histidine-imbalanced diets stimulate hepatic histidase gene expression in rats. *J. Nutr.* 129, 1979–1983.
- Véniant, M.M., Sivits, G., Helmering, J., Komorowski, R., Lee, J., Fan, W., Moyer, C., and Lloyd, D.J. (2015). Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* 21, 731–738.
- Vessey, D.A. (1978). The biochemical basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *Biochem J* 174, 621–626.
- Watanabe, K., Tominari, T., Hirata, M., Matsumoto, C., Hirata, J., Murphy, G., Nagase, H., Miyaura, C., and Inada, M. (2017). Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio* 7, 1178–1185.
- Webster, A.J.F. (1993). Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proceedings of the Nutrition Society* 52, 69–76.
- Weir, J.B.D.B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol. (Lond.)* 109, 1–9.
- White, B.D., Porter, M.H., and Martin, R.J. (2000). Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol. Behav.* 69, 383–389.
- WHO/FAO/UNU (1985). Energy and protein requirements. *World Health Organ Tech Rep Ser* 724, 1–206.
- WHO/FAO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1–265, back cover.

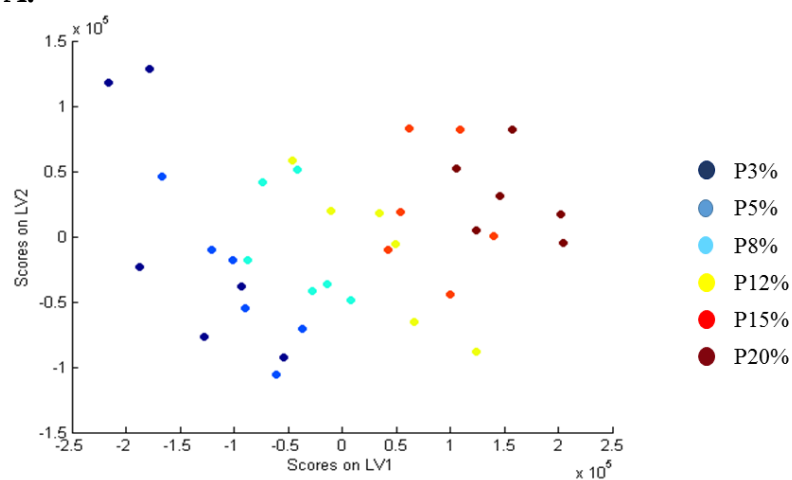
- Wold, S., Esbensen, K., and Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2, 37–52.
- Wu, Z., Li, M., Zhao, C., Zhou, J., Chang, Y., Li, X., Gao, P., Lu, X., Li, Y., and Xu, G. (2010). Urinary metabolomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Biosyst* 6, 2157–2163.
- Young, V.R., and Marchini, J.S. (1990). Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am J Clin Nutr* 51, 270–289.
- Young, V.R., Bier, D.M., and Pellett, P.L. (1989). A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 80–92.
- Zapata, R.C., Singh, A., Pezeshki, A., Avirineni, B.S., Patra, S., and Chelikani, P.K. (2019). Low-Protein Diets with Fixed Carbohydrate Content Promote Hyperphagia and Sympathetically Mediated Increase in Energy Expenditure. *Molecular Nutrition & Food Research* 63, 1900088.
- Zhao, X.-Q., Jørgensen, H., Gabert, V.M., and Eggum, B.O. (1996). Energy Metabolism and Protein Balance in Growing Rats Housed in 18°C or 28°C Environments and Fed Different Levels of Dietary Protein. *J Nutr* 126, 2036–2043.

Table 1. Macronutrient composition of diets. Diets were produced by the “Atelier de préparation des aliments”, UPAE, INRA, Jouy en Josas, France. (P stands for Protein)

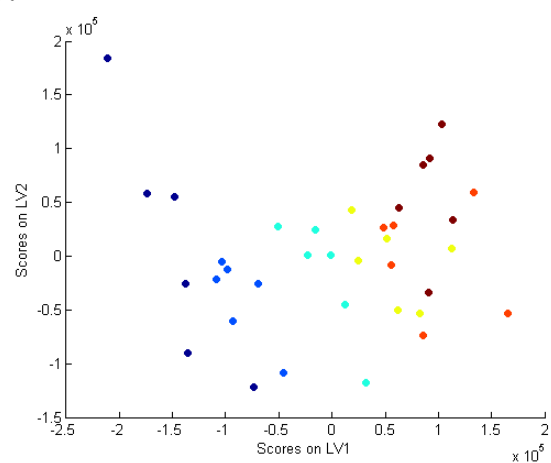
	P3	P5	P8	P12	P15	P20
Weight content (g/kg)						
Milk proteins	29	48	77	116	145	193.5
Corn Starch	717.9	701.5	676.6	643.1	618.1	576.4
Sucrose	115.8	113.2	109.1	103.6	99.6	92.8
Soy Oil	40	40	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50	50	50
Choline	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Energy content (%)						
Protein	3	5	8	12	15	20
Carbohydrate	86.6	84.6	81.6	77.6	74.6	69.5
Fat	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
Energy density (kJ/g)	14.54	14.55	14.55	14.56	14.56	14.57

Figure 1. PLS Analysis for the data obtained by LC-MS characterizing the discrimination of the predefined groups to discriminate protein content diet based on IC1 and IC2 in urine (A), portal vein (B) and vena cava (C).

A.



B.



C.

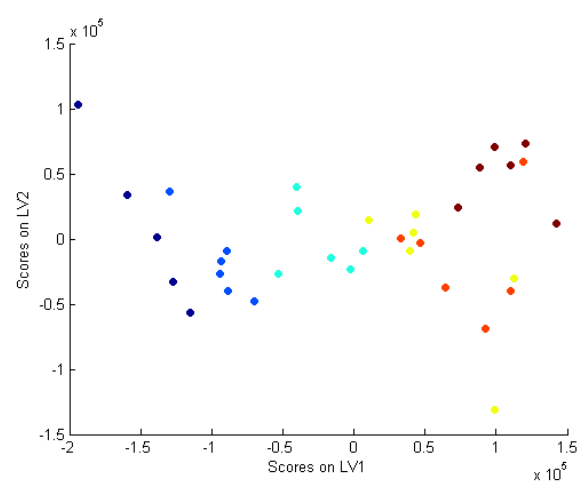
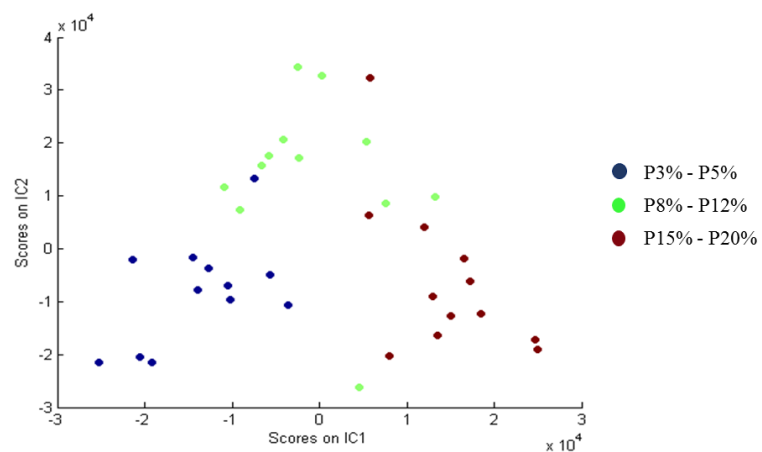
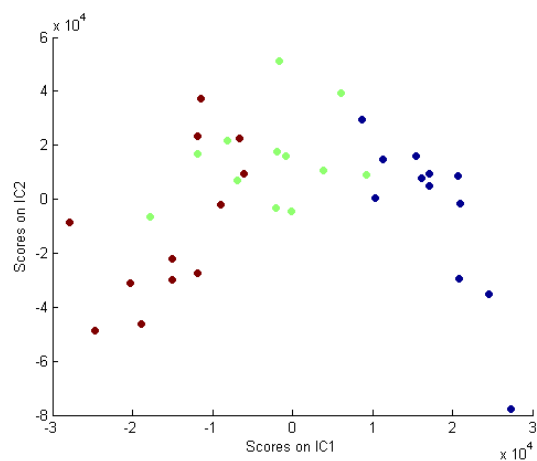


Figure 2. Independent Components-Discriminate Analysis proportions plot calculated after source signal extraction for the data obtained by LC-MS characterizing the discrimination of the predefined groups to discriminate protein content diet based on IC1 and IC2 in urine (A), portal vein (B) and vena cava (C).

A.



B.



C.

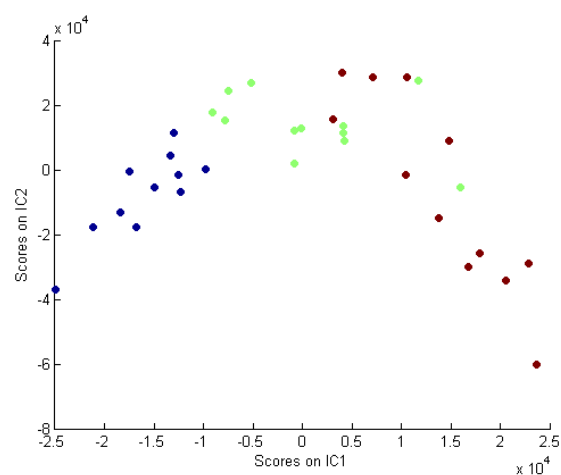
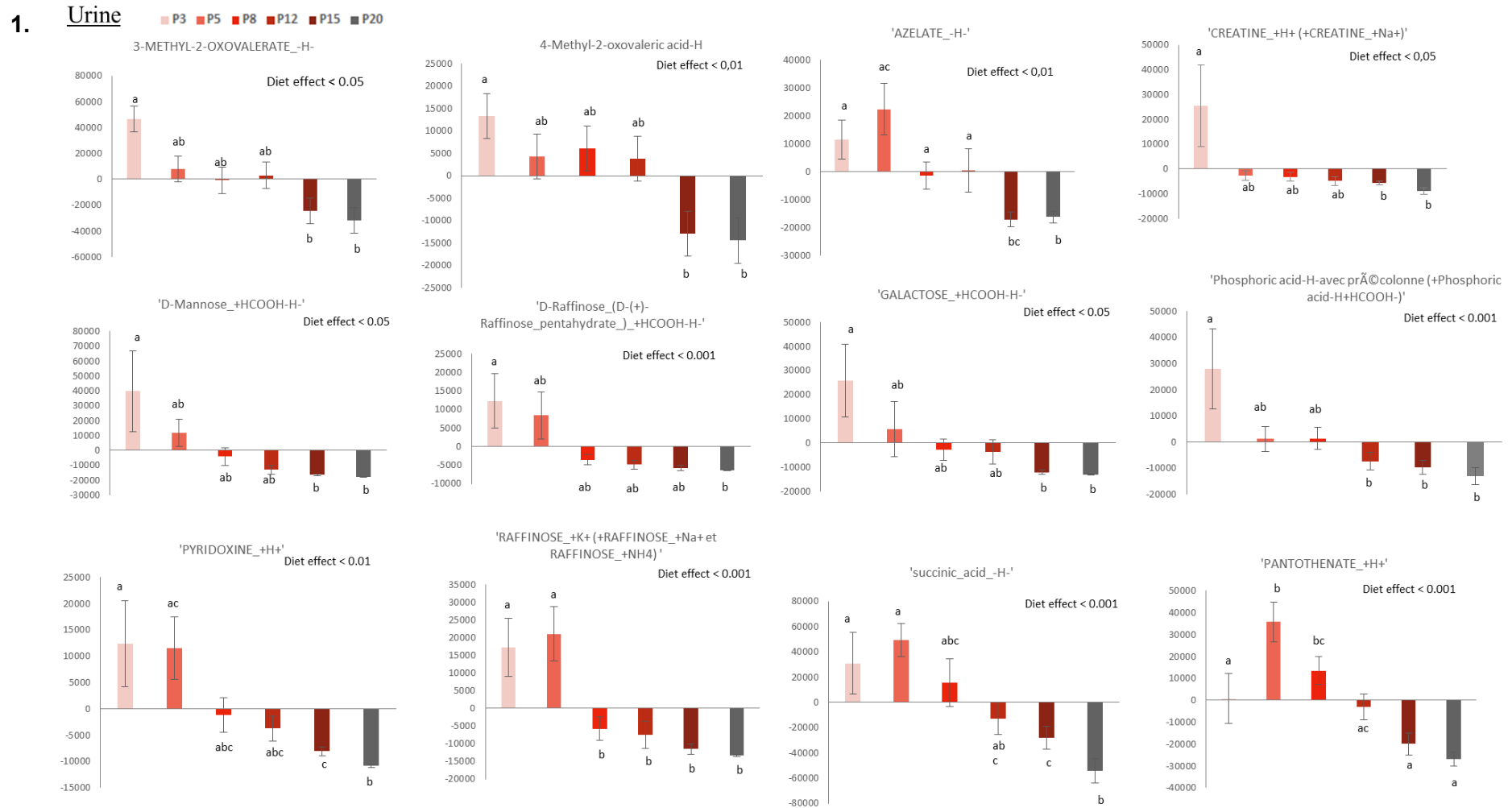
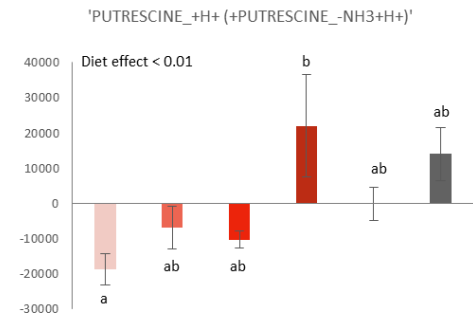
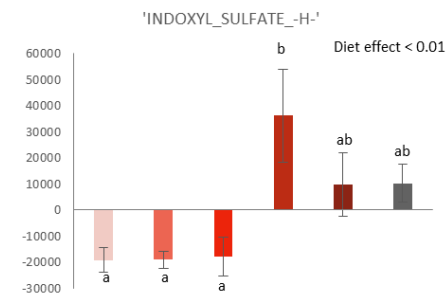
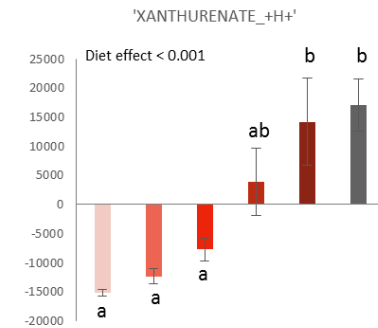
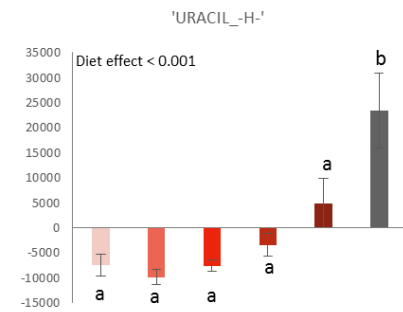
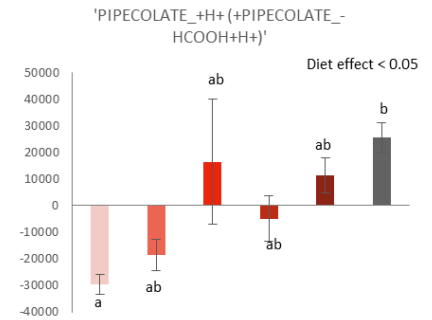
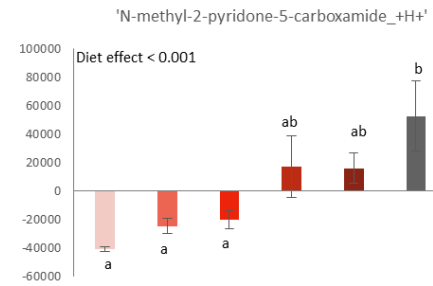
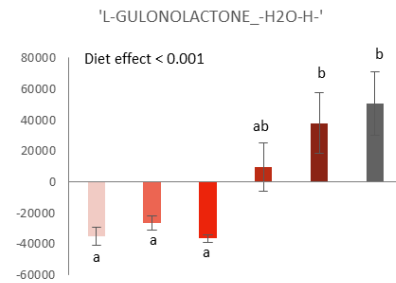
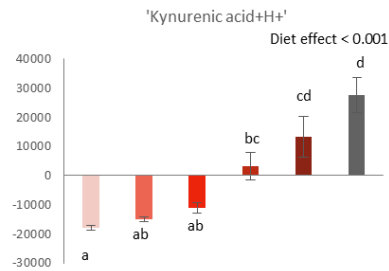
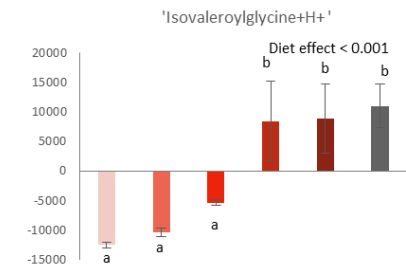
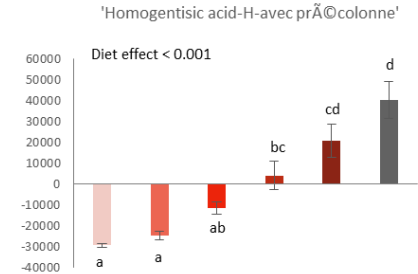
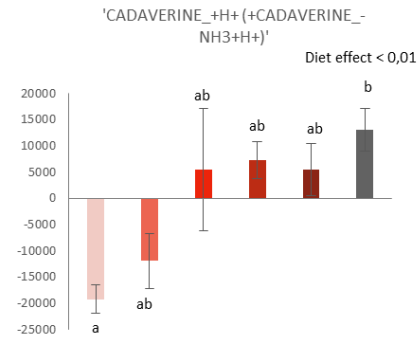
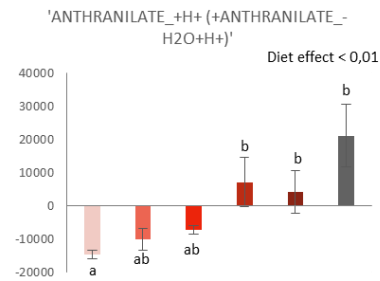


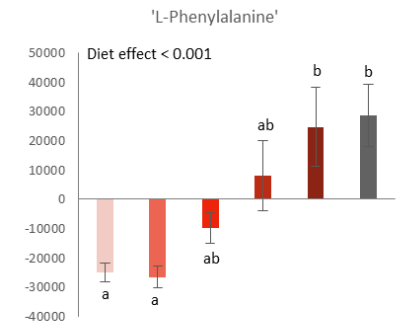
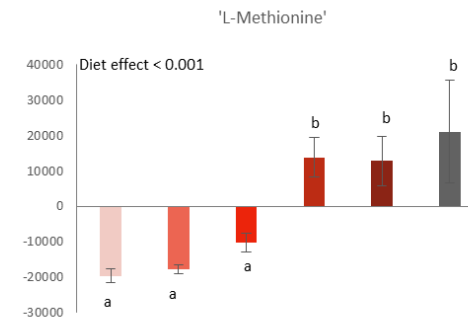
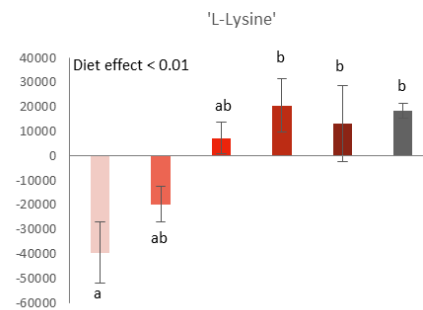
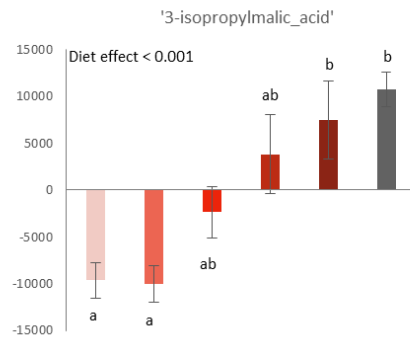
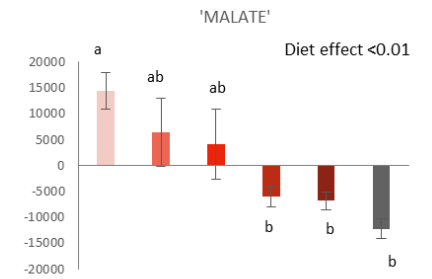
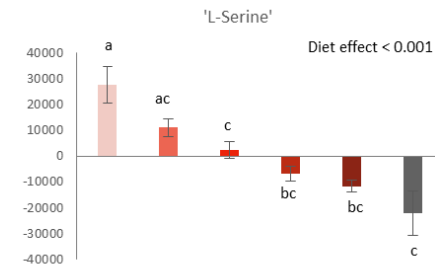
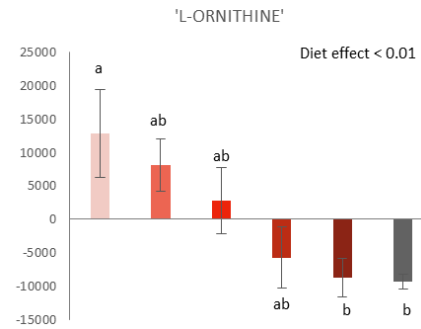
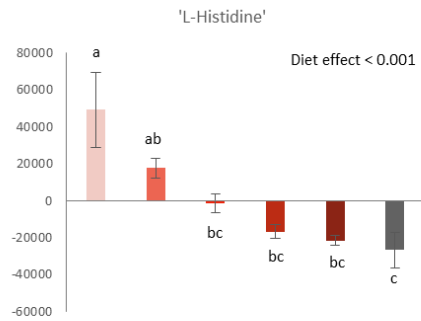
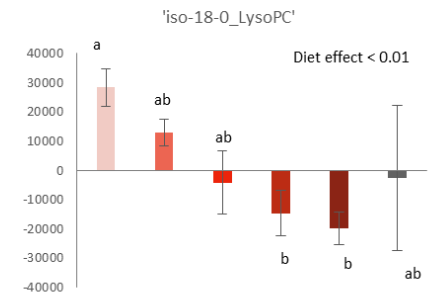
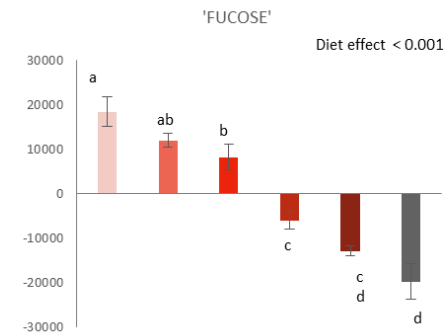
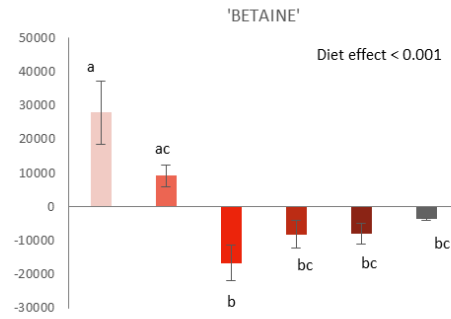
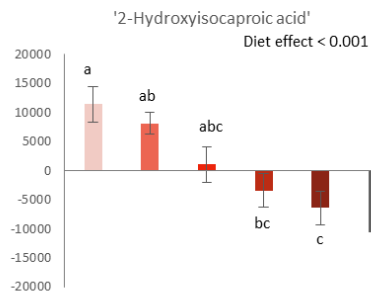
Figure 3A. Urine (1), portal vein (2) and vena cava (3) metabolites obtained with PLS.

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n = 6 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.



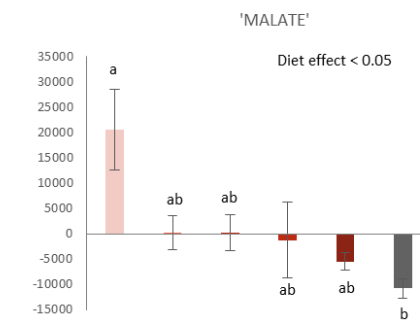
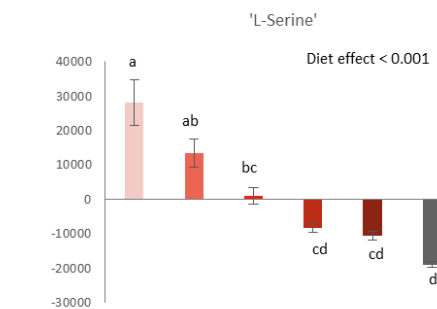
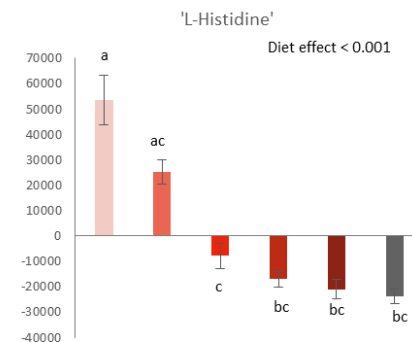
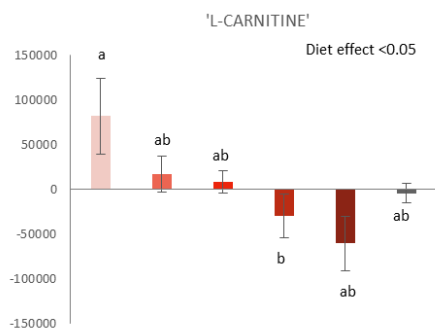
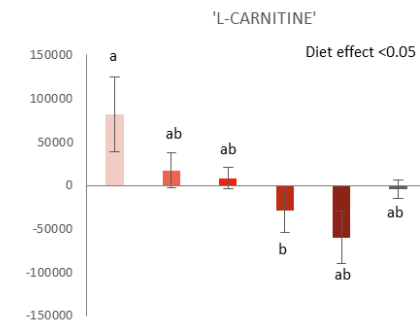
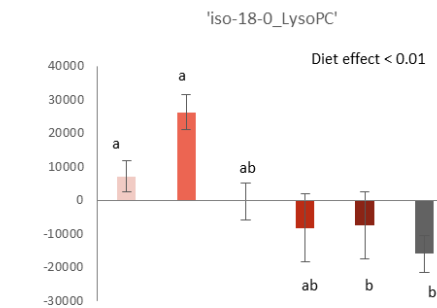
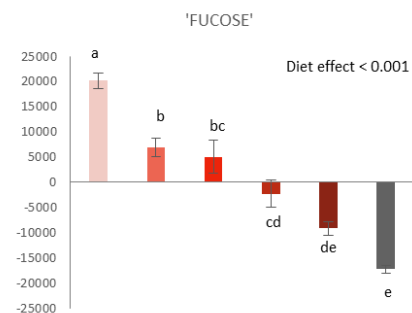
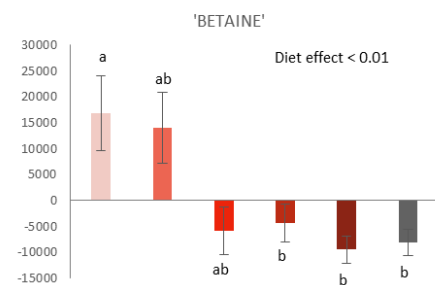
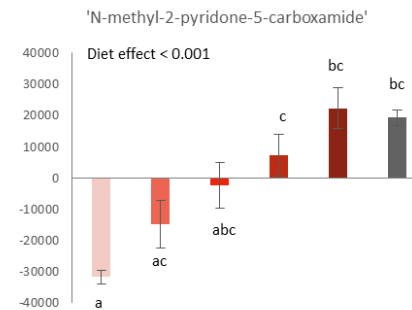
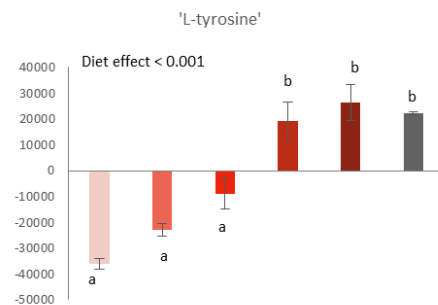
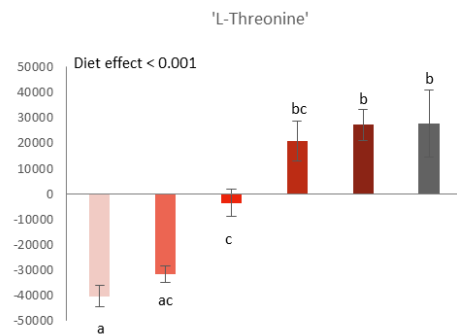


2. Plasma vena cava



3.

Plasma portal vein



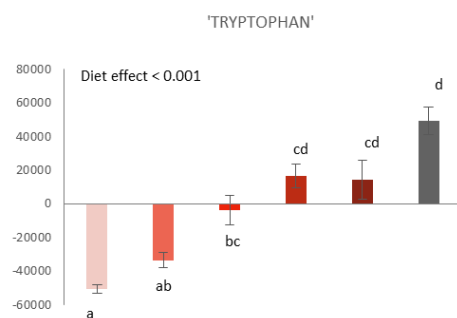
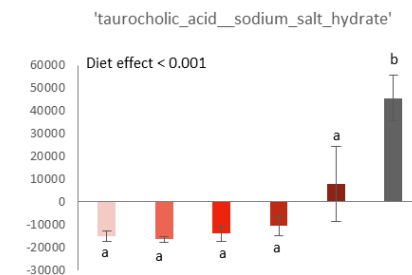
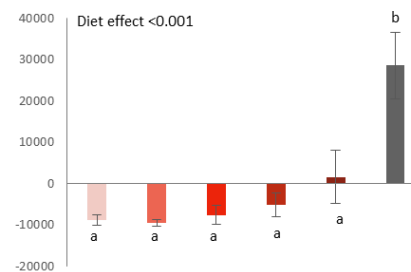
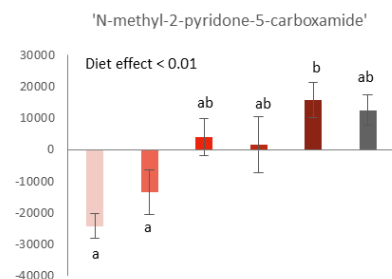
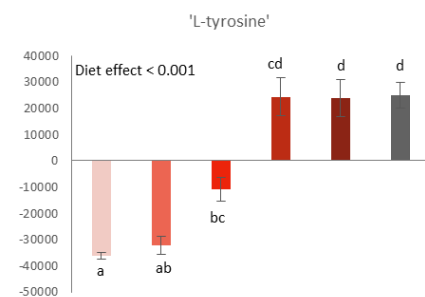
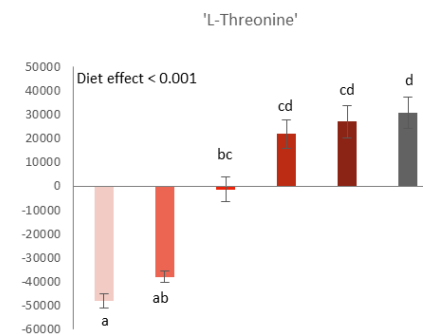
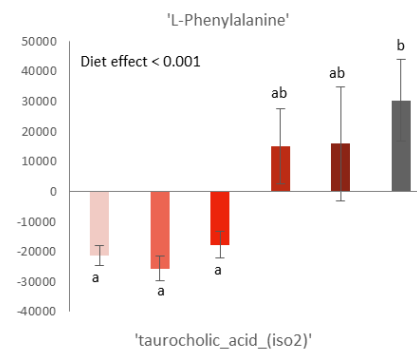
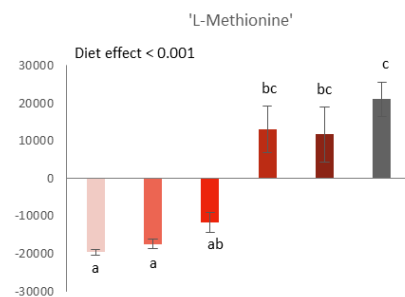
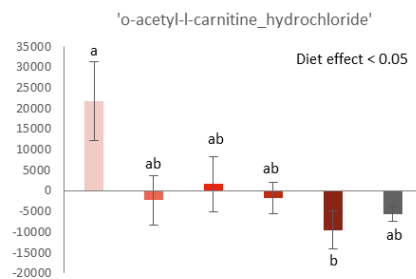
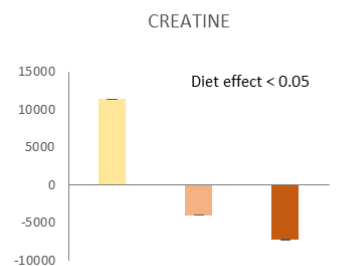


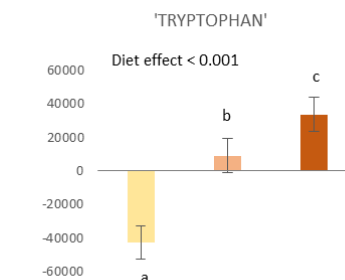
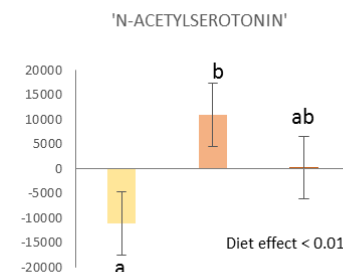
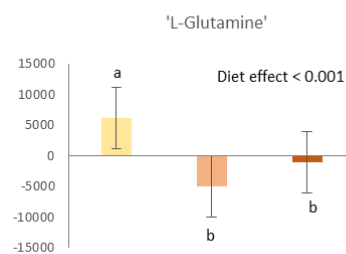
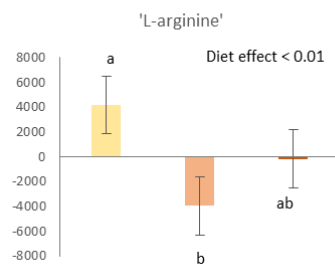
Figure 3B. Urine (1), vena cava (2) and portal vein (3) metabolites obtained with ICDA.

Les données sont présentées en moyenne $\pm$ SEM (n = 6 per group). ^{a, b, c, d} Les données qui ne présentent pas la même lettre sont différentes avec $p < 0.05$.

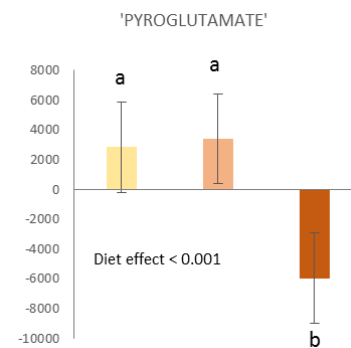
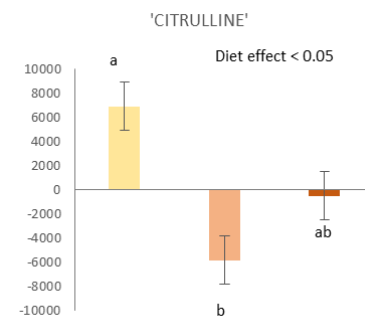
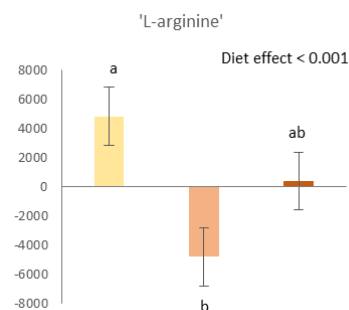
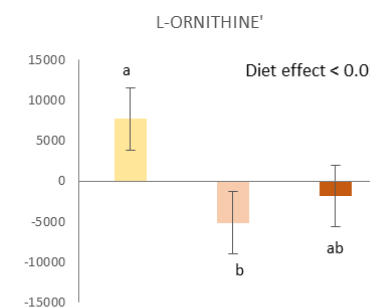
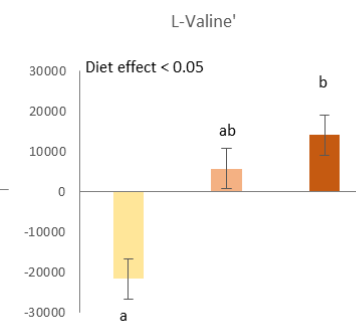
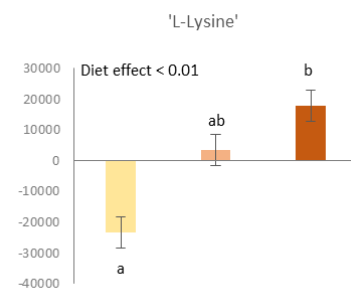
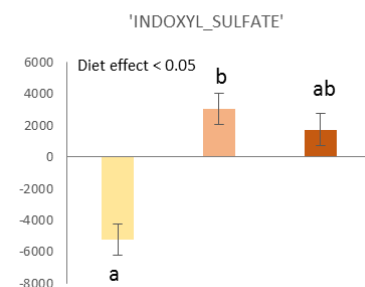
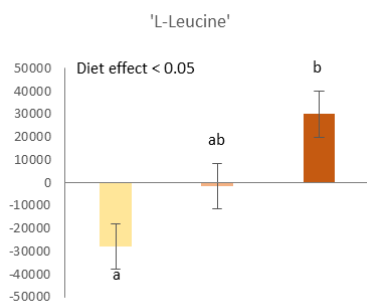
1. Urine



2. Plasma vena cava



3. Plasma portal vein



2.5.3. **Article 4.** Le pipecolate et la taurine signe, respectivement, la déficience en lysine et thréonine

Notre précédente étude a montré que certains métabolites pouvaient indiquer la déficience en protéines/AAI. L'objectif de cette étude est d'analyser si ces métabolites peuvent être spécifiques de la déficience en un seul AAI, et ainsi signer la déficience en lysine et en thréonine.

2.5.3.1. Méthodes

Trois expérimentations chez le rat en croissance ont été réalisées. Dans la première (*expérimentation 1*), les rats ont été nourris avec un régime à base de gluten supplémenté en lysine ou thréonine. Les régimes donnés étaient les suivants : L30, régime déficient à 70% en lysine et supplémenté en thréonine ; T53, régime déficient à 47% en thréonine et supplémenté en lysine ; LT100, régime supplémenté en lysine et thréonine ; PLT, régime contrôle composés de protéines totales de lait qui est une protéine de référence, équilibrée en tous les AAI. Pour la deuxième et troisième expérimentation (*expérimentation 2a et 2b*), les rats ont été nourris avec des régimes à différentes teneur en lysine et thréonine durant trois semaines. Pour rappel, les régimes couvrent 15% (L/T15), 25% (L/T25), 40% (L/T40), 60% (L/T60), 75% (L/T75), 100% (P20) ou 170% (L/T170) du besoin en lysine ou thréonine.

Pour ces trois expérimentations, les rats ont été placés en cages métaboliques afin de collecter les urines sur 24h lors de la 3^{ème} semaine d'étude. A la fin de l'expérimentation, le sang au niveau de la veine porte et de la veine cave a été prélevé. Pour l'expérimentation 1, le profil de métabolome a été analysé dans les urines par métabolomique non-ciblée. Pour les expérimentations 2a et 2b, les analyses de métabolomiques ont été réalisées dans l'urine, la veine porte et la veine cave en utilisant la métabolomique ciblée. L'ensemble de ces analyses ont été faites par LC-MS. Comme dans la précédente étude de métabolomique (**Article 3**), les données de spectres de masse obtenues pour les échantillons ont permis d'obtenir une matrice par fluide biologique analysé (urine, veine porte, veine cave). Chaque matrice a été prétraitée avec les méthodes PQN et Pareto. Puis des analyses multivariées ont été réalisées. L'expérimentation 1 a été analysé par PLS, et les expérimentations 2a et 2b par ICDA. Enfin, pour chaque métabolite discriminant identifié par ICDA ou PLS, l'effet des régimes a été testé par ANOVA à un facteur. Les méthodes ICDA (expérimentation 1) et PLS (expérimentation 2a et 2b) ont permis d'identifier des molécules discriminantes entre les différents groupes de régimes. La qualité des protéines ingérées, et par conséquent la déficience en AAI, influence le métabolome.

2.5.3.2. Résultats principaux et conclusion

L'expérimentation 1 nous a permis d'identifier des biomarqueurs spécifiques de la déficience en AAI. Le pipecolate, la 3-méthyladenine et l'hydroxyprolil-proline sont spécifiques de la déficience en lysine, alors que la taurine et l'acide carboxylique-6-méthoxy-pyridine-3 sont spécifiques de la déficience en thréonine. Les analyses métabolomiques des expérimentations 2a et 2b, indiquent que la majorité des

métabolites trouvés dans les plasmas (veine porte et veine cave) sont des AA et des métabolites de dégradation des AA, que l'on retrouve également dans les urines.

La déficience en lysine entraîne une diminution des AA, et une augmentation des monosaccharides dans les urines. Des métabolites de dégradation des AA, notamment du métabolisme de la lysine ont également été observés. Un métabolite commun a été identifié dans l'expérimentation 1 (discriminant pour le régime déficient en lysine L30) et 2a, le pipecolate qui est un métabolite de dégradation de la lysine. Ce résultat suggère que ce métabolite est spécifique de la déficience en lysine.

La déficience en thréonine entraîne également une augmentation des monosaccharides et des intermédiaires du cycle de Krebs, ainsi qu'une diminution des AA et des métabolites associés. Parmi ces métabolites, l'un d'entre eux a été préalablement identifié dans l'expérimentation 1 (discriminant pour le régime déficient en thréonine T53), la taurine. Ce résultat suggère que la taurine serait spécifique d'une déficience en thréonine.

De plus, nos résultats indiquent qu'un excès de thréonine dans le régime (T170) ne modifie pas le niveau de taurine par rapport au groupe contrôle, P20. Néanmoins, l'excès de lysine (L170) sur le pipecolate n'est pas très clair. En effet, le groupe L170 présente d'importantes variations sur le niveau de ce métabolite qui peuvent être causé par la dilution des urines qui est hétérogène entre les échantillons.

Ces trois expérimentations indiquent que des analyses de métabolomiques permettent de discriminer des métabolites pouvant signifier la déficience en un AAI. Nos résultats suggèrent que le pipecolate pourrait signifier une déficience en lysine, et la taurine, une déficience en thréonine. Grâce au dosage de ces deux biomarqueurs dans l'urine, il serait alors possible de déterminer un état de déficience en ces AAI.

2.5.3.3. *Manuscrit : « Pipecolate and taurine sign lysine and threonine deficiency, respectively »*

Pipecolate and taurine sign lysine and threonine deficiency respectively

Joanna Moro¹, Nadezda Khodorova, Douglas Rutledge, Jean-Charles Martin², Daniel Tomé, Claire Gaudichon, Catherine Tardivel, and Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse^{1*} and Dalila Azzout-Marniche^{1*}

¹UMR PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, 75005, France

² Aix Marseille Université, INSERM, INRA, C2VN, Marseille, France.

Delphine Jouan-Rimbaud Bouveresse^{1*} and Dalila Azzout-Marniche^{1*} are co-last authors

Corresponding author:

Dalila Azzout-Marniche,
UMR PNCA, AgroParisTech
16 rue Claude Bernard
F-75005 Paris, France
Telephone 33-1-44087244
Fax: 33-1-44081858
E-mail: dalila.azzout_marniche@agroparistech.fr

Financial support statement:

Supported by the UMR Nutrition Physiology and Ingestive Behavior.

Declarations of interest: none

Author disclosures:

JM, DA-M, J-CM, and DJRB declare no conflicts of interest.

Author contributions:

The authors responsibilities were as follows—JM, DA-M, J-CM, and DJRB: conducted the research; JM, DA-M, and DJRB: interpreted the data; JM, DA-M and DJRB: wrote the manuscript; JM and DA-M designed the study; JM and DJRB had primary responsibility for the final content; and all authors: read and approved the final manuscript.

Abstract

Aim: Protein intakes must cover the nine EAA requirement, including two strictly essential, lysine and threonine. In developing countries, the risk in EAA deficiency and particularly lysine is elevated, due to the consumption of poor-quality protein. However, it is important that EAA requirement be covered by diet for the maintenance of good health. Thus, it is necessary to know precisely EAA requirement and to be able to detect easily and EAA deficiency. This is why a new approach using metabolomics has been developed. The purpose of this study was to analyze whether metabolites can be specific for a EAA deficiency, lysine and threonine.

Methods: Three experiments on growing rats were performed. In experiment 1, growing rats were fed with gluten diet, deficient in lysine (L30), in threonine (T53), or supplemented in lysine and threonine (LT100), and with a control group with milk protein, PLT. In experiment 2a and 2b, growing rats were fed with diets containing different level of lysine or threonine: L/T15, L/T25, L/T40, L/T60, L/T75, P20, L/T100 and L/T170. All rats were placed in metabolic cages in order to collect urine, and blood of portal vein and vena was taken at the end of the experiment 2a and 2b. Samples of experiment 1 were analyzed by untargeted metabolomics, and samples of experiment 2a and 2b by targeted metabolomics. All of these analyses were performed using LC-MS, and data were analyzed with multivariate analysis model: PLS and ICDA. Each discriminant metabolite identified by PLS or ICDA was tested by one-way ANOVA to evaluate the diet effect.

Results: ICDA and PLS methods allowed the identification of discriminating molecules between the different diet groups in the three experiments. The quality of the ingested proteins, and consequently the EAA deficiency, influences the metabolome. A common metabolite was identified in experiment 1 and 2a, the pipecolate, suggesting that this metabolite could be specific for lysine deficiency. And another metabolite, probably specific of threonine deficiency, was found in experiment 1 and 2b, the taurine.

Conclusion: These results indicate that metabolomics is a good approach to distinguish specific metabolites from lysine and threonine deficiency, which could be used to detect malnutrition in EAA.

By assaying these two biomarkers in urine, it would be possible to detect whether an individual has an EAA deficiency, and to determine which AA is deficient.

Introduction

Amino acid (AA) requirement remained a controversial issue in nutrition over the time. In human, twenty AA are “proteinogenic”, and are used in the composition of proteins. From these twenty AA, nine were considered as essential AA (EAA), which means that there is no *de novo* synthesis by the organism, or that they are synthesized at an insufficient speed to cover the requirement and must therefore be provided by the diet (Boutry et al., 2008; Reeds, 2000; Rose, 1957). Among these EAA, two are considered strictly essential, because they do not participate to transamination reactions, namely lysine and threonine.

In developing countries, there is a risk of deficiency in some EAA. In these countries, the protein sources are mainly derived from cereals. In Africa, for example, the diet is mainly based on the consumption of cereals, vegetables, roots and tubers (Schönfeldt and Gibson Hall, 2012). In India, the majority of the population is vegetarian. Their main source of protein is found in cereals such as rice, wheat and millet (Pellett, 1996). However, these cereals contain protein with poor quality, deficient in some EAA. Lysine is the first limiting AA in human because it is deficient in cereal (Tomé and Bos, 2007), with a content of 2.6g/100g protein in wheat versus 7.6 g/100g protein in milk.

A protein can only be synthesized if all its AA are available in sufficient quantity (Harris et al., 1943). If one of the EAA is deficient in the diet, the proteosynthesis will be limited to the level of the limiting EAA. It is important that all EAA are brought in sufficient quantities, in order to maintain an adequate protein turnover. Thus, it is necessary to know precisely what the requirement in these EAA is.

Different methods were developed to measure AA requirement. The need for each EAA was first defined from a nitrogen balance and more recently, methods using the infusion of stable isotopes have been developed. (Young et al., 1989). The method of direct AA oxidation measures the oxidation of the test AA, for example ¹³C-lysine, and the method of indicator AA oxidation measures the oxidation of an indicator AA, often ¹³C-phenylalanine, depending on the supply of the amino acid under study (Pencharz and Ball, 2003).

However, these methods are complicated, required invasive protocols, and the obtained requirement values show significant differences according to method used. For example for lysine, estimated requirement with nitrogen balance is evaluated at 12 mg/kg/d, while it is around 40 mg/kg/d with the method of indicator AA oxidation (AFSSA, 2007; FAO/WHO/UNU, 2007). There is therefore a urgent need to develop more precise and non-invasive approaches (FAO/WHO/UNU, 2007). The emergence of new technologies and "omics" sciences, such as

metabolomics, seem promising for developing a new method of measuring AA needs. Metabolome profiles in biological fluids have already been successfully used as early biomarkers of individual metabolic sensitivity and metabolic dysfunction (Fedry et al., 2016), and also to determine nutrient requirement such as choline (Fischer et al., 2007, 2010).

The aim of this study was to investigate the effect of protein quality on plasma and urinary metabolome and to determine biomarkers of lysine and threonine deficiency and sufficiency in urine using a model of growing rats fed with lysine or threonine deficient diet during three weeks. The hypothesis was that AA deficiency will induce an increase in the enzymatic systems of catabolism of other AA inducing the production of degradation metabolites in biological fluids that can disappear when the AA intake reaches the requirement, and thus these metabolites can be used as a biomarkers. We performed three experiments.

In the first one, gluten was given as a protein source, supplemented with lysine or threonine in order to investigate first the effect of only one EAA on urinary metabolome using untargeted metabolomics and second to determine the specificity of biomarkers identified. Given that the level of EAA deficiency cannot be control when the given protein source is gluten, we used in the experiment 2a and 2b, a dietary model where the amount of EAA deficiency (lysine or threonine) was determined by the protein level in the diet, and all we supplemented the diet with all other amino acids except the test EAA, i.e. lysine or threonine, to the level of the control diet. In these two last experiments, plasma and urinary metabolome were determined by target metabolomics.

2. Material and methods

2.1 Animals

Three experiments have been performed. The experiment 1, 2a and 2b have been performed in Wistar Han growing rats (HsdHan[®]:WIST, Envigo, France), weighing 75-100 g in experiment 1, and 50-60g in experiment 2a and 2b, housed in individual clear plexiglas cage and maintained in a temperature-controlled room (22°C) with a 12-hour light/12-hour dark cycle (lights on from 00:00 to 12:00). These studies was approved by the Regional Animal Care and Ethical Committee and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals (registration number: APAFIS#13436-2017122616504600). For these 3 experiments, rats were fed with a standard diet for one week before a switch to their experimental diet. During experimental period, a calibrated meal of 4g (58.2 kJ) was given between 12:00 and 12:30 every day, and then, they had ad libitum access to food between 12:30 and 9:00 the next day. The calibrated meal was given to accustom the rats to quickly consume a small amount of food. Food intake and

body weight were measured daily during three weeks. In the 3rd week, each rat was placed during 48h in metabolic cage (24h of adaptation and 24h of measurement) to collect urine for metabolomics analysis.

Experiment 1:

Twenty-four growing rats were divided into 4 groups (n = 6 rats/group). These 4 groups were assigned for 3 weeks one of the 4 isocaloric experimental diets described in table 1a. Diets are composed with two different protein sources: gluten or milk protein. Gluten is an AA imbalanced protein, especially in lysine and threonine. Gluten induced 70% lysine deficiency (*i.e.* cover 30% of lysine requirement), and 47% threonine deficiency (*i.e.* cover 53% of threonine requirement). Three diets were made with gluten: L30 diet, deficient in lysine but supplemented in threonine to cover 100% of its requirement; T53 diet, deficient in threonine but supplemented in lysine to cover 100% of its requirement; and LT100: supplemented in lysine and threonine to cover 100% of their requirement. The diet composed with milk protein, PLT, balanced in all AA, is the control diet.

Experiment 2a:

Sixty-four growing rats were divided into 8 groups (n=8/group). They were fed for 3 weeks isocaloric lysine deficient diets. Diets are composed with different levels of lysine, 15, 25, 40, 60, 75, 100 or 170% of the theoretical lysine requirement necessary for growing rats, (85% to 0% of deficiency), described in table 1b. The amount of Lysine deficiency was determined by the protein level in the diet, and all other amino acids except the test lysine were supplemented to the level of the theoretical requirement necessary for growing rats.

Experiment 2b:

The same experiment as *experiment 2a* was realized with threonine. Diets are composed with different levels of threonine, 15, 25, 40, 60, 75, 100 or 170% of the theoretical threonine requirement necessary for growing rats, (85% to 0% of deficiency), described in table 1c. The amount of threonine deficiency was determined by the protein level in the diet, and all other amino acids except the test threonine were supplemented to the level of the theoretical requirement necessary for growing rats.

2.2 Urine and plasma sampling

During 24h of measurement, rats were housed individually in metabolic cages. These metabolic cages have a perforated bottom for the collection and separation of urine and feces. Feces and urine pass through a collection funnel and are both separated and collected in two different

tubes. The cages are equipped with feeding bowls and bottles, and the rats were fed ad libitum with their respective diets.

In experiment 2a and 2b, at the end of the study, at 11:00, the rats were fed with 4-gram pellet (58.2 kJ) of their test-diet, to standardize the energy intake, and two hours later, they were anesthetized with Isoflurane. Blood was taken from the portal vein and from the vena cava. The blood samples were collected on heparin, centrifuged (4°C, 3000 rpm, 10 min) and plasma was stored at -80°C until metabolomics analysis.

2.3. Metabolomics sample preparation and liquid-chromatography mass spectrometry (LC-MS) analysis of urine

Untargeted metabolomic: Urine sample preparation: fifteen micro-litres of each thawed 24h-urine sample were diluted with 985 µl of milliQ water/acetonitrile (90/10, v/v). UPLC-HRMS analysis was performed on an Acquity H-Class system coupled to a Q-TOF Synapt G2 Si instrument (Waters Corporation, Milford, MA) in positive electrospray ionization mode (ESI+) using Acquity CSH C18 column (2.1 × 100 mm; 1.7 µm bead size; Waters). The column temperature was 40°C and the eluents A and B were 0.01% formic acid in water and 0.01% formic acid in acetonitrile, respectively. The gradient was run at 0.5 mL/min and consisted of an isocratic elution for 1 min of 2% B, followed by an increase of B at a linear rate to 88% at 12 min, then a re-equilibration for 1 min with 2% B and maintenance at 2% B until 17 min.

Raw data from Synapt G2 Si were pre-processed using MarkerLynx (MassLynx V4.1, Waters) to obtain a list of detected features characterized by m/z and retention time (Rt).

Target metabolomic: Plasma and urine samples were analyzed by LC-HRMS on two different columns: C18 and HILIC. The acquisitions were made in positive and negative mode in order to be as exhaustive as possible. Four result matrices were therefore obtained before being compiled. The following workflow was applied to all samples:

On C18 column, samples were analyzed during 16 minutes gradient with solvent A and B, H₂O and 0.1% formic acid; and acetonitrile and 0.1% formic acid, respectively.

On HILIC column, samples were analyzed during 27 minutes gradient with solvent A and B, 16 mM ammonium formate; and acetonitrile and 0.1% formic acid, respectively.

All samples were analyzed in FullScan and some were also analyzed in MS/MS to facilitate the annotation of compounds. A pool of all samples was injected every 5 samples to correct instrumental variation during the assay sequence.

Data extraction were made by XCMS from raw data acquired in FullScan. Data were cleaned with visual verification of EIC (Extracted Ion Chromatogram) and variables present in the

benches and of poorly integrated or very noisy peaks were removed. Data were normalized to pools injected every 5 samples with Van Der Kloet normalization using R scripts. Variables with coefficients of variation greater than 30% in the pools were removed. Finally, the selected variables were matched with the internal database of the laboratory.

2.4 LC-MS data processing and analysis

Experiment 1:

The mass spectra measured on urine, plasma from the vena cava and Plasma from the portal vein had first been pretreated (normalization with Probability Quotient Normalisation (PQN) (Dieterle et al., 2006) followed by Pareto-scaling (van den Berg et al., 2006), and Independent Component Discriminant Analysis (ICDA) (Habchi et al., 2017; Khodorova et al., 2019), which is a supervised discrimination method (for detail see Moro et al, accompanied paper).

For experiments 2a and 2b, additionally to ICDA, we use a quantitative PLS model relating the pretreated mass spectra to the Protein concentration. From the loadings calculated in each model, m/z variables, corresponding to biomarkers indicating protein deficiency, had been detected.

The results showed that similar biomarkers could be found by both chemometric methods. Hence it was decided in this study to apply only PLS models to relate the lysine (respectively threonine) concentration to the pretreated mass spectra. The chemometric procedure applied has been described in [ref. Joanna LP]. Note that in experiments 2a and 2b, the models were built with the 6 groups L15, L25, L40, L60, L75 and L100 (respectively T15, T25, T40, T60, T75 and T100). The samples in the "extrapolated groups" L100 and L170 (respectively T100 and T170) (excess of lysine with respect to protein) were projected onto the PLS model space, and their predicted value of Lysine (respectively Threonine) concentration was compared to the experimental value, to see whether they follow the same model as the "regular" groups.

For each discriminant metabolites identified by PLS or ICDA, the effects of the diets were tested by one-way ANOVA using R[®] software. Pairwise comparisons were performed with Post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results

Urine samples were analyzed using LC-HRMS, and the MS data obtained were pretreated and analyzed using ICDA method for experiment 1 and PLS method for experiment 2a and 2b.

3.1. Urinary markers of gluten intake (experiment 1)

In order to determine biomarkers for gluten and lysine or threonine deficiency, we performed untargeted metabolomics. Four different diet groups (L30, T53, LT100 and PLT) were separated along IC2 (Figure 1A.).

After using an ANOVA test, twelve molecules were considered to have different intensities according to group membership: 2-(2-Ethyl-4,5-dihydro-1H-imidazol-1-yl)ethan-1-ol is increased when AA, lysine or threonine, were deficient in the diet; 2,4-Dimethyl-2-[(piperidine-1-carbothiyl)sulfanyl] pentanoic acid is decreased in rats under PLT diet; 6-methylpyridine-3-carboxamide, imidazolepropionic acid, 4-phenoxybenzene sulfonic acid and L-alanine-L-alanyl were increased when lysine is deficient in the diet; 3-Methyladenine, Hydroxyprolil-proline and methyl proline were decreased in lysine deficient diet; methylhypoxanthine and 6-methoxy-pyridine-3-carboxylic acid were increased while taurine was decreased in threonine deficient diet (Figure 2A)

3.2. Urinary and plasma biomarkers for lysine deficiency (experiment 2a)

In urine, portal vein and vena cava samples were projected on the scores plots of the PLS model constructed with only 6 groups. The eight groups (L15, L25, L40, L60, L75, P20, L100, L170) were separated along LV1 (Figure 1B). The QQ-plot were used to select the most relevant variables for the separation of groups. The selection of discriminant variables was based on correlations and covariance in the S-plots, and contributions to the LV which are greater than ± 1 , 2 and 3 standard deviation of all the contributions to each component in the QQ-plots.

In urine, PLS method revealed that forty-nine features were associated with the consumed diets. After using an ANOVA test, thirty-five molecules were considered to have different intensities according to group membership. The details on each feature are reported in Figure 2B. Among these molecules, nineteen had their intensities decrease when the percentage of lysine in the diet increased (which means that these biomarkers are less present when the lysine intake increases), namely 1-methylnicotinamide, anthranilate, galactitol, gluconate, glutamate, L-glutamic acid, iso-maltose, L-alanine, L-arginine, L-carnitine, L-histidine, L-methionine, L-threo-3-phenylserine, L-tyrosine, L-valine, phosphoric acid, proline, sucrose and tryptophan; while sixteen others compounds had their intensities increase when percentage of lysine increased, namely 2-isopropylmalic acid, 4-pyridoxate, cadaverine, dehydroascorbate, iso-citrate, L-gulonolactone, L-leucine, L-lysine, N.N.N. trimethyllysine, nicotinic acid, N-methyl-2-pyridone-5carboxamide, norvaline, oxoglutarate, N-alpha-acetyllysine, pipercolate, and uracil

(which means that increasing the lysine intake contributes to synthesize more of these biomarkers).

In portal vein, PLS method revealed that twenty seven features were associated with the consumed diets. After using an ANOVA test, eighteen molecules were considered to have different intensities according to group membership. Cholate, cytosine, L-methionine, N.N.N-trimethyllysine, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and pipecolate were increased when lysine was increased in the diet. In contrary, 4-Methyl-2-oxovaleric acid, L-carnitine, L-histidine, L-leucine, L-serine, L-threonine, L-tyrosine, N-acetylserotonin, o-acetyl-l-carnitine_hydrochloride and tryptophan were decreased when lysine was increased in the diet.

In vena cava, PLS method revealed that twenty nine molecules were discriminant between groups. After using an ANOVA test, nineteen molecules were considered to have different intensities according to group membership. Some of them increase when lysine was increased in the diet: betaine, cytosine, L-lysine, L-methionine, mannose, N.N.N-trimethyllysine, nicotinamide, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and pipecolate. While, other were decreased when lysine was increased in the diet: 2-hydroxybutyrate, gluconate, L-carnitine, L-histidine, L-leucine, L-serine, L-threonine, o-acetyl-l-carnitine_hydrochloride, succinic acid and tryptophan.

3.2. Urinary and plasma biomarkers for threonine deficiency (experiment 2b)

In urine, portal vein and vena cava, the eight groups (T15, T25, T40, T60, T75, P20, T100, T170) were separated along LV1 (Figure 1C). The QQ-plot were used to select the most relevant variables for the separation of groups.

In urine, PLS method revealed that twenty-six features were associated with the consumed diets. After using an ANOVA test, all molecules were considered to have different intensities according to group membership. The details on each feature are reported in Figure 2C.

Among these molecules, fourteen had their intensities decrease when the percentage of threonine in the diet increased, namely aspartate, beta-alanine, galactose, L-tyrosine, lactose, L-carnitine, L-glutamic acid, L-phenylalanine, palatinose, pyridine-2-aldoxime metochloride, sucrose, taurine, trehalose, and urate; while twelve others compounds had their intensities increase when percentage of threonine increased, namely 2-oxoadipate, 2-oxobutanoic acid, carnosine, cis-aconitate, citrate, dehydroascorbate, glutarate, isovaleroylglycine, dimethyl oxalate, methylmalonic acid, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide, oxoglutarate.

In portal vein, PLS method revealed that sixteen molecules were associated with the diet. After using an ANOVA test, twelve were discriminant between diets. In the case where threonine

was increased in the diet, some molecules were increased as D-Erythrose, glycocholate, cytosine, N-acetylglycine, L-methionine, and homoserine. While others molecules were decreased when threonine was increased in the diet, DL-2-Hydroxyvaleric acid sodium salt hydrate, glycochenodeoxycholic acid, L-beta-homoisoleucine hydrochloride, L-Threo-3-Phenylserine, 2-Hydroxy 3-methylbutyric acid and L-arginine.

4. Discussion

This study addressed the consequences of three weeks of essential amino acid (EAA) restriction, lysine or threonine, on 24-hour urine markers of EAA deficiency. To this end, three different experiments were performed. Quantitative metabolite analysis of biological fluids, as urine or plasma, allows on the one hand to identify metabolites associated with the EAA restriction that may eventually serve as biomarkers of EAA sufficiency/deficiency, and on the other hand, the profile obtained may provide information on the impact of EAA restriction on the organism. In the present study, these metabolomics analyses revealed that single EAA restriction caused observable perturbation to urinary and plasma metabolic profiles of rats.

First of all, a pilot study where growing rats were fed gluten lysine deficient diet (L30), gluten threonine deficient diet (T53), gluten control group with 100% lysine and threonine requirement (LT100), and a second control group with milk protein (PLT) was performed. In this study, using non-targeted metabolomics we identify biomarkers specific of AA deficiency. Pipecolate, 3-methyladenine and hydroxyproline-proline were decreased under lysine deficient group compared to threonine deficient group and control, and taurine and 6-methoxy-pyridine-3-carboxylic acid were decreased and increased, respectively, under threonine deficient group compared to the 3 other group. We also identified a gluten specific biomarker, 2,4-Dimethyl-2-[(piperidine-1-carbothioid)sulfanyl]pentanoic acid, that is increased under LT100, L30 and T53 group. In experiment 2a and 2b, young growing rats were fed with diets differing in their percentage of lysine or threonine, including very low lysine/threonine diet (L/T15, L/T25), moderately low (L/T40, L/T60), adequate (L/T75, P20, L/T100), or above the requirement (L/T170) (National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995). Metabolomics analyses on portal vein, vena cava and urine revealed that the majority of metabolites found in plasma are AA and AA degradation metabolites, which are also found in urine.

Severe lysine deficiency have an impact on protein or other AA metabolism showing decreased levels of L-histidine, L-methionine, L-valine, tryptophan and proline, and increase level of L-leucine as compared to the control group. It has been shown that in the case of an AA deficient diet, this deficient AA is spared and its elimination in urine is reduced (Dunstan et al., 2017).

These metabolomics analyses revealed also an impact on lysine metabolism pathway. Indeed, trimethyllysine and alpha-acetyllysine, were decreased when lysine decreased in the diet. Trimethyllysine is a precursor of carnitine explaining that carnitine is decreased when lysine level decrease in the diet (Lehman et al., 1987). Studies have also shown that rats fed with a high lysine diet present a higher concentrations of trimethyllysine in skeletal muscle and in plasma compared to control rats (Davis et al., 1993). Three others metabolites from AA metabolism were found to predict lysine deficiency, L-threo-3-phenylserine, anthranilate, and pipecolate. L-threo-3-phenylserine and anthranilate increase in severe lysine deficient diet. Other metabolites found in urine were iso-maltose and galactitol, a disaccharide and a monosaccharide derivative, respectively. They were increase in L15 compared to control group, P20. We hypothesize that under severe lysine restriction diet, others AA that cannot participate in proteosynthesis due to the low level of lysine, and participate to other synthesis pathway as neoglucogenesis inducing an increase in glucose synthesis (Carbone et al., 2019; Dunstan et al., 2017).

The pipecolate is the only metabolite identified in experiment 1 and 2a which suggest that it signed specifically lysine deficiency. When L170 was exclude from statistical analysis because of it's very large variation in this group, we observed that it is a lower in pipecolate under severe lysine deficient diet (L15 and T15) compared to P20 group.

For the effect of threonine deficiency, as in lysine deficient diet, some monosaccharides were found in urine under deficient threonine diet, sucrose and trehalose. Some AA and related metabolites have a modification of their intensities according threonine level in the diet: L-phenylalanine and taurine decrease in urine when threonine decrease in the diet, while L-carnitine is increased under T15 and differ significantly from the other groups. An impact of Krebs cycle is also observed under threonine deficient diet. In urine, some intermediates, as oxoglutarate and citrate, are increased proportionally to threonine level in the diet. Some studies on EAA deficient diet have already shown that there is a decrease in Krebs cycle intermediate (Bollard et al., 2005; Wu et al., 2010). Urate, salts of uric acid, were increased in severe and moderate threonine deficient diet (T15, T25 and T40) and decreased from T60 to P20. It is a degradation product of purine, a metabolite present in protein diet, that is regularly detected in urine (Kim et al., 2009). Food intake is increased under threonine deficient diet, what could explained an increase in urate compared to control group. Some other metabolites were decreased under threonine deficient diet, such as dehydroascorbate, 2-oxoadibate, 2-oxobutanoic acid, N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide and mehtylmalonic acid, and one is increased in severe and moderate threonine deficient diet (T15, T25 and T40), namely pyridine-2-aldoxime metochloride. Among these metabolites, taurine is the only one that was also identified in the experiment

1, which suggest that it is a good candidate to sign the threonine deficiency. Our precedent studies (Moro and al.,) and some others have shown that low protein diet, deficient in all EAA, decrease some bile acids in plasma (Bortolotti et al., 2009; Morton et al., 2014). The impact of threonine deficiency on taurine could indicate a modification of enterohepatic cycle of bile acids under threonine deficient diet. However, rather than threonine, taurine is synthesized from methionine and cysteine (Lakshmanan et al., 1976; Rana and Sanders, 1986). Thus, it remained to clarify the relationship between threonine metabolism and taurine. Moreover, inverse variations were observed between the two experiments in our studies, an increase in experiment 1 and a decrease in experiment 2b. Additional experimentations were necessary to confirm the relationship between urinary taurine and the amount of threonine in the diet.

In summary, in our three experiments, with non-targeted metabolomics (experiment 1) and targeted metabolomics approach (experiment 2a and 2b) two biomarkers were identified: pipecolate and taurine.

Pipecolate is decreased under low lysine diet (experiment 1 and 2a), but not under low threonine diet. Moreover, a previous work of our team on protein restriction biomarkers (Moro and al.,) have also found that pipecolate is decreased under low protein diet in urine. These results seems indicate that pipecolate is specific of lysine deficiency. Pipecolate is a metabolite of lysine degradation pathway. The decrease in lysine in the diet induced a decrease in its degradation explaining its lower concentration under severe lysine deficient diet.

Taurine is the second biomarker found in three experiment of protein/AA deficiency. Interestingly, taurine does not present the same variation between these two experiments but it is discriminating between the groups and allows differences in the threonine deficient diets of the control diets. Taurine is not found in lysine deficient diet (experiment 2a) that seems indicate that it is specific of threonine deficiency.

In our previous work on protein restriction biomarkers (Moro and al.), taurine is not found in urine. However, bile salts as taurocholic acid that results from the conjugation of cholic acid with taurine, is found in portal vein under low protein diet. AA promoted taurocholic acid production (Hawkins et al., 1949) that explain the decrease in taurocholic acid under low protein/AA diet. An important step for bile production is it's conjugation with amino acids, taurine or glycine, that occurs in the liver. In rats and human, there are glycine and taurine bile acids conjugates and rats excrete mostly taurine conjugates (Vessey, 1978). Interestingly, a hypocholesterolemia effect wheat gluten with an increase excretion of bile acids was reported in rats. However, the supplementation of wheat gluten with lysine or threonine did not reverse this

effect. Gut bacteria are also involved in biotransformation of bile salts during their enterohepatic circulation. The hydrolysis of conjugated bile acids release free bile acids and glycine or taurine (Ridlon et al., 2016). Indeed, these data suggest that there is a relation between threonine, taurine and bile synthesis. However, further studies are needed to clarify this metabolic pathway. We hypothesized that during threonine deficiency, taurine could be more used to synthesized taurocholic acid and the variation in urine of taurine or taurine salt depend of microbiota profile.

To conclude, we identified two specific biomarkers for EAA deficiency: pipecolate for lysine and taurine for threonine. Additional experiments are needed to clarify the effect of threonine on taurine excretion in urine. Thanks to these two biomarkers, which can predict the state of sufficiency in lysine or threonine, the measurement of the concentration of these two molecules in the urine would make it possible to know the AA status of an individual, and thus to detect a possible state of deficiency.

References

- Adibi, S.A., Modesto, T.A., Morse, E.L., and Amin, P.M. (1973). Amino acid levels in plasma, liver, and skeletal muscle during protein deprivation. *Am. J. Physiol.* 225, 408–414.
- AFSSA (2007). Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Aparecida de França, S., Dos Santos, M.P., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C., Kettelhut, I. do C., Lopes, C.F., and Kawashita, N.H. (2009). Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 25, 1186–1192.
- Arch, J.R.S., Hislop, D., Wang, S.J.Y., and Speakman, J.R. (2006). Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)* 30, 1322–1331.
- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab.* 5, 426–437.
- Ballabio, D., and Consonni, V. (2013). Classification tools in chemistry. Part 1: linear models. PLS-DA. *Anal. Methods* 5, 3790–3798.
- Beck, B., Dollet, J.-M., and Max, J.-P. (1989). Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: Effects on food intake and body weight in rats. *Physiology & Behavior* 45, 761–765.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., and van der Werf, M.J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142.
- Blais, A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Tomé, D., and Even, P.C. (2018). Low-protein diet-induced hyperphagia and adiposity are modulated through interactions involving thermoregulation, motor activity, and protein quality in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314, E139–E151.
- Bollard, M.E., Stanley, E.G., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., and Holmes, E. (2005). NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed* 18, 143–162.
- Bortolotti, M., Kreis, R., Debard, C., Cariou, B., Faeh, D., Chetiveaux, M., Ith, M., Vermathen, P., Stefanoni, N., Lê, K.-A., et al. (2009). High protein intake reduces intrahepatocellular lipid deposition in humans. *Am J Clin Nutr* 90, 1002–1010.
- Boutry, C., Bos, C., and Tomé, D. (2008). Les besoins en acides aminés. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 22, 151–160.

- Carbone, J.W., McClung, J.P., and Pasiakos, S.M. (2019). Recent Advances in the Characterization of Skeletal Muscle and Whole-Body Protein Responses to Dietary Protein and Exercise during Negative Energy Balance. *Adv Nutr* 10, 70–79.
- Chalvon-Demersay, T., Even, P.C., Tomé, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., and Azzout-Marniche, D. (2016). Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 36, 60–67.
- Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Blais, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Gaudichon, C., and Even, P.C. (2019). Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 316, R486–R501.
- Davis, A.T., Kruggel, E.M., and Randall, S. (1993). Excess Dietary Lysine Increases Skeletal Muscle and Plasma Trimethyllysine in Rats. *J Nutr* 123, 1109–1116.
- De Sousa-Coelho, A.L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* 443, 165–171.
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., and Senn, H. (2006). Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal. Chem.* 78, 4281–4290.
- Du, F., Higginbotham, D.A., and White, B.D. (2000). Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* 130, 514–521.
- Dunstan, R.H., Sparkes, D.L., Macdonald, M.M., De Jonge, X.J., Dascombe, B.J., Gottfries, J., Gottfries, C.-G., and Roberts, T.K. (2017). Diverse characteristics of the urinary excretion of amino acids in humans and the use of amino acid supplementation to reduce fatigue and sub-health in adults. *Nutr J* 16.
- Even, P.C., and Nadkarni, N.A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303, R459–R476.
- Even, P.C., Bertin, E., Gangnerau, M.-N., Roseau, S., Tome, D., and Portha, B. (2003). Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R751–759.
- FAO/WHO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation (World Health Organization).
- FAO/WHO/UNU (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March–2 April, 2011, Auckland, New Zealand.
- Fedry, J., Blais, A., Even, P.C., Piedcoq, J., Fromentin, G., Gaudichon, C., Azzout-Marniche, D., and Tomé, D. (2016). Urinary metabolic profile predicts high-fat diet sensitivity in the C57Bl6/J mouse. *J. Nutr. Biochem.* 31, 88–97.
- Fischer, L.M., daCosta, K.A., Kwock, L., Stewart, P.W., Lu, T.-S., Stabler, S.P., Allen, R.H., and Zeisel, S.H. (2007). Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1275–1285.
- Fischer, L.M., da Costa, K.-A., Kwock, L., Galanko, J., and Zeisel, S.H. (2010). Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *Am J Clin Nutr* 92, 1113–1119.
- Fisher, F.M., and Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 223–241.
- Fisher, J., Ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E.C., Mepani, R.J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., et al. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev.* 26, 271–281.
- Fon Tacer, K., Bookout, A.L., Ding, X., Kurosu, H., John, G.B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D.J., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol Endocrinol* 24, 2050–2064.
- de França, S.A., dos Santos, M.P., Przygodda, F., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Magalhães, D.A., Bezerra, K.S., Colodel, E.M., Flouris, A.D., Andrade, C.M.B., et al. (2016). A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. *Lipids* 51, 303–310.
- Geladi, P., and Kowalski, B.R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta* 185, 1–17.
- Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Amati, F., Lopez-Mejia, I.C., and Pellerin, L. (2019). Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism* 30, 833–844.e7.
- Green, C.L., Soltow, Q.A., Mitchell, S.E., Deros, D., Wang, Y., Chen, L., Han, J.-D.J., Promislow, D.E.L., Lusseau, D., Douglas, A., et al. (2019). The Effects of Graded Levels of Calorie Restriction: XIII. Global Metabolomics Screen Reveals Graded Changes in Circulating Amino Acids, Vitamins, and Bile Acids in the Plasma of C57BL/6 Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 74, 16–26.

- Habchi, B., Alves, S., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Moslah, B., Paris, A., Lécuse, Y., Gauduchon, P., Lebailly, P., Rutledge, D.N., and Rathahao-Paris, E. (2017). An innovative chemometric method for processing direct introduction high resolution mass spectrometry metabolomic data: independent component–discriminant analysis (IC–DA). *Metabolomics* 13, 45.
- Hawkins, W.B., Hanson, P.C., Coon, R.W., and Terry, R. (1949). BILE SALT METABOLISM AS INFLUENCED BY PURE AMINO ACIDS AND CASEIN DIGESTS. *J Exp Med* 90, 461–473.
- Hill, C.M., Laeger, T., Albarado, D.C., McDougal, D.H., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2017). Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. *Sci Rep* 7.
- Hill, C.M., Berthoud, H.-R., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2018). Homeostatic sensing of dietary protein restriction: A case for FGF21. *Frontiers in Neuroendocrinology* 51, 125–131.
- Hill, C.M., Laeger, T., Dehner, M., Albarado, D.C., Clarke, B., Wanders, D., Burke, S.J., Collier, J.J., Qualls-Creekmore, E., Solon-Biet, S.M., et al. (2019). FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism. *Cell Rep* 27, 2934-2947.e3.
- Hillebrand, J.J.G., de Wied, D., and Adan, R.A.H. (2002). Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23, 2283–2306.
- von Holstein-Rathlou, S., BonDurant, L., Peltekian, L., Naber, M.C., Yin, T.C., Claflin, K.E., Urizar, A.I., Madsen, A.N., Ratner, C., Holst, B., et al. (2016). FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab* 23, 335–343.
- Horiuchi, M., Takeda, T., Takanashi, H., Ozaki-Masuzawa, Y., Taguchi, Y., Toyoshima, Y., Otani, L., Kato, H., Sone-Yonezawa, M., Hakuno, F., et al. (2017). Branched-chain amino acid supplementation restores reduced insulinotropic activity of a low-protein diet through the vagus nerve in rats. *Nutr Metab (Lond)* 14.
- Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., and Rutledge, D.N. (2016). Chapter 7 - Independent Components Analysis: Theory and Applications. In *Data Handling in Science and Technology*, C. Ruckebusch, ed. (Elsevier), pp. 225–277.
- Kalhan, S.C., Uppal, S.O., Moorman, J.L., Bennett, C., Gruca, L.L., Parimi, P.S., Dasarathy, S., Serre, D., and Hanson, R.W. (2011). Metabolic and Genomic Response to Dietary Isocaloric Protein Restriction in the Rat. *J Biol Chem* 286, 5266–5277.
- Kharitonov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115, 1627–1635.
- Khodorova, N.V., Rutledge, D.N., Oberli, M., Mathiron, D., Marcelo, P., Benamouzig, R., Tomé, D., Gaudichon, C., and Pilard, S. (2019). Urinary Metabolomics Profiles Associated to Bovine Meat Ingestion in Humans. *Mol Nutr Food Res* 63, e1700834.
- Kim, K.M., Henderson, G.N., Frye, R.F., Galloway, C.D., Brown, N.J., Segal, M.S., Imaram, W., Angerhofer, A., and Johnson, R.J. (2009). Simultaneous determination of uric acid metabolites allantoin, 6-aminouracil, and triuret in human urine using liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 65–70.
- Kimura, N., Fukuwatari, T., Sasaki, R., and Shibata, K. (2006). Comparison of Metabolic Fates of Nicotinamide, NAD⁺ and NADH Administered Orally and Intraperitoneally; Characterization of Oral NADH. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52, 142–148.
- Kurpad, A.V., and Thomas, T. (2011). Methods to assess amino acid requirements in humans. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 14, 434–439.
- Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922.
- Laeger, T., Albarado, D.C., Burke, S.J., Trosclair, L., Hedgepeth, J.W., Berthoud, H.-R., Gettys, T.W., Collier, J.J., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2016). Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell Reports* 16, 707–716.
- Lakshmanan, F.L., Perera, W.D., Scrimshaw, N.S., and Young, V.R. (1976). Plasma and urinary amino acids and selected sulfur metabolites in young men fed a diet devoid of methionine and cystine. *Am J Clin Nutr* 29, 1367–1371.
- Lees, E.K., Król, E., Grant, L., Shearer, K., Wyse, C., Moncur, E., Bykowska, A.S., Mody, N., Gettys, T.W., and Delibegovic, M. (2014). Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell* 13, 817–827.
- Lehman, L.J., Olson, A.L., and Rebouche, C.J. (1987). Measurement of ϵ -N-trimethyllysine in human blood plasma and urine. *Analytical Biochemistry* 162, 137–142.
- Mai, K., Andres, J., Biedasek, K., Weicht, J., Bobbert, T., Sabath, M., Meinus, S., Reinecke, F., Möhlig, M., Weickert, M.O., et al. (2009). Free Fatty Acids Link Metabolism and Regulation of the Insulin-Sensitizing Fibroblast Growth Factor-21. *Diabetes* 58, 1532–1538.

- Maida, A., Zota, A., Sjöberg, K.A., Schumacher, J., Sijmonsma, T.P., Pfenninger, A., Christensen, M.M., Gantert, T., Fuhrmeister, J., Rothermel, U., et al. (2016). A liver stress-endocrine nexus promotes metabolic integrity during dietary protein dilution. *J Clin Invest* 126, 3263–3278.
- Mercer, L.P., Dodds, S.J., Schweisthal, M.R., and Dunn, J.D. (1989). Brain histidine and food intake in rats fed diets deficient in single amino acids. *J. Nutr.* 119, 66–74.
- Mercer, L.P., Kelley, D.S., Humphries, L.L., and Dunn, J.D. (1994). Manipulation of Central Nervous System Histamine or Histaminergic Receptors (H1) Affects Food Intake in Rats. *J Nutr* 124, 1029–1036.
- Meyer, J.H., and Hargus, W.A. (1959). Factors influencing food intake of rats fed low-protein rations. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 197, 1350–1352.
- Morton, G.J., Kaiyala, K.J., Foster-Schubert, K.E., Cummings, D.E., and Schwartz, M.W. (2014). Carbohydrate Feeding Dissociates the Postprandial FGF19 Response From Circulating Bile Acid Levels in Humans. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E241–E245.
- Nagao, K., Bannai, M., Seki, S., Mori, M., and Takahashi, M. (2009). Adaptational modification of serine and threonine metabolism in the liver to essential amino acid deficiency in rats. *Amino Acids* 36, 555–562.
- National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995). *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,: Fourth Revised Edition, 1995.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases with accession numbers AB021975 and AB025718. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492, 203–206.
- Ortega-Prieto, P., and Postic, C. (2019). Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet* 10.
- Owen, B.M., Ding, X., Morgan, D.A., Coate, K.C., Bookout, A.L., Rahmouni, K., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2014). FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab.* 20, 670–677.
- Pencharz, P.B., and Ball, R.O. (2003). Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 101–116.
- Pezeshki, A., Zapata, R.C., Singh, A., Yee, N.J., and Chelikani, P.K. (2016). Low protein diets produce divergent effects on energy balance. *Sci Rep* 6, 25145.
- Pissios, P., Hong, S., Kennedy, A.R., Prasad, D., Liu, F.-F., and Maratos-Flier, E. (2013). Methionine and choline regulate the metabolic phenotype of a ketogenic diet. *Mol Metab* 2, 306–313.
- Qiu, K., Qin, C.F., Luo, M., Zhang, X., Sun, W.J., Jiao, N., Li, D.F., and Yin, J.D. (2016). Protein Restriction with Amino Acid-Balanced Diets Shrinks Circulating Pool Size of Amino Acid by Decreasing Expression of Specific Transporters in the Small Intestine. *PLoS One* 11.
- Rana, S.K., and Sanders, T.A. (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *Br J Nutr* 56, 17–27.
- Rand, W.M., and Young, V.R. (1999). Statistical analysis of nitrogen balance data with reference to the lysine requirement in adults. *J. Nutr.* 129, 1920–1926.
- Reeds, P.J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* 130, 1835S–40S.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123, 1939–1951.
- Restelli, L.M., Oettinghaus, B., Halliday, M., Agca, C., Licci, M., Sironi, L., Savoia, C., Hench, J., Tolnay, M., Neutzner, A., et al. (2018). Neuronal Mitochondrial Dysfunction Activates the Integrated Stress Response to Induce Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Rep* 24, 1407–1414.
- Ridlon, J.M., Harris, S.C., Bhowmik, S., Kang, D.-J., and Hylemon, P.B. (2016). Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* 7, 22–39.
- Rose, W. (1957). The amino acid requirement of adult men. *Nutr Abstr Rev* 27, 631–647.
- Rothwell, N.J., Stock, M.J., and Tyzbit, R.S. (1982). Energy Balance and Mitochondrial Function in Liver and Brown Fat of Rats Fed “Cafeteria” Diets of Varying Protein Content. *J Nutr* 112, 1663–1672.
- Santoso, P., Nakata, M., Shiizaki, K., Boyang, Z., Parmila, K., Otgon-Uul, Z., Hashimoto, K., Satoh, T., Mori, M., Kuro-O, M., et al. (2017). Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep* 7, 45819.
- Schaart, M.W., Schierbeek, H., van der Schoor, S.R.D., Stoll, B., Burrin, D.G., Reeds, P.J., and van Goudoever, J.B. (2005). Threonine Utilization Is High in the Intestine of Piglets. *J Nutr* 135, 765–770.
- Shibata, K., Shiotani, M., Onodera, M., and Suzuki, T. (1991). Effects of Protein-Free Diet Feeding or Starving on the Excretion Ratio of (N^1 -Methyl-2-pyridone-5-carboxamide + N^1 -methyl-4-pyridone-3-carboxamide)/ N^1 -Methylnicotinamide. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1483–1490.

- Shimizu, N., Maruyama, T., Yoshikawa, N., Matsumiya, R., Ma, Y., Ito, N., Tasaka, Y., Kuribara-Souta, A., Miyata, K., Oike, Y., et al. (2015). A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. *Nat Commun* 6, 1–14.
- Solon-Biet, S.M., Cogger, V.C., Pulpitel, T., Heblinski, M., Wahl, D., McMahon, A.C., Warren, A., Durrant-Whyte, J., Walters, K.A., Krycer, J.R., et al. (2016). Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework. *Cell Metabolism* 24, 555–565.
- Specter, S.E., Hamilton, J.S., Stern, J.S., and Horwitz, B.A. (1995). Chronic Protein Restriction Does Not Alter Energetic Efficiency or Brown Adipose Tissue Thermogenic Capacity in Genetically Obese (fa/fa) Zucker Rats. *J Nutr* 125, 2183–2193.
- Staiger, H., Keuper, M., Berti, L., Hrabě de Angelis, M., and Häring, H.-U. (2017). Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* 38, 468–488.
- Swick, R.W., and Gribbskov, C.L. (1983). The effect of dietary protein levels on diet-induced thermogenesis in the rat. *J. Nutr.* 113, 2289–2294.
- Talukdar, S., Owen, B.M., Song, P., Hernandez, G., Zhang, Y., Zhou, Y., Scott, W.T., Paratala, B., Turner, T., Smith, A., et al. (2016). FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab.* 23, 344–349.
- Tomé, D., and Bos, C. (2007). Lysine Requirement through the Human Life Cycle. *J Nutr* 137, 1642S–1645S.
- Tomé, D., Chaumontet, C., Even, P.C., Darcel, N., Thornton, S.N., and Azzout-Marniche, D. (2020). Protein Status Modulates an Appetite for Protein To Maintain a Balanced Nutritional State-A Perspective View. *J. Agric. Food Chem.* 68, 1830–1836.
- Torres, N., Martínez, L., Alemán, G., Bourges, H., and Tovar, A.R. (1998). Histidase Expression Is Regulated by Dietary Protein at the Pretranslational Level in Rat Liver. *J Nutr* 128, 818–824.
- Torres, N., Beristain, L., Bourges, H., and Tovar, A.R. (1999). Histidine-imbalanced diets stimulate hepatic histidase gene expression in rats. *J. Nutr.* 129, 1979–1983.
- Véniant, M.M., Sivits, G., Helmering, J., Komorowski, R., Lee, J., Fan, W., Moyer, C., and Lloyd, D.J. (2015). Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* 21, 731–738.
- Vessey, D.A. (1978). The biochemical basis for the conjugation of bile acids with either glycine or taurine. *Biochem J* 174, 621–626.
- Watanabe, K., Tominari, T., Hirata, M., Matsumoto, C., Hirata, J., Murphy, G., Nagase, H., Miyaura, C., and Inada, M. (2017). Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio* 7, 1178–1185.
- Webster, A.J.F. (1993). Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proceedings of the Nutrition Society* 52, 69–76.
- Weir, J.B.D.B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol. (Lond.)* 109, 1–9.
- White, B.D., Porter, M.H., and Martin, R.J. (2000). Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol. Behav.* 69, 383–389.
- WHO/FAO/UNU (1985). Energy and protein requirements. *World Health Organ Tech Rep Ser* 724, 1–206.
- WHO/FAO/UNU (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1–265, back cover.
- Wold, S., Esbensen, K., and Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2, 37–52.
- Wu, Z., Li, M., Zhao, C., Zhou, J., Chang, Y., Li, X., Gao, P., Lu, X., Li, Y., and Xu, G. (2010). Urinary metabolomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Biosyst* 6, 2157–2163.
- Young, V.R., and Marchini, J.S. (1990). Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am J Clin Nutr* 51, 270–289.
- Young, V.R., Bier, D.M., and Pellett, P.L. (1989). A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* 50, 80–92.
- Zapata, R.C., Singh, A., Pezeshki, A., Avirineni, B.S., Patra, S., and Chelikani, P.K. (2019). Low-Protein Diets with Fixed Carbohydrate Content Promote Hyperphagia and Sympathetically Mediated Increase in Energy Expenditure. *Molecular Nutrition & Food Research* 63, 1900088.
- Zhao, X.-Q., Jørgensen, H., Gabert, V.M., and Eggum, B.O. (1996). Energy Metabolism and Protein Balance in Growing Rats Housed in 18°C or 28°C Environments and Fed Different Levels of Dietary Protein. *J Nutr* 126, 2036–2043.

Table 1a. Composition of gluten diet

	L30	T53	LT100	PLT
Amino acid content				
(g/kg)				
Cysteine	4.9	4.9	4.9	4.9
Methionine	4.9	4.9	4.9	4.9
Threonine	6.2	3.29	6.2	6.19
Lysine	2.76	9.2	9.2	11.13
Alanine	9.74	6.22	3.3	4.39
Tryptophan	2	2	2	2
Isoleucine	6.2	6.2	6.2	7.13
Leucine	10.7	10.7	10.7	12.95
Histidine	2.8	2.8	2.8	3.72
Valine	7.4	7.4	7.4	8.62
Weight content (g/kg)				
Protein				
<i>Gluten</i>	194.55	194.55	194.55	-
<i>Milk protein</i>	-	-	-	193.47
Starch	555.98	555.98	555.98	564.64
Sucrose	90.51	90.51	90.51	91.92
Soy oil	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35
Vitamin	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50
Choline	2.3	2.3	2.3	2.3

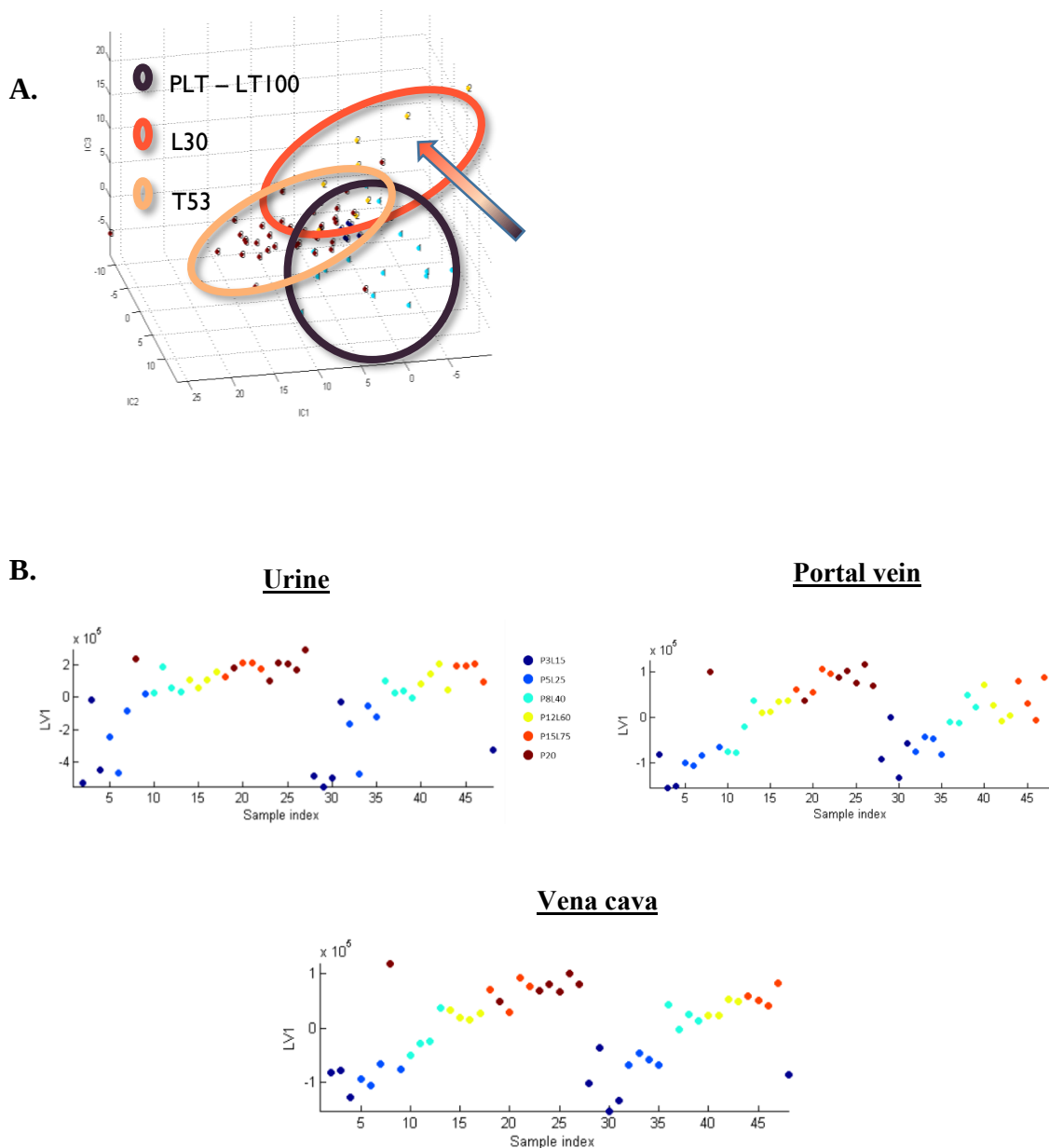
1b. Composition of lysine-deficient diet

	L15	L25	L40	L60	L75	P20	L100	L170
Amino acid content (g/kg)								
Histidine	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3,28	3.28	3.28
Isoleucine	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6,26	6.26	6.26
Leucine	13.56	13.56	13.56	13.56	13.56	13,56	13.56	13.56
Lysine	1.52	2.51	4.03	6.07	7.59	10,13	10.13	17.33
Threonine	6.11	6.11	6.11	6.11	6.11	6,11	6.11	6.11
Tryptophan	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2,98	2.98	2.98
Valine	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7,90	7.90	7.90
Arginine	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22	5,22	5.22	5.22
Methionine	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3,43	3.43	3.43
Phenylalanine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56	6.56
Alanine	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4,77	4.77	4.77
Aspartic acid	10.28	10.28	10.28	10.28	10.28	10,28	10.28	10.28
Cysteine	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1,34	1.34	1.34
Glutamic acid	27.27	27.27	27.27	27.27	27.27	27,27	27.27	27.27
Glycine	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38	2,38	2.38	2.38
Proline	12.52	12.52	12.52	12.52	12.52	12,52	12.52	12.52
Serine	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45	7,45	7.45	7.45
Tyrosine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56	6.56
Weight content (g/kg)								
Milk proteins	29	48	77	116	145	193.5	29	193.5
Starch	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4
Sucrose	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8
Soy Oil	40	40	40	40	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10	10	10	10	10
cellulose	50	50	50	50	50	50	50	50
choline	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Energy content (%)								
Protein	19.8	19.8	19.8	19.9	19.9	20	19.8	20.2
Carbohydrate	69.1	69	68.9	68.8	68.8	68.5	69.1	68.2
Fat	10.1	10.2	10.2	10.3	10.3	10.4	10.1	10.5
Energy density (kJ/g)	15	14.95	14.87	14.77	14.77	14.57	15	14.45

1c. Composition of threonine-deficient diet

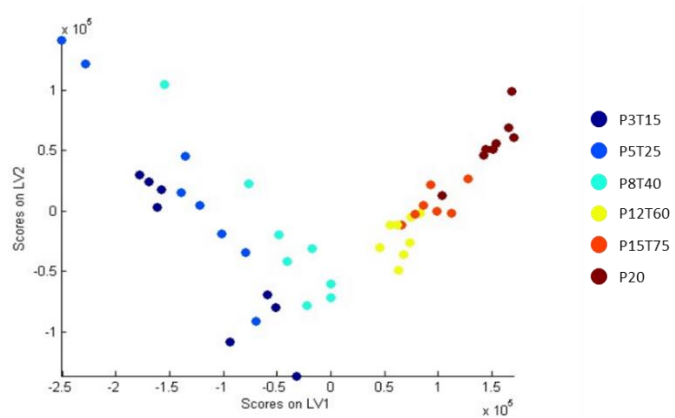
	T15	T25	T40	T60	T75	P20	T100	T170
Amino acid content (g/kg)								
Histidine	3.28	3.28	3.28	3.28	3.28	3,28	3.28	3.28
Isoleucine	6.26	6.26	6.26	6.26	6.26	6,26	6.26	6.26
Leucine	13.56	13.56	13.56	13.56	13.56	13,56	13.56	13.56
Lysine	10.13	10.13	10.13	10.13	10.13	10,13	10.13	10.13
Threonine	0.92	1.52	2.43	3.66	4.58	6,11	6.11	15.31
Tryptophan	2.98	2.98	2.98	2.98	2.98	2,98	2.98	2.98
Valine	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7,90	7.90	7.90
Arginine	5.22	5.22	5.22	5.22	5.22	5,22	5.22	5.22
Methionine	3.43	3.43	3.43	3.43	3.43	3,43	3.43	3.43
Phenylalanine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56	6.56
Alanine	4.77	4.77	4.77	4.77	4.77	4,77	4.77	4.77
Aspartic acid	10.28	10.28	10.28	10.28	10.28	10,28	10.28	10.28
Cysteine	1.34	1.34	1.34	1.34	1.34	1,34	1.34	1.34
Glutamic acid	27.27	27.27	27.27	27.27	27.27	27,27	27.27	27.27
Glycine	2.38	2.38	2.38	2.38	2.38	2,38	2.38	2.38
Proline	12.52	12.52	12.52	12.52	12.52	12,52	12.52	12.52
Serine	7.45	7.45	7.45	7.45	7.45	7,45	7.45	7.45
Tyrosine	6.56	6.56	6.56	6.56	6.56	6,56	6.56	6.56
Weight content (g/kg)								
Milk proteins	29	48	77	116	145	193.5	29	193.5
Starch	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4	576.4
Sucrose	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8	92.8
Soy Oil	40	40	40	40	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10	10	10	10	10
cellulose	50	50	50	50	50	50	50	50
choline	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
Energy content (%)								
Protein	20.2	20.3	20.5	20.7	20.9	20	20.2	20
Carbohydrate	68.3	68.2	68.1	67.9	67.7	68.5	68.3	68.5
Fat	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3	9.3
Energy density (kJ/g)	14.60	14.62	14.65	14.70	14.73	14.57	14.60	14.57

Figure 1. (A) ICDA analysis for the data obtained by LC-MS characterizing the discrimination of the predefined groups to discriminate diet based on IC1, IC2 and IC3 in urine of experiment 1. (B) PLS Analysis for the data obtained by LC-MS characterizing the discrimination of the predefined groups to discriminate lysine content diet based on LV1 in urine, portal vein and vena cava. (C) PLS Analysis for the data obtained by LC-MS characterizing the discrimination of the predefined groups to discriminate threonine content diet based on LV1 in urine, portal vein and vena cava.

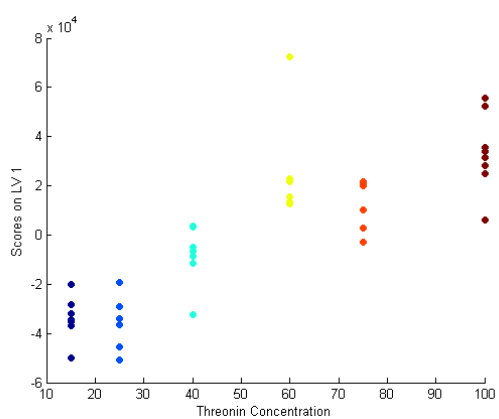


C.

Urine



Portal vein



Vena cava

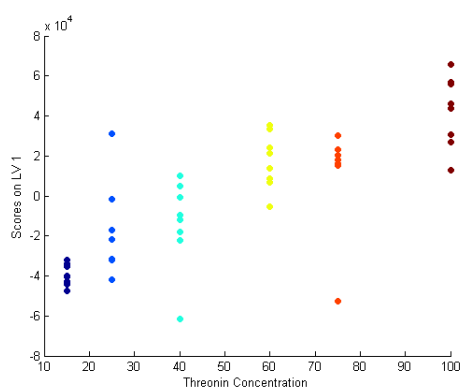


Figure 2A. Urine metabolites from gluten diet (experiment 1)

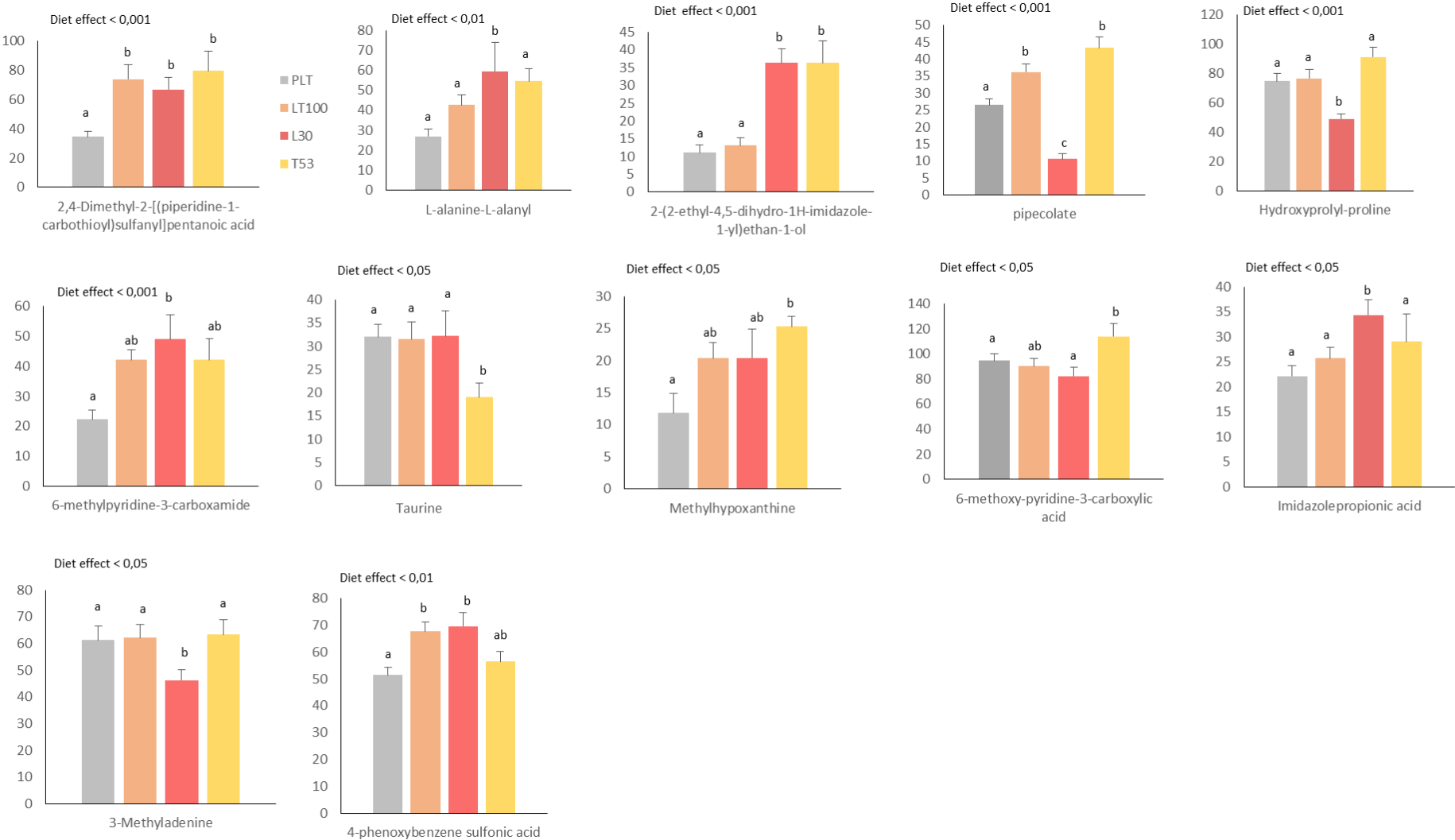
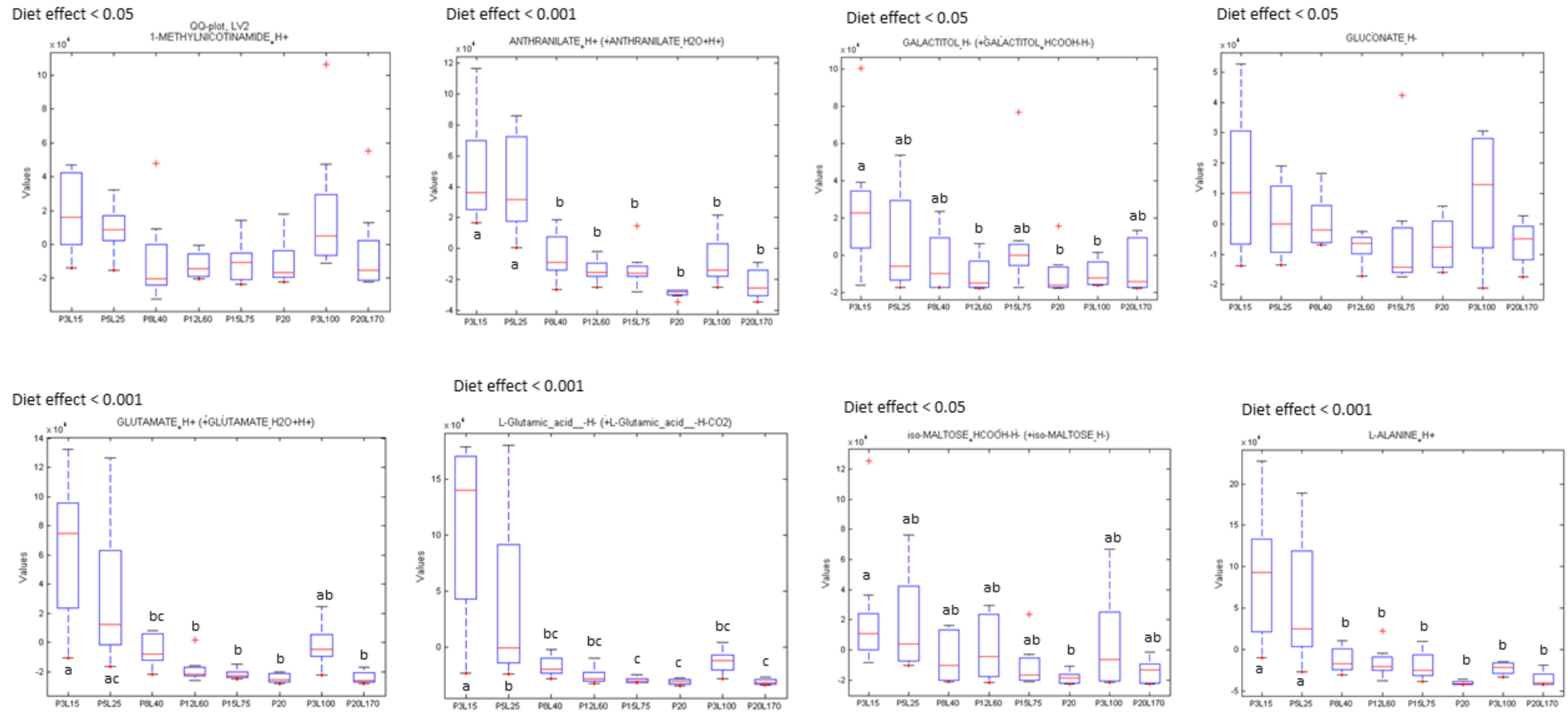
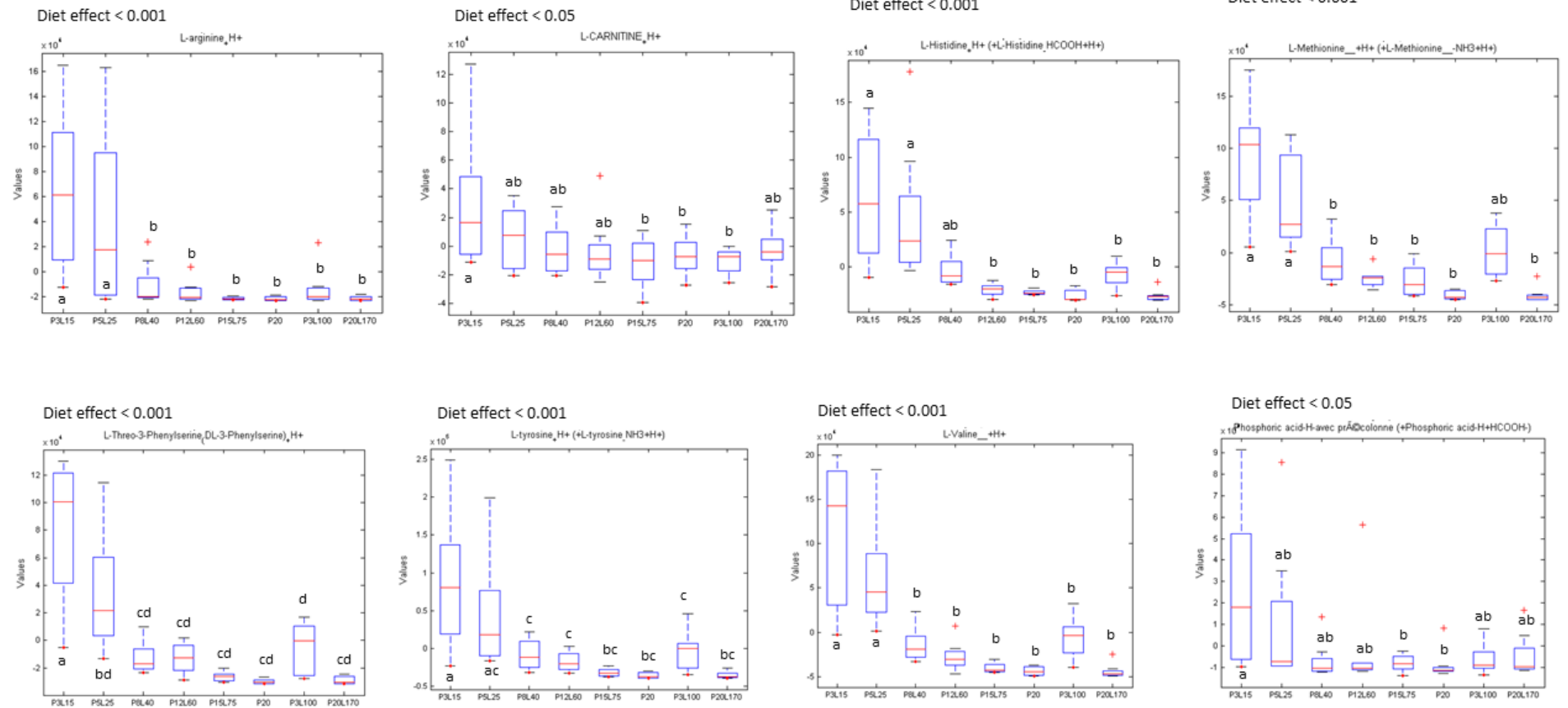
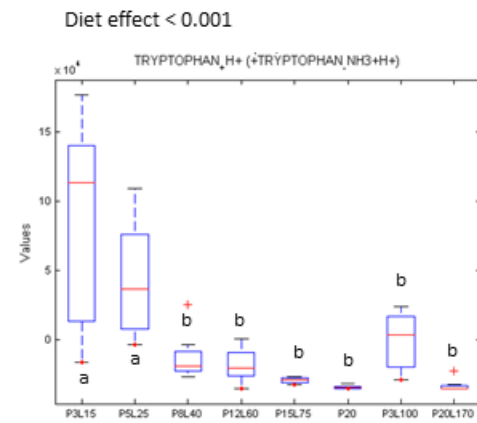
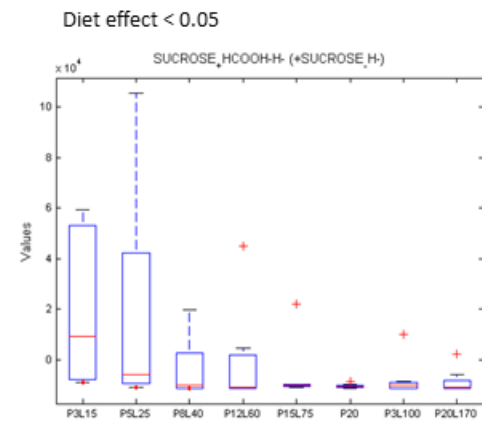
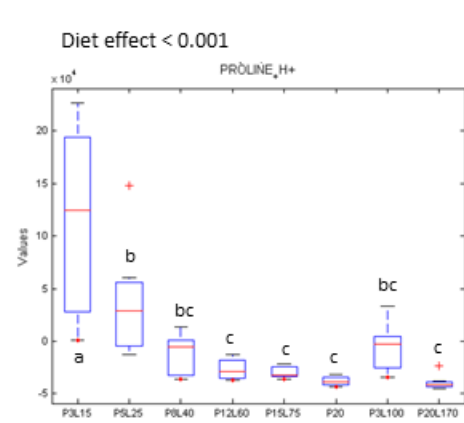


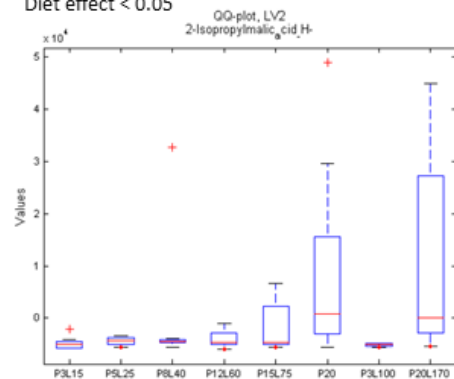
Figure 2B. Urine metabolites from lysine deficient diet (experiment 2a).



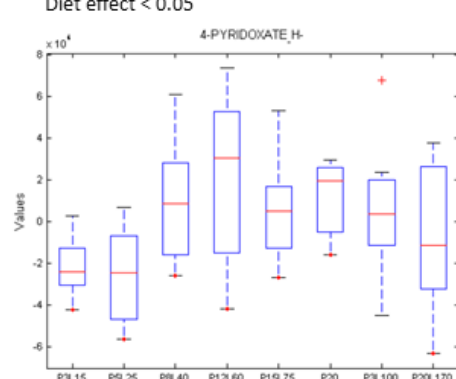




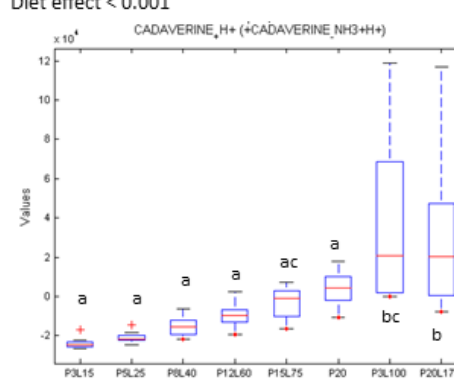
Diet effect < 0.05



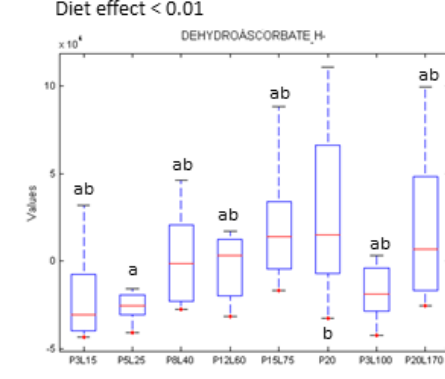
Diet effect < 0.05



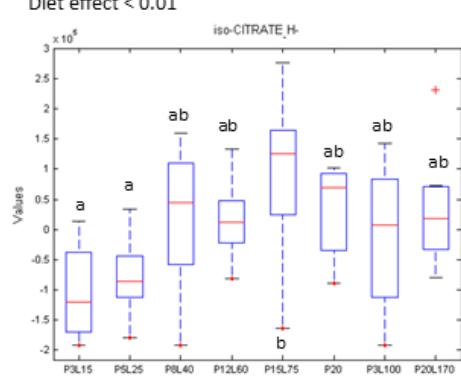
Diet effect < 0.001



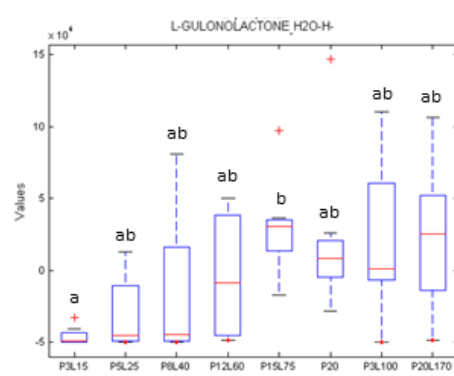
Diet effect < 0.01



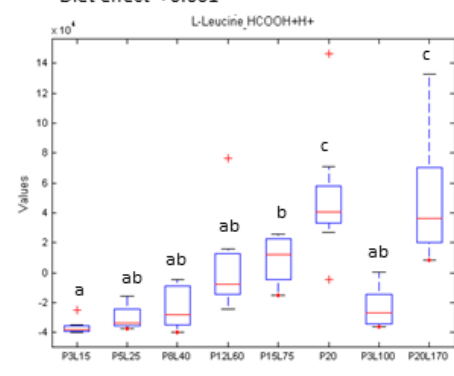
Diet effect < 0.01



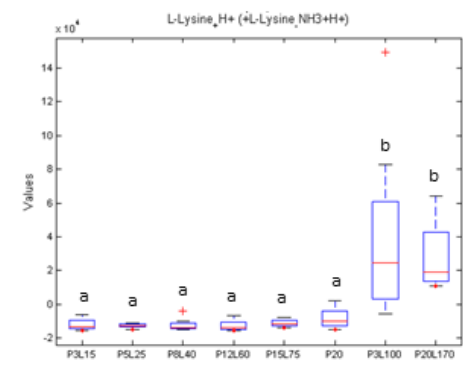
Diet effect < 0.01



Diet effect < 0.001



Diet effect < 0.001



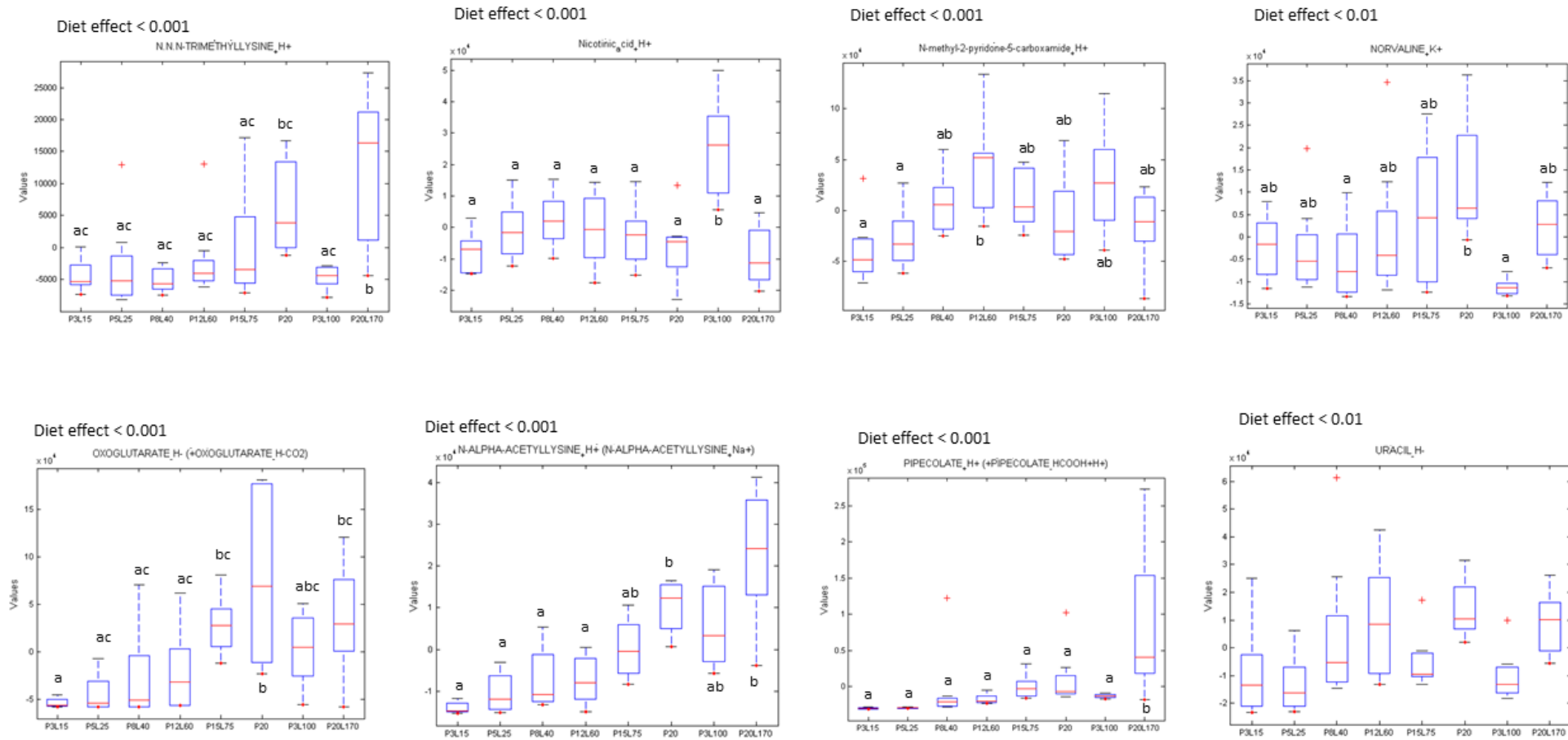
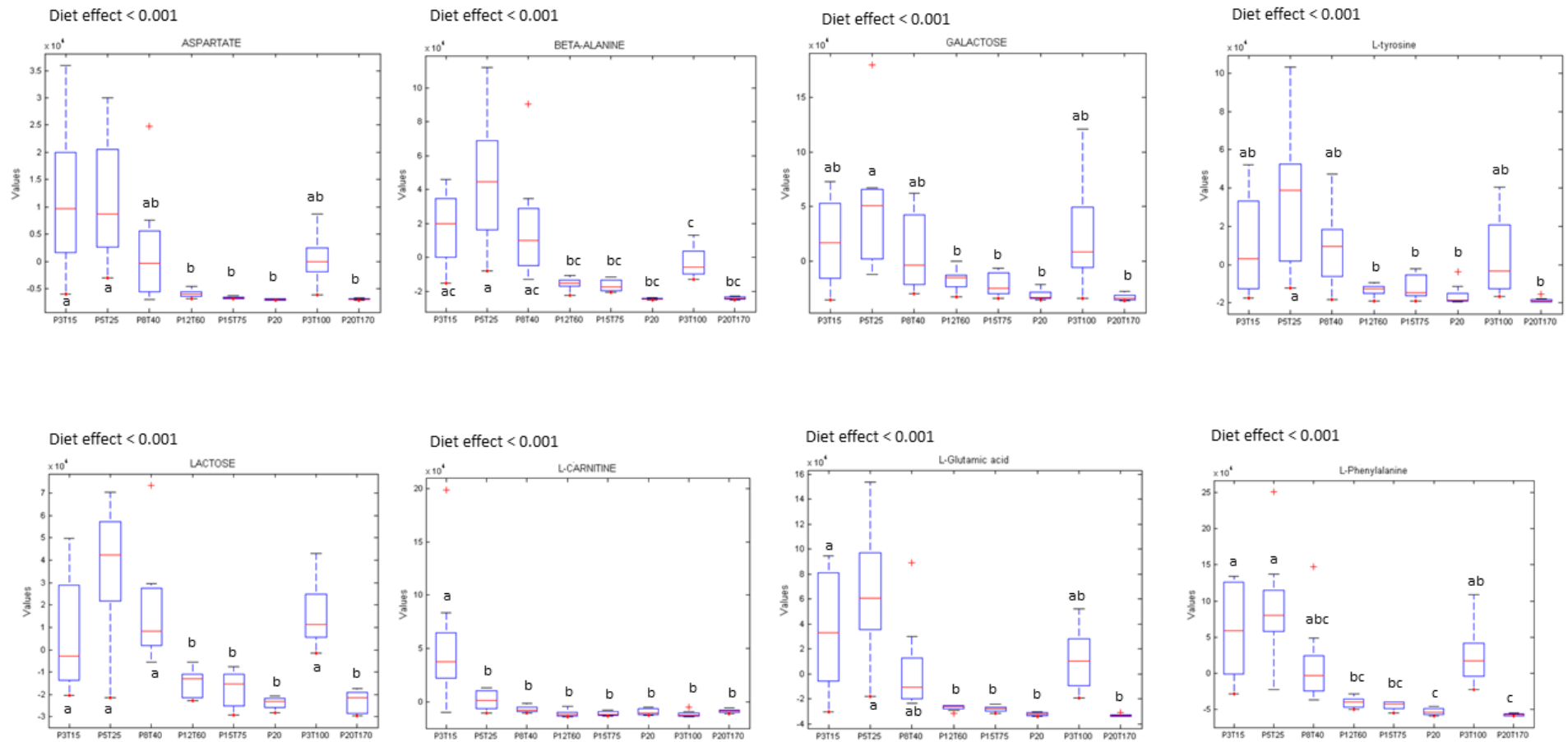
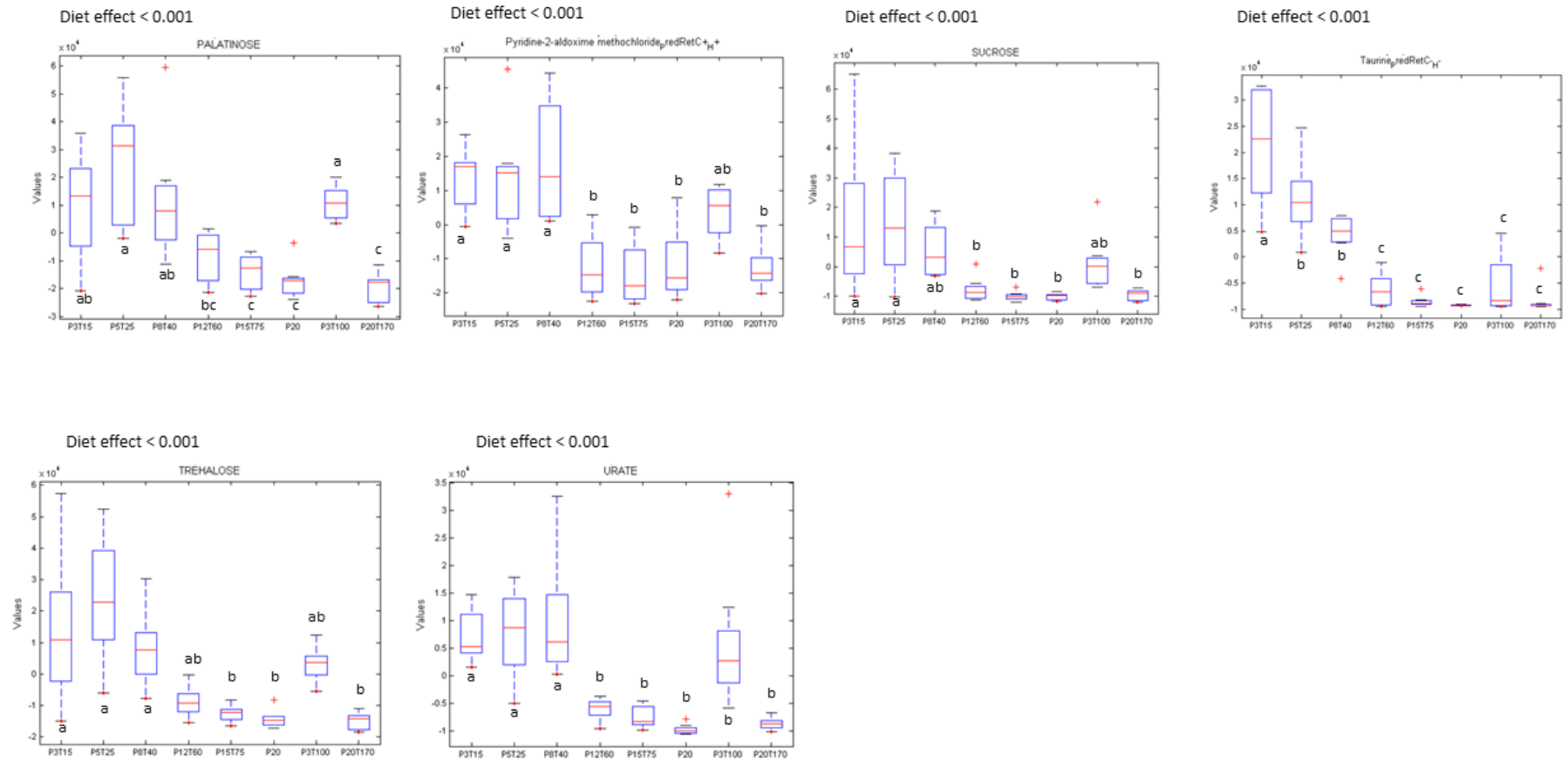
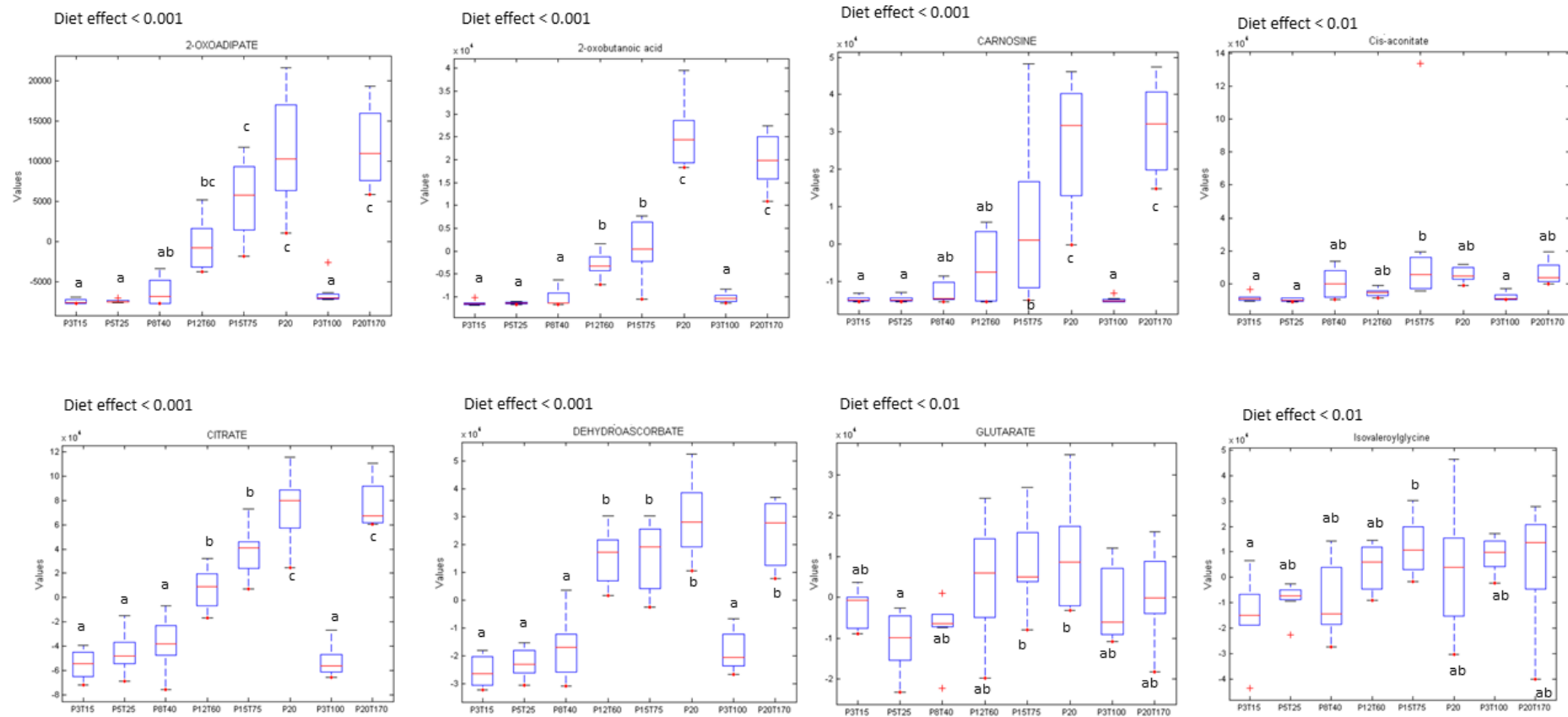
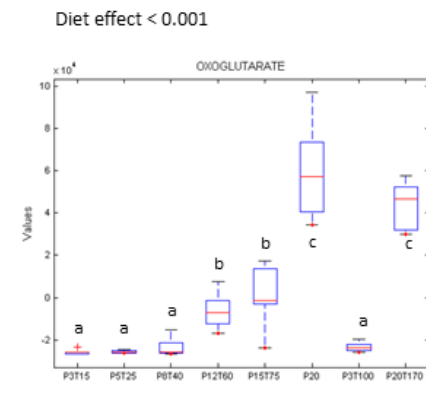
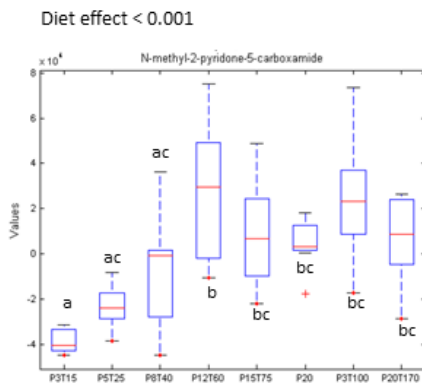
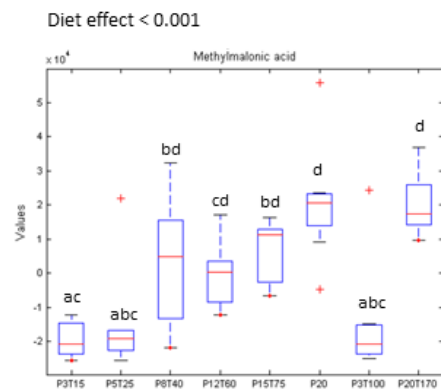
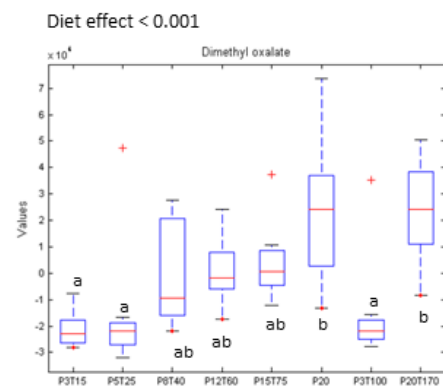


Figure 2C. Urine metabolites from threonine deficient diet (experiment 2b)









3. Chapitre III. Discussion générale et conclusion

Ce travail de thèse avait pour objectif d'évaluer les effets d'une déficience en protéines et en AAI, lysine et thréonine, sur le métabolisme énergétique et protéique, et d'identifier des biomarqueurs de la déficience en protéines et AAI (lysine et thréonine) à l'aide d'analyses métabolomiques dans différents fluides biologiques tels que l'urine et le plasma.

La discussion de nos résultats se fera en quatre parties. Premièrement, nous aborderons les effets de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur le métabolisme énergétique en discutant les effets sur la prise alimentaire, la composition corporelle, la dépense énergétique et sa régulation via FGF21. Dans un second temps, nous discuterons de l'effet de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur le métabolisme protéique en abordant la régulation de la synthèse protéique et des gènes impliqués dans le métabolisme protéique. Puis, nous discuterons du besoin en protéines, en lysine et en thréonine. Enfin, nous finirons par discuter des biomarqueurs que nous avons identifiés pouvant signer un état de déficience en protéines, lysine ou thréonine.

3.1. Effet de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur le métabolisme énergétique

Le premier objectif de cette thèse était d'analyser les conséquences de la déficience en protéines et en AAI, lysine et thréonine, sur le métabolisme énergétique chez des rats en croissance (*Article 1 p.63 et Article 2 p.95*) (Tableau 5).

La diminution de la quantité et de la qualité de l'apport protéique induit une diminution du gain de poids corporel. En accord avec la littérature, une déficience sévère en protéines (P3 et P5) ainsi qu'une déficience modérée (P8) induit une diminution du poids corporel principalement dû à une diminution de la masse maigre en comparaison aux rats P12, P15 et P20 [160,167,169]. En plus de la quantité de l'apport protéique, la qualité des protéines joue également un rôle dans le gain de poids corporel. Nos résultats indiquent qu'une déficience sévère en un AAI, lysine ou thréonine (L/T15 et L/T25), est suffisante pour entraîner la même diminution de gain de poids corporel qu'une déficience en protéines [277–280]. De plus, contrairement à la lysine, une déficience modérée en thréonine (T40) entraîne aussi une diminution du gain de poids corporel.

Tableau 5. Effets de la déficience sévère et modérée en protéines, lysine, ou thréonine sur le métabolisme énergétique, par rapport au groupe contrôle, P20

DET : dépense énergétique totale ; DER : dépense énergétique de repos ; DEA : dépense énergétique d'activité.

▼ Diminution par rapport au groupe P20, ▲ augmentation par rapport au groupe P20, = pas de différence par rapport au P20.

Déficience sévère	Protéines P3 et P5	Lysine L15 et L25	Thréonine T15 et T25
Poids	▼	▼	▼
Prise alimentaire relative	▲	▲	▲
Masse maigre	▼	▼	▼
Masse grasse	▼	=	▼
Dépense énergétique	DET ▲ en P5 DER = DEA ▲	DET = DER = DEA =	DET ▼ en T15 DER ▼ en T15 DEA =
FGF21	Foie ▲ Plasma ▲ Hypothalamus ▼	Foie ▲ Plasma ▲ Hypothalamus =	Foie ▲ Plasma ▲ Hypothalamus =
Déficience modérée	P8 et P12	L40 et L60	T40 et T60
Poids	▼ en P8	=	▼ en T40
Prise alimentaire relative	▲	▲ en L40	▲ en T40
Masse maigre	▼	=	▼ en T40
Masse grasse	=	▲ en L60	▲ en T60
Dépense énergétique	DET = DER = DEA =	DET = DER = DEA =	DET = DER = DEA =
FGF21	Foie = Plasma ▲ Hypothalamus =	Foie = Plasma = Hypothalamus =	Foie = Plasma = Hypothalamus =

Un certain nombre de travaux ont montré qu'une déficience modérée en protéines (5 à 10%) est associée à une hyperphagie [174,178–180], alors qu'une restriction sévère (moins de 5% de protéines), entraîne un phénomène d'aversion avec une prise alimentaire réduite [181]. La déficience sévère en un seul AAI est suffisante pour reproduire cet effet d'aversion [185]. Nos résultats indiquent une diminution de la quantité d'énergie ingérée chez les rats nourris avec un régime P3, T15 et T25. Cependant, lorsque la prise alimentaire est rapportée au poids du rat, nous observons une augmentation de l'apport énergétique chez les rats P3, P5, L/T15 et L/T25.

Cette augmentation de l'apport énergétique n'induit pas d'augmentation de la masse grasse chez les rats soumis à une déficience sévère en protéines, lysine ou thréonine. Chez les rats soumis à un régime faible en protéines, cela s'explique par une modification du métabolisme énergétique [160,188,192,262,281]. Les rats P5 présentent une augmentation de la dépense énergétique totale, principalement due à une augmentation de la dépense d'activité. Cet effet sur la dépense d'activité a déjà été préalablement observée chez des souris avec des régimes faibles en protéines [170]. Ce processus induit une augmentation de la dépense énergétique, compensant en partie l'augmentation de l'apport énergétique et évitant une augmentation de masse grasse. Néanmoins, lorsque la restriction protéique est trop sévère, en dessous de 5% de protéines, la dépense énergétique totale n'est pas augmentée. Une déficience en un AAI n'augmente pas la masse grasse malgré une augmentation de la prise alimentaire relative. Cependant, nous n'observons pas d'augmentation de la dépense énergétique. De plus, nos résultats indiquent qu'une déficience sévère en thréonine (T15) induit une diminution de la dépense énergétique totale et de la dépense énergétique de repos par rapport aux P20. Contrairement à ces résultats, d'autres études ont rapportés que la déficience en méthionine [202,204] ou en thréonine [203] augmente la dépense énergétique totale.

Cependant, dans ces études, les rats sont placés à 22-24°C, or la thermoneutralité des rats se situe à environ 26°C, ce qui pourrait ainsi expliquer que l'augmentation de la dépense énergétique observée est due à l'augmentation de la thermogénèse non frissonnante. Dans notre étude, les rats étant placés à 25°C, il n'y a pas d'augmentation de la thermogénèse non frissonnante. Blais et al., ont montré que chez des souris nourries avec un régime à 6% de protéines, la thermogénèse non frissonnante n'est pas augmentée lorsque les souris sont placées à thermoneutralité (30°C), mais que la dépense énergétique de repos est augmentée par la thermogénèse non-frissonnante lorsqu'elles sont à 22°C [170]. Il serait ainsi intéressant de mesurer la dépense énergétique à 22°C et à 30°C en cas de déficience en un AAI afin d'analyser l'effet sur la dépense énergétique de repos et la thermogénèse non frissonnante.

Les effets d'une déficience en protéines sur le poids, la prise alimentaire et la dépense énergétique semblent médiés par FGF21 [261]. Dans nos études, la déficience en protéines, tout comme la déficience en lysine ou en thréonine, induit une augmentation de l'expression de *Fgf21* hépatique et de sa sécrétion au niveau plasmatique. Les résultats d'expression de gènes indiquent que la diminution d'un ou plusieurs AAI dans le régime active la voie GCN2 et augmente le niveau d'ATF4. *Fgf21* ayant une séquence AARE au niveau de son promoteur, ATF4 se fixe sur cette séquence et stimule sa transcription [258]. L'augmentation de la synthèse de FGF21 dans le foie, et donc l'augmentation de sa sécrétion au niveau plasmatique, contrôle les adaptations métaboliques périphériques dont la diminution du gain de poids corporel et l'augmentation de la dépense énergétique que l'on observe en cas de déficience en protéines. D'autres mécanismes peuvent expliquer cette augmentation de dépense énergétique en cas de déficience en protéines. Zapata et al. ont notamment rapporté une implication du système nerveux sympathique

(SNS) dans l'augmentation de la dépense énergétique. Ils ont observé que cette augmentation était associée à une stimulation de la voie de signalisation β -adrénergique en cas de déficience en protéines. Ils ont aussi montré que l'administration d'un antagoniste des récepteurs β -adrénergique diminue la dépense énergétique chez des rats soumis à des régimes déficients en protéines. Cependant, il reste à déterminer comment le système sympathique peut réguler la dépense énergétique, et s'il y a ou non un lien avec la synthèse et la sécrétion de FGF21. Il serait intéressant d'analyser l'impact de régimes faibles en protéines sur la dépense énergétique en cas d'inhibition du SNS.

Malgré l'augmentation de FGF21 dans le foie et le plasma lors d'une restriction sévère en lysine ou en thréonine (L/T15, L/T25), la dépense énergétique n'est pas augmentée. Les travaux de Solon-Biet et Laeger [108,259] indiquent que l'effet d'une restriction protéique sur l'augmentation de FGF21 dans le foie est d'autant plus marquée lorsqu'elle est associée à un apport élevé en glucides. Dans nos études, la concentration plasmatique de FGF21 est deux fois plus élevée en cas de déficience en protéines que de déficience en un AAI. Les régimes déficients en protéines sont associés à une augmentation de la part des glucides, ce qui n'est pas le cas des régimes déficients en lysine ou thréonine, pouvant expliquer l'augmentation moins importante de FGF21. Cette moindre augmentation de FGF21 peut également être une explication au fait que la dépense énergétique n'est pas augmentée en cas de déficience en un AAI (lysine ou thréonine).

En parallèle, une déficience sévère en protéines (P3) entraîne une diminution de l'expression de *Fgf21* dans l'hypothalamus, qui n'est pas observée lorsqu'un seul AAI est déficient dans le régime. Il a été montré qu'une injection intracérébroventriculaire (ICV) de FGF21 diminue fortement la prise alimentaire chez la souris [282], et qu'une ICV de FGF21 chez des souris habituées à un régime faible en protéines induit une préférence pour un régime à plus haute teneur en protéines [261]. De plus, Geller et al., ont rapporté que FGF21 était synthétisé par les tanycytes dans l'hypothalamus [283]. Nous émettons alors l'hypothèse que la diminution de la synthèse de FGF21 au niveau de l'hypothalamus induit une inhibition de la satiété et est responsable de l'augmentation de la prise alimentaire. De plus, l'expression des peptides orexigènes, *Agrp* et *NPY*, n'est pas modifiée en cas de déficience en protéines, ce qui semble confirmer l'hypothèse qu'*Fgf21* hypothalamique puisse contrôler la prise alimentaire.

Cependant, une déficience sévère en lysine ou thréonine n'induit pas de diminution de l'expression de *Fgf21* hypothalamique, malgré une augmentation de la prise alimentaire. Etant donné que dans ce cas, seul l'apport en AAI est modifié et qu'il n'y a pas de modification de teneur en glucides dans le régime, ces résultats suggèrent que la synthèse de FGF21 au niveau de l'hypothalamus, serait médiée par le ratio protéines/glucides.

Points clés :

- La déficience en un AAI entraîne une diminution du gain de poids corporel, une augmentation de la prise alimentaire, et une augmentation de FGF21 hépatique et plasmatique, au même titre qu'une déficience en protéines.
- La déficience en un AAI ne reproduit pas les effets d'une déficience en protéines sur le métabolisme énergétique.
- La déficience en protéines entraîne une diminution de l'expression de *Fgf21* dans l'hypothalamus qui semble être responsable de l'augmentation de la prise alimentaire, contrairement à une déficience en un AAI qui induit une augmentation de prise alimentaire sans modifier l'expression de *Fgf21* hypothalamique.
- Dans l'hypothalamus, l'impact de FGF21 sur la prise alimentaire semble être médié par une modification du ratio protéines/glucides.

3.2. Effet de la quantité et de la qualité de l'apport protéique sur le métabolisme protéique

Le second objectif de cette thèse était d'évaluer l'impact de la déficience en protéines et en AAI, lysine et thréonine, sur le métabolisme protéique chez des rats en croissance (2.3.3.résultats complémentaires).

Dès lors qu'un AAI est déficient dans le régime, les répercussions sur le poids corporel sont importantes. La déficience en protéines, lysine ou thréonine entraîne une forte diminution de la masse maigre, due à une diminution du poids du foie, des reins, des muscles et de la carcasse. Comme nous l'avons vu en introduction, la diminution de la masse maigre en réponse à un régime déficient en protéines ou AAI peut être la conséquence d'un ralentissement du renouvellement protéique.

Nos résultats indiquent que deux heures après l'ingestion d'un repas calibré, un régime sévèrement déficient en protéines, en lysine ou en thréonine diminue la synthèse protéique dans le foie et dans le muscle, mesurée par la mesure de l'incorporation de valine ^{13}C dans les protéines nouvellement synthétisées en 30 min. Malgré une diminution de la vitesse de synthèse protéique, l'analyse des voies de régulation impliquées dans la synthèse protéique montre que les ARNm codant 4EBP-1 sont augmentés et suggèrent ainsi que la voie mTOR est activée en cas de restriction sévère en protéines, lysine ou thréonine dans le foie et dans le muscle. Cependant, l'activation des voies de signalisation étant régulée principalement par des mécanismes de phosphorylation, ces résultats sont en attente de confirmation par des western blot. En outre, l'étude de la voie GCN2 dans le foie et dans le muscle, montre que la déficience en protéines, en lysine et en thréonine augmente l'expression des cibles de GCN2: eIF2 α , ATF4, CHOP et TRB3 en cas de déficience sévère en protéines et en lysine, et CHOP et TRB3 en cas de

déficience sévère en thréonine. Ainsi, la voie GCN2 semble être activée en cas de déficiences en protéines et en un AAI ayant pour rôle de bloquer l'étape d'initiation de la traduction de la synthèse protéique. Ces résultats confirment que la synthèse protéique est diminuée dans les situations de déficience en protéines, en lysine et en thréonine.

Tableau 6. Effets de la déficience sévère et modérée en protéines, lysine, ou thréonine sur le métabolisme protéique, par rapport au groupe contrôle, P20.

↓ Diminution par rapport au groupe P20, ↑ augmentation par rapport au groupe P20, = pas de différence par rapport au P20.

Déficience sévère		Protéines P3 et P5	Lysine L15 et L25	Thrénine T15 et T25
Poids		↓	↓	↓
Masse maigre		↓	↓	↓
Synthèse protéique		Foie ↓ Muscle ↓	Foie ↓ Muscle ↓	Foie ↓ Muscle ↓
Protéolyse		Foie ↑ Muscle ↑ en P3	Foie = Muscle ↑ en P3L15	Foie = Muscle =
AAI	Veine porte	↓	=	↓
	Veine cave	=	=	↓
AA	Veine porte	=	=	↓
	Veine cave	↑	=	↓
Déficience modérée		P8 et P12	L40 et L60	T40 et T60
Poids		↓ en P8	=	↓
Masse maigre		↓ en P8	=	↓
Synthèse protéique		Foie = Muscle =	Foie = Muscle =	Foie = Muscle ↓
Protéolyse		Foie = Muscle =	Foie = Muscle =	Foie = Muscle =
AAI	Veine porte	↓	=	=
	Veine cave	=	=	=
AA	Veine porte	=	=	↓ en L40
	Veine cave	=	=	=

L'étude des différentes voies de la protéolyse, telles que la voie ubiquitine-protéasome, l'autophagie, les calpaïnes et les caspases, indique une augmentation de la protéolyse dans le foie en cas de restriction sévère en protéines. Ces résultats sont accord avec les travaux de Henagan et Wykes qui ont montré une diminution de la synthèse protéique et une augmentation de la protéolyse hépatique en réponse à un régime faible en protéines [218,222]. Néanmoins, la déficience en lysine ou thréonine n'a pas d'impact sur la protéolyse hépatique. De plus, seule une déficience sévère en lysine (L15) entraîne une augmentation de la protéolyse musculaire avec une augmentation de l'expression des ARNm codant l'ubiquitine, ULK1 et la calpaïne 2.

L'ensemble de nos résultats indiquent que la diminution de l'ensemble des AAI dans le régime active le catabolisme hépatique conduisant à une augmentation des AAI dans la circulation générale afin de répondre aux besoins métaboliques des différents organes, et contrebalancer la déficience en AAI du régime. Ainsi, si la concentration de l'ensemble des AAI est diminuée dans la veine porte, il n'y a plus d'effet dans la veine cave de la déficience d'apport en protéines et à l'inverse les AA non indispensables sont augmentés. Cependant, lorsqu'un seul AAI est déficient, le processus de catabolisme hépatique ne semble pas augmenté. Le dosage des AA plasmatiques dans la veine porte et la veine cave montre que la déficience en lysine entraîne une diminution de sa concentration plasmatique mais n'a pas d'effets sur la concentration globale des AAI dans la veine porte. Dans la veine cave, les mêmes résultats ont été obtenus avec une diminution de la concentration en lysine sans modification de la concentration des autres AAI. Ces résultats confirment que la protéolyse hépatique n'est pas impliquée dans l'approvisionnement en lysine de l'organisme, quand l'apport alimentaire est déficient en cet AAI. Contrairement à la déficience en thréonine, qui entraîne une diminution de l'ensemble des AAI dans la veine porte et dans la veine cave mais sans modification de la concentration en thréonine. Cela peut être expliqué par le rôle de la thréonine dans la physiologie intestinale. En effet, la thréonine participe à la synthèse des glycoprotéines du mucus, les mucines, qui ont pour rôle de recouvrir et protéger l'épithélium intestinal [284]. Hamard et al. ont rapporté que la déficience en thréonine est responsable d'une augmentation de la perméabilité para cellulaire et cause des altérations structurelles et fonctionnelles au niveau de l'intestin [232]. Nous pouvons ainsi supposer que les régimes déficients en thréonine diminuent la digestion des protéines alimentaires ayant pour conséquence une diminution des AAI qui arrivent au niveau de la veine porte. Nous avons montré que la protéolyse hépatique n'était pas augmentée lorsqu'un seul AAI était déficient dans le régime, ce qui entraîne alors une diminution des AAI dans la veine cave chez les rats soumis à un régime déficient en thréonine.

Un excès en AA, lysine ou thréonine (L/T170) n'induit pas de modification du poids corporel, de la synthèse protéique ou de la protéolyse. De plus, l'ajout d'AA libres dans les groupes L/T100 n'impact pas non plus le métabolisme protéique

Points clés :

- La déficience en un AAI reproduit les effets d'une déficience en protéines sur la synthèse protéique.
- La déficience sévère en un AAI n'est pas suffisante pour induire une augmentation de la protéolyse comme le fait une déficience en protéines.
- La déficience en lysine entraîne une augmentation de la protéolyse seulement au niveau du muscle.
- La déficience en thréonine n'a pas d'effet sur la protéolyse.

3.3. Besoin en protéines et acides aminés indispensables du rat en croissance

Nos résultats indiquent qu'un apport protéique de 8% (P8) diminue le gain de poids corporel mais n'a pas d'effet sur les autres paramètres étudiés du métabolisme protéique et énergétique. Lorsque l'apport en protéines est supérieur à 12% (P12), l'ensemble de ces paramètres ne sont plus impactés. Ces résultats sont surprenants puisque selon le NRC, 1995, le besoin en protéines des rats en croissance est estimé à 15 % [274], et les recommandations d'apport sont de 20% selon l'AIN [275]. Nos résultats suggèrent donc que le besoin en protéines pour le rat en croissance serait plus proche de 12%. Cette valeur du besoin avait été préalablement estimée par le NRC, 1978 [285]. Cependant, ils ont montré que cet apport était suffisant lorsque la protéine avait une bonne digestibilité. Mais dans le cas contraire, un apport de 12% n'était pas suffisant pour couvrir l'ensemble des besoins métaboliques. Ainsi, la valeur de 15% a été considéré comme optimale afin de garantir la couverture du besoin.

Concernant le besoin en AAI, il est estimé à 9.2 g/kg pour la lysine et 6.2 g/kg pour la thréonine. Nos résultats montrent qu'un apport de 40% de ce besoin en lysine est suffisant pour ne pas modifier le métabolisme protéique et énergétique. Pour la thréonine, un apport de 40% de ce besoin diminue le poids, la masse maigre et la synthèse protéique musculaire, mais lorsque l'apport atteint 60% du besoin, les effets sur la composition corporelle sont annulés. Ainsi, d'après nos résultats, le besoin serait couvert avec un apport minimum de 40 % du besoin en lysine (3.68 g/kg), et de 60% du besoin en thréonine (3.72 g/kg).

3.4. Biomarqueurs de la déficience en acides aminés indispensables, lysine et thréonine

Enfin, le dernier objectif de cette thèse était d'identifier des biomarqueurs du besoin en AAI, lysine et thréonine, à l'aide d'analyses métabolomiques dans différents fluides biologiques tels que l'urine, et le

plasma de la veine porte et de la veine cave. Les deux méthodes d'analyses multivariées utilisées, PLS et ICDA, ont permis d'identifier des molécules discriminantes entre les différents groupes de régimes dans les trois fluides biologiques analysés : urine, veine porte et veine cave.

Dans une première étude, nous avons utilisé une protéine naturellement déficiente en lysine et en thréonine, le gluten. Les analyses de métabolomiques non-ciblées sur ces échantillons d'urine nous ont permis d'identifier des métabolites spécifiques de la déficience en lysine et en thréonine : le pipecolate et la taurine. Le pipecolate est diminué en réponse à un régime déficient en lysine, et la taurine est diminuée en cas de déficience en thréonine. Dans le but d'approfondir ces résultats, trois autres expérimentations ont été menées afin d'étudier les effets des différents niveaux d'apports en protéines (3% à 20%), en lysine ou en thréonine (15% à 170%) afin d'identifier le profil des biomarqueurs en fonction des différents niveaux d'apport.

Des analyses de métabolomiques ciblées ont porté sur les métabolites de l'urine, de la veine porte et de la veine cave. Parmi les métabolites observés, nous avons retrouvés les candidats préalablement identifiés, le pipecolate et la taurine. Le pipecolate est capable de discriminer les différents groupes d'apport en lysine. Une déficience en lysine induisant une diminution de sa concentration dans les urines. Il est également diminué dans les urines en cas de déficience en protéines. En revanche, il ne discrimine pas les groupes de régimes déficients en thréonine. Ces résultats suggèrent que ce biomarqueur, qui est un métabolite issu de la dégradation de la lysine (**Figure 19**), est spécifique d'une déficience en lysine. Ainsi, lorsque le niveau de lysine diminue dans les régimes, son niveau diminue également. De façon intéressante, lorsque le niveau d'apport en lysine dépasse le besoin, le pipecolate semble augmenter mais la variabilité dans le groupe L170 est trop importante pour l'estimer. Pour les analyses métabolomiques, l'urine de 24 h a été collectée en cages métaboliques et le facteur de dilution n'a pas été pris en compte dans notre étude. Il serait intéressant de refaire l'expérimentation en prenant en compte la dilution des urines pour étudier la variation du pipecolate lorsque la lysine est en excès, afin d'évaluer si ce marqueur de la déficience peut également être un marqueur de l'excès de lysine.

Concernant la thréonine, nous avons observé que la taurine était un métabolite discriminant entre les différents groupes d'apports. Elle est présente dans les urines de rats soumis à un régime déficient en thréonine. En cas de déficience en lysine, la taurine n'est pas présente dans les urines. Il semblerait donc qu'elle soit spécifique d'une déficience en thréonine (**Figure 20**). Cependant, elle est diminuée dans le régime à base de gluten déficient en thréonine (T53) et augmentée en cas de déficience sévère (T15 et T25) et modérée (T40) en thréonine dans les régimes à base de protéines de lait. Bassat et al. ont rapporté que chez des rats, l'effet hypocholestérolémiant du gluten augmente le turnover du cholestérol avec une augmentation de sa biosynthèse et de son excrétion sous forme de cholestérol et d'acides biliaires [287], ce qui peut alors influencer la concentration en taurine dans le régime à base de gluten. Lorsque l'apport en protéines est faible, la taurine est retrouvée, mais sous forme d'acide taurocholique dans les plasmas.

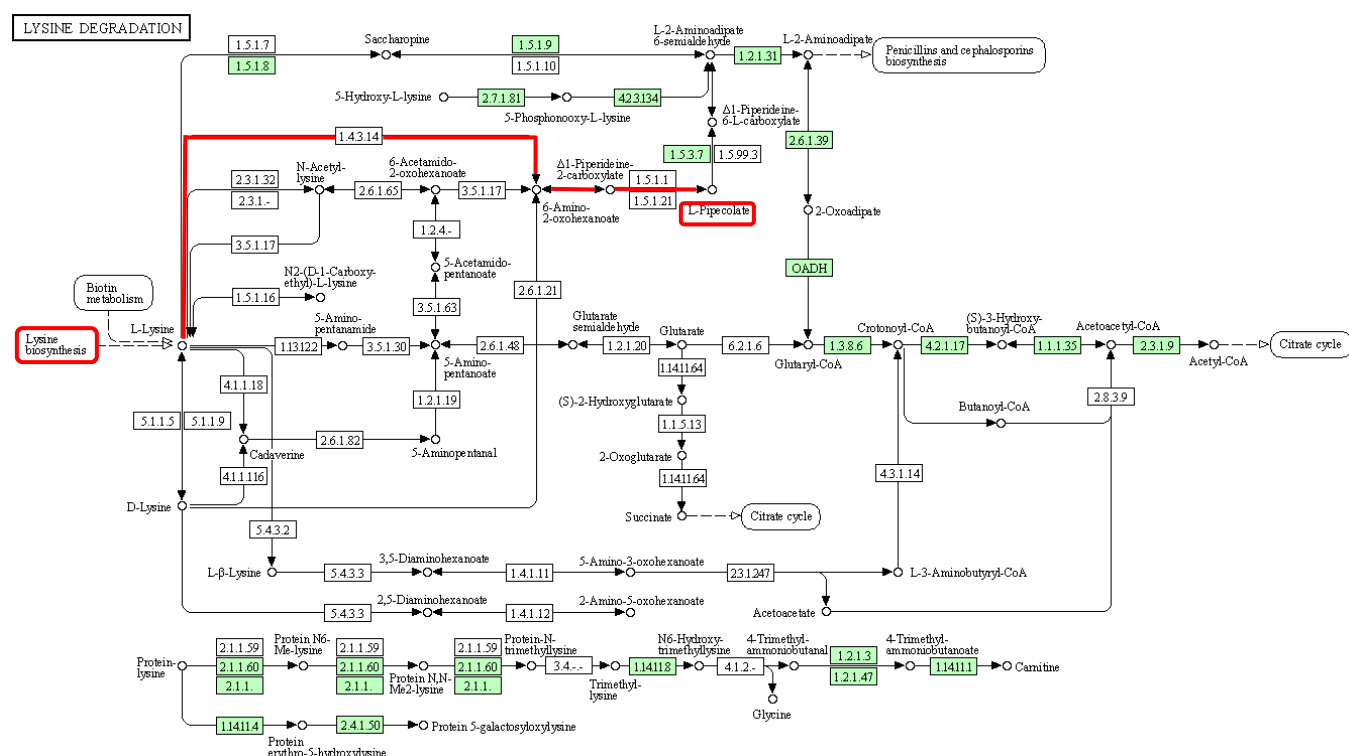


Figure 19. Voie de dégradation de la lysine [286]

Les cases indiquées en vert sont les voies métaboliques actives chez l'homme. La lysine et le pipecolate sont encadrés dans ce schéma métabolique en rouge. Le lien métabolique est indiqué en rouge.

Par ailleurs, une étude a montré que le microbiote était impliqué dans la biotransformation des acides biliaries. Il joue un rôle dans l'hydrolyse des acides biliaries conjugués en acides biliaries et taurine ou glycine [288]. Il semble donc qu'il y ait un lien entre la thréonine, la taurine et les acides biliaries. Les données de la littérature mettent en évidence que ce sont plutôt les AA soufrés qui seraient liés à la production de taurine. De façon intéressante, les voies métaboliques des AA soufrés sont liées à la thréonine (**Figure 20**). Ainsi, la production de taurine est dépendante de la présence de ces AA. Le gluten, régime déficient en thréonine (T53), qui diminue la taurine, contient deux fois plus d'AA soufrés que la protéine de lait, ce qui pourrait expliquer les différences de production de taurine observée dans nos études. Ce lien entre thréonine et taurine reste à préciser et ses niveaux de variations en cas de déficience en thréonine restent à approfondir.

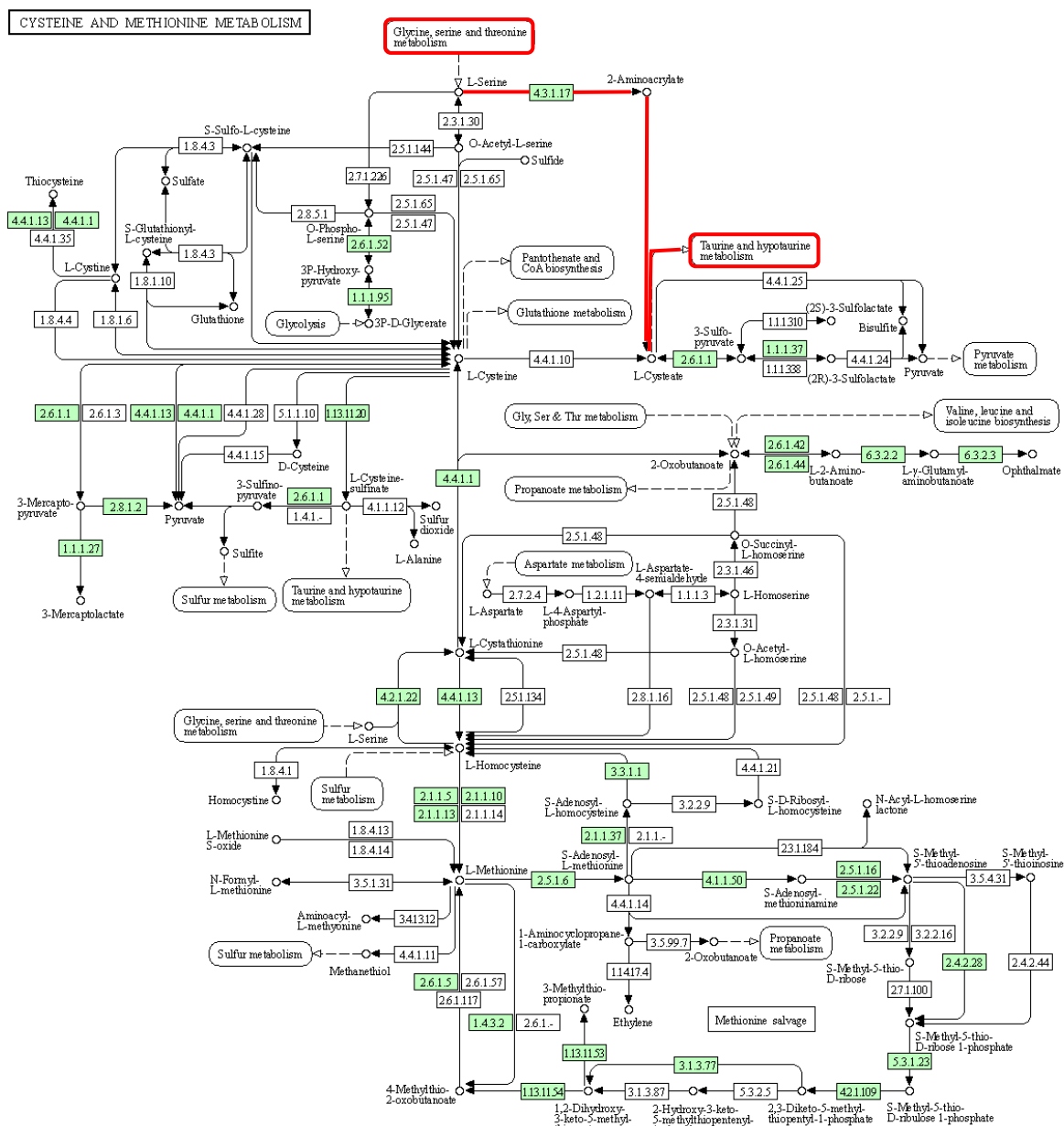


Figure 20. Métabolisme de la thréonine et de la taurine [286]

Les cases indiquées en vert sont les voies métaboliques actives chez l'homme. La thréonine et la taurine sont encadrés dans ce schéma métabolique en rouge. Le lien métabolique est indiqué en rouge.

L'un des objectifs de cette thèse était d'identifier des biomarqueurs de la déficience en AAI, lysine et thréonine. Les analyses de métabolomique nous ont ainsi permis d'identifier deux candidats potentiels, le pipicolate et la taurine. Le pipicolate semble signer une déficience en lysine, et la taurine, une déficience en thréonine. Des travaux supplémentaires restent nécessaires pour valider ces marqueurs. L'objectif final étant de mettre au point un dosage urinaire de ces marqueurs pour évaluer le statut en AAI d'un individu afin de faciliter la prise en charge de la malnutrition. Le dosage urinaire a l'avantage d'être réalisé facilement et de façon non-invasive. Une grande partie des cas de malnutritions se trouvant dans

les pays en voie de développement, ce serait un avantage majeur pour déterminer rapidement l'état nutritionnel d'un individu. De plus, il serait facilement réalisable sur des populations fragiles telles que les enfants ou les personnes âgées.

3.5. Conclusion

Ces travaux de thèse ont permis de mieux caractériser l'impact d'une déficience en protéines sur le métabolisme énergétique et protéique, et d'évaluer les conséquences d'une déficience en un AAI, lysine et thréonine, chez le rat en croissance. Nous avons montré qu'une déficience en protéines induit une augmentation de la dépense énergétique due à une augmentation énergétique du coût de l'activité. Il semble que l'augmentation de la dépense énergétique soit contrôlée par la sécrétion de FGF21 hépatique et plasmatique. En revanche, l'augmentation de la prise alimentaire induite par une restriction protéique semble être contrôlée par FGF21 hypothalamique. Une déficience en un AAI, lysine ou thréonine, est suffisante pour induire une augmentation de la prise alimentaire et une augmentation de la synthèse et de la sécrétion plasmatique de FGF21. Cependant, elle n'est pas suffisante pour augmenter la dépense énergétique. De plus, dans l'hypothalamus, l'expression de *Fgf21* n'est pas modulée par l'apport en AAI. Ces résultats supposent que l'implication de FGF21 dans la dépense énergétique et la prise alimentaire nécessite une augmentation des glucides en plus de la diminution des protéines dans le régime.

A ce jour, les méthodes utilisées pour déterminer le besoin en AAI sont de mise en œuvre complexe car elles requièrent des protocoles invasifs et coûteux, et les résultats obtenus selon les différentes méthodes présentent d'importantes variations. C'est pourquoi la FAO a recommandé de développer des approches plus précises et non invasives [28]. Les résultats de nos **articles 3 et 4** montrent que l'analyse des métabolites urinaires et plasmatiques permet de détecter une déficience en AAI. En analysant les niveaux de pipécolate et de taurine, il semble possible de déterminer un état de déficience en ces AAI. De plus, la majorité des métabolites retrouvés dans les échantillons plasmatiques sont similaires à ceux retrouvés dans les urines. Ainsi, le prélèvement d'urine, qui est non-invasif et facilement réalisable, pourrait être une nouvelle méthode pour mesurer le besoin en AAI. Afin de confirmer ces deux biomarqueurs, il serait intéressant d'analyser le profil métabolomique des urines après une supplémentation en AAI chez des rats dans le but de voir si ces métabolites sont diminués. En plus de la lysine et de la thréonine, il serait intéressant de rechercher des biomarqueurs des autres AAI, comme par exemple la méthionine, qui est un AAI déficient dans les légumineuses. Enfin, après ces études précliniques chez l'animal, l'analyse de ces biomarqueurs devra être validée chez l'homme, et notamment chez les enfants qui ont un apport alimentaire déficient en AAI.

Références

1. WHO/FAO/UNU Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser* **2007**, 1–265, back cover.
2. UNICEF Global Nutrition Report 2020 Available online: <https://data.unicef.org/resources/global-nutrition-report-2020/> (accessed on Nov 10, 2020).
3. Grover, Z.; Ee, L.C. Protein energy malnutrition. *Pediatr. Clin. North Am.* **2009**, *56*, 1055–1068, doi:10.1016/j.pcl.2009.07.001.
4. de Onís, M.; Monteiro, C.; Akré, J.; Glugston, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. *Bull World Health Organ* **1993**, *71*, 703–712.
5. WHO Use and interpretation of anthropometric indicators of nutritional status. *Bull World Health Organ* **1986**, *64*, 929–941.
6. Schönfeldt, H.C.; Gibson Hall, N. Dietary protein quality and malnutrition in Africa. *Br J Nutr* **2012**, *108 Suppl 2*, S69-76, doi:10.1017/S0007114512002553.
7. Pellett, P.L. World Essential Amino Acid Supply with Special Attention to South-East Asia. *Food Nutr Bull* **1996**, *17*, 1–31, doi:10.1177/156482659601700304.
8. FAO AMINO-ACID CONTENT OF FOODS AND BIOLOGICAL DATA ON PROTEINS Available online: <http://www.fao.org/3/ac854t/AC854T00.htm> (accessed on Oct 17, 2020).
9. Boutry, C.; Bos, C.; Tomé, D. Les besoins en acides aminés. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **2008**, *22*, 151–160, doi:10.1016/j.nupar.2008.10.005.
10. AFSSA Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail Available online: <https://www.anses.fr/fr/content/apport-en-prot%C3%A9ines-consommation-qualit%C3%A9-besoins-et-recommandations-2> (accessed on Jun 17, 2020).
11. Reeds, P.J. Dispensable and indispensable amino acids for humans. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1835S–40S, doi:10.1093/jn/130.7.1835S.
12. Rose, W. The amino acid requirement of adult men. *Nutr Abstr Rev* **1957**, *27*, 631–647.
13. Meister, A. Transamination. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006; pp. 185–246 ISBN 978-0-470-12261-7.
14. EFSA Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal* **2012**, *10*, 2557, doi:10.2903/j.efsa.2012.2557.

15. Gaull, G.; Sturman, J.A.; Räihä, N.C.R. Development of Mammalian Sulfur Metabolism: Absence of Cystathionase in Human Fetal Tissues. *Pediatric Research* **1972**, *6*, 538–547, doi:10.1203/00006450-197206000-00002.
16. Viña, J.; Vento, M.; García-Sala, F.; Puertes, I.R.; Gascó, E.; Sastre, J.; Asensi, M.; Pallardó, F.V. L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 1067–1069, doi:10.1093/ajcn/61.4.1067.
17. Seifter, E.; Rettura, G.; Barbul, A.; Levenson, S.M. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* **1978**, *84*, 224–230.
18. Arnal, B.; Benamouzig; Boirie; Cynober; Dardevet; Darmaun; Dupin; Fromentin; Gaudichon Dossier scientifique de l'IFN N 9 - Les protéines Available online: <https://docplayer.fr/1495281-Dossier-scientifique-de-l-ifn-n-9-les-proteines.html> (accessed on Jun 17, 2020).
19. Goodman, B.E. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education* **2010**, *34*, 44–53, doi:10.1152/advan.00094.2009.
20. Floc'H, N.L.; Sève, B. Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du porc: de la digestion à l'apparition dans la veine porte. **2000**, *13*.
21. Gray, G.M.; Cooper, H.L. Protein Digestion and Absorption. *Gastroenterology* **1971**, *61*, 535–544, doi:10.1016/S0016-5085(19)33506-1.
22. Gausserès, N.; Mahé, S.; Benamouzig, R.; Luengo, C.; Drouet, H.; Rautureau, J.; Tomé, D. The gastro-ileal digestion of 15N-labelled pea nitrogen in adult humans. *British Journal of Nutrition* **1996**, *76*, 75–85, doi:10.1079/BJN19960010.
23. Darmaun, D. Intestin et métabolisme de la glutamine. *médecine/sciences* **1993**, *9*, 884, doi:10.4267/10608/3008.
24. Kight, C.E.; Fleming, S.E. Transamination processes promote incomplete glutamine oxidation in small intestine epithelial cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **1995**, *6*, 27–37, doi:10.1016/0955-2863(94)00004-6.
25. Matthews, D.E.; Marano, M.A.; Campbell, R.G. Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamic acid in humans. *Am J Physiol* **1993**, *264*, E848–E854, doi:10.1152/ajpendo.1993.264.6.E848.
26. Watford, M. Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. *Biochim Biophys Acta* **1994**, *1200*, 73–78, doi:10.1016/0304-4165(94)90029-9.
27. Twombly, J.; Meyer, J.H. Endogenous Nitrogen Secretions into the Digestive Tract. *J Nutr* **1961**, *74*, 453–460, doi:10.1093/jn/74.4.453.

28. FAO/WHO/UNU Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. **2013**.
29. Wu, G. Dietary protein intake and human health. *Food & Function* **2016**, 7, 1251–1265, doi:10.1039/c5fo01530h.
30. Gilani, G.S.; Xiao, C.W.; Cockell, K.A. Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition* **2012**, 108, S315–S332, doi:10.1017/S0007114512002371.
31. Lacroix, M.; Léonil, J.; Bos, C.; Henry, G.; Airinei, G.; Fauquant, J.; Tomé, D.; Gaudichon, C. Heat Markers and Quality Indexes of Industrially Heat-Treated [15N] Milk Protein Measured in Rats. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 1508–1517, doi:10.1021/jf051304d.
32. Boirie, Y.; Dangin, M.; Gachon, P.; Vasson, M.P.; Maubois, J.L.; Beaufrère, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, 94, 14930–14935, doi:10.1073/pnas.94.26.14930.
33. Chardigny, J.-M.; Walrand, S. Plant protein for food: opportunities and bottlenecks. *OCL* **2016**, 23, D404, doi:10.1051/ocl/2016019.
34. Harris, H.A.; Neuberger, A.; Sanger, F. Lysine deficiency in young rats. *Biochem J* **1943**, 37, 508–513.
35. Young, V.R.; Marchini, J.S. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *Am J Clin Nutr* **1990**, 51, 270–289, doi:10.1093/ajcn/51.2.270.
36. Deval, C.; Chaveroux, C.; Maurin, A.-C.; Cherasse, Y.; Parry, L.; Carraro, V.; Milenkovic, D.; Ferrara, M.; Bruhat, A.; Jousse, C.; et al. Amino acid limitation regulates the expression of genes involved in several specific biological processes through GCN2-dependent and GCN2-independent pathways. *FEBS J* **2009**, 276, 707–718, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06818.x.
37. Gong, S.S.; Guerrini, L.; Basilico, C. Regulation of asparagine synthetase gene expression by amino acid starvation. *Mol Cell Biol* **1991**, 11, 6059–6066.
38. Marten, N.W.; Burke, E.J.; Hayden, J.M.; Straus, D.S. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *The FASEB Journal* **1994**, 8, 538–544, doi:10.1096/fasebj.8.8.8181673.
39. Straus, D.S.; Burke, E.J.; Marten, N.W. Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* **1993**, 132, 1090–1100, doi:10.1210/en.132.3.1090.

40. Bruhat, A.; Jousse, C.; Carraro, V.; Reimold, A.M.; Ferrara, M.; Fafournoux, P. Amino acids control mammalian gene transcription: activating transcription factor 2 is essential for the amino acid responsiveness of the CHOP promoter. *Mol Cell Biol* **2000**, *20*, 7192–7204, doi:10.1128/mcb.20.19.7192-7204.2000.
41. Averous, J.; Bruhat, A.; Jousse, C.; Carraro, V.; Thiel, G.; Fafournoux, P. Induction of CHOP Expression by Amino Acid Limitation Requires Both ATF4 Expression and ATF2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5288–5297, doi:10.1074/jbc.M311862200.
42. Kapp, L.D.; Lorsch, J.R. The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annual Review of Biochemistry* **2004**, *73*, 657–704, doi:10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419.
43. Gross, J.D.; Moerke, N.J.; von der Haar, T.; Lugovskoy, A.A.; Sachs, A.B.; McCarthy, J.E.G.; Wagner, G. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* **2003**, *115*, 739–750, doi:10.1016/s0092-8674(03)00975-9.
44. Oberer, M.; Marintchev, A.; Wagner, G. Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *Genes Dev* **2005**, *19*, 2212–2223, doi:10.1101/gad.1335305.
45. Kasinath, B.S.; Mariappan, M.M.; Sataranatarajan, K.; Lee, M.J.; Feliers, D. mRNA Translation: Unexplored Territory in Renal Science. *JASN* **2006**, *17*, 3281–3292, doi:10.1681/ASN.2006050488.
46. Sonenberg, N.; Hinnebusch, A.G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **2009**, *136*, 731–745, doi:10.1016/j.cell.2009.01.042.
47. Zouridis, H.; Hatzimanikatis, V. A Model for Protein Translation: Polysome Self-Organization Leads to Maximum Protein Synthesis Rates. *Biophys J* **2007**, *92*, 717–730, doi:10.1529/biophysj.106.087825.
48. Kisselev, L.; Ehrenberg, M.; Frolova, L. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW. *EMBO J* **2003**, *22*, 175–182, doi:10.1093/emboj/cdg017.
49. Cooper, G.M. Protein Degradation. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* **2000**.
50. Benaroudj, N. Le protéasome, une machinerie cellulaire qui dégrade les protéines. *ms* **2005**, *21*, 115–116.
51. Coux, O.; Piechaczyk, M. Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. **2000**.
52. Dunn, W.A. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* **1994**, *4*, 139–143, doi:10.1016/0962-8924(94)90069-8.
53. Yim, W.W.-Y.; Mizushima, N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discovery* **2020**, *6*, 1–12, doi:10.1038/s41421-020-0141-7.

54. Carillo, S.; Pariat, M.; Jariel-Encontre, I.; Steff, A.-M.; Piechaczyk, M. Le catabolisme protéique intracellulaire : une fonction biologique majeure. Partie 1 : les mécanismes de dégradation. **1995**, 12.
55. Croall, D.E.; DeMartino, G.N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiological Reviews* **1991**, 71, 813–847, doi:10.1152/physrev.1991.71.3.813.
56. Goll, D.E.; Thompson, V.F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. The calpain system. *Physiol. Rev.* **2003**, 83, 731–801, doi:10.1152/physrev.00029.2002.
57. Galluzzi, L.; López-Soto, A.; Kumar, S.; Kroemer, G. Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* **2016**, 44, 221–231, doi:10.1016/j.immuni.2016.01.020.
58. Julien, O.; Wells, J.A. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* **2017**, 24, 1380–1389, doi:10.1038/cdd.2017.44.
59. Balavoine, S.; Feldmann, G.; Lardeux, B. Regulation of RNA degradation in cultured rat hepatocytes: effects of specific amino acids and insulin. *J. Cell. Physiol.* **1993**, 156, 56–62, doi:10.1002/jcp.1041560109.
60. Fafournoux, P.; Bruhat, A.; Jousse, C. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.* **2000**, 351, 1–12, doi:10.1042/0264-6021:3510001.
61. Walrand, S.; Guillet, C.; Salles, J.; Tardif, N.; Maurin, A.-C.; Fafournoux, P.; Cano, N.; Boirie, Y. Acides aminés et signalisation cellulaire. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **2008**, 22, 161–167, doi:10.1016/j.nupar.2008.10.001.
62. Battu, S.; Minhas, G.; Mishra, A.; Khan, N. Amino Acid Sensing via General Control Non-derepressible-2 Kinase and Immunological Programming. *Front. Immunol.* **2017**, 8, doi:10.3389/fimmu.2017.01719.
63. Chotechuan, N.; Azzout-Marniche, D.; Bos, C.; Chaumontet, C.; Gausserès, N.; Steiler, T.; Gaudichon, C.; Tomé, D. mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2009**, 297, E1313–E1323, doi:10.1152/ajpendo.91000.2008.
64. Helliwell, S.B.; Wagner, P.; Kunz, J.; Deuter-Reinhard, M.; Henriquez, R.; Hall, M.N. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* **1994**, 5, 105–118.
65. Gwinn, D.M.; Shackelford, D.B.; Egan, D.F.; Mihaylova, M.M.; Mery, A.; Vasquez, D.S.; Turk, B.E.; Shaw, R.J. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **2008**, 30, 214–226, doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003.

66. Kim, D.-H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; King, J.E.; Latek, R.R.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **2002**, *110*, 163–175, doi:10.1016/s0092-8674(02)00808-5.
67. Kim, D.-H.; Sarbassov, D.D.; Ali, S.M.; Latek, R.R.; Guntur, K.V.P.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Sabatini, D.M. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 895–904, doi:10.1016/s1097-2765(03)00114-x.
68. Laplante, M.; Sabatini, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **2012**, *149*, 274–293, doi:10.1016/j.cell.2012.03.017.
69. Long, X.; Lin, Y.; Ortiz-Vega, S.; Yonezawa, K.; Avruch, J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 702–713, doi:10.1016/j.cub.2005.02.053.
70. Sabatini, D.M. Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, 11818–11825, doi:10.1073/pnas.1716173114.
71. Anthony, T.G. Homeostatic responses to amino acid insufficiency. *Anim Nutr* **2015**, *1*, 135–137, doi:10.1016/j.aninu.2015.10.001.
72. Meyuhas, O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6321–6330, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01719.x.
73. Kimball, S.R. Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 883–886, doi:10.1093/jn/132.5.883.
74. Thoreen, C.C.; Chantranupong, L.; Keys, H.R.; Wang, T.; Gray, N.S.; Sabatini, D.M. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **2012**, *485*, 109–113, doi:10.1038/nature11083.
75. He, C.; Klionsky, D.J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet* **2009**, *43*, 67–93, doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910.
76. Shintani, T.; Klionsky, D.J. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* **2004**, *306*, 990–995, doi:10.1126/science.1099993.
77. Sood, R.; Porter, A.C.; Olsen, D.A.; Cavener, D.R.; Wek, R.C. A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics* **2000**, *154*, 787–801.
78. Qiu, H.; Dong, J.; Hu, C.; Francklyn, C.S.; Hinnebusch, A.G. The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for

- tRNA binding and kinase activation. *EMBO J* **2001**, *20*, 1425–1438, doi:10.1093/emboj/20.6.1425.
79. Dong, J.; Qiu, H.; Garcia-Barrio, M.; Anderson, J.; Hinnebusch, A.G. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Mol. Cell* **2000**, *6*, 269–279, doi:10.1016/s1097-2765(00)00028-9.
 80. Dever, T.E.; Hinnebusch, A.G. GCN2 whets the appetite for amino acids. *Mol. Cell* **2005**, *18*, 141–142, doi:10.1016/j.molcel.2005.03.023.
 81. Chaveroux, C.; Jousse, C.; Cherasse, Y.; Maurin, A.-C.; Parry, L.; Carraro, V.; Derijard, B.; Bruhat, A.; Fafournoux, P. Identification of a Novel Amino Acid Response Pathway Triggering ATF2 Phosphorylation in Mammals. *Mol Cell Biol* **2009**, *29*, 6515–6526, doi:10.1128/MCB.00489-09.
 82. Harding, H.P.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Novoa, I.; Lu, P.D.; Calton, M.; Sadri, N.; Yun, C.; Popko, B.; Paules, R.; et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 619–633, doi:10.1016/s1097-2765(03)00105-9.
 83. Lu, P.D.; Harding, H.P.; Ron, D. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol* **2004**, *167*, 27–33, doi:10.1083/jcb.200408003.
 84. Vattem, K.M.; Wek, R.C. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 11269–11274, doi:10.1073/pnas.0400541101.
 85. Dardevet, D. *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins: A Volume in the Molecular Nutrition Series*; Academic Press, 2016; ISBN 978-0-12-802375-4.
 86. Viollet, B.; Mounier, R.; Leclerc, J.; Yazigi, A.; Foretz, M.; Andreelli, F. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism* **2007**, *33*, 395–402, doi:10.1016/j.diabet.2007.10.004.
 87. Anderson, K.A.; Ribar, T.J.; Lin, F.; Noeldner, P.K.; Green, M.F.; Muehlbauer, M.J.; Witters, L.A.; Kemp, B.E.; Means, A.R. Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab.* **2008**, *7*, 377–388, doi:10.1016/j.cmet.2008.02.011.
 88. Hardie, D.G. The AMP-activated protein kinase pathway – new players upstream and downstream. *Journal of Cell Science* **2004**, *117*, 5479–5487, doi:10.1242/jcs.01540.

89. Hawley, S.A.; Davison, M.; Woods, A.; Davies, S.P.; Beri, R.K.; Carling, D.; Hardie, D.G. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27879–27887, doi:10.1074/jbc.271.44.27879.
90. Proud, C.G. Role of mTOR Signalling in the Control of Translation Initiation and Elongation by Nutrients. In *TOR: Target of Rapamycin*; Thomas, G., Sabatini, D.M., Hall, M.N., Eds.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer: Berlin, Heidelberg, 2004; pp. 215–244 ISBN 978-3-642-18930-2.
91. Carroll, B.; Dunlop, E.A. The lysosome: a crucial hub for AMPK and mTORC1 signalling. *Biochem J* **2017**, *474*, 1453–1466, doi:10.1042/BCJ20160780.
92. Alers, S.; Löffler, A.S.; Wesselborg, S.; Stork, B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 2–11, doi:10.1128/MCB.06159-11.
93. Browne, G.J.; Finn, S.G.; Proud, C.G. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12220–12231, doi:10.1074/jbc.M309773200.
94. Viollet, B.; Foretz, M.; Guigas, B.; Horman, S.; Dentin, R.; Bertrand, L.; Hue, L.; Andreelli, F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* **2006**, *574*, 41–53, doi:10.1113/jphysiol.2006.108506.
95. Liang, J.; Shao, S.H.; Xu, Z.-X.; Hennessy, B.; Ding, Z.; Larrea, M.; Kondo, S.; Dumont, D.J.; Gutterman, J.U.; Walker, C.L.; et al. The energy sensing LKB1–AMPK pathway regulates p27 kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology* **2007**, *9*, 218–224, doi:10.1038/ncb1537.
96. Meley, D.; Bauvy, C.; Houben-Weerts, J.H.P.M.; Dubbelhuis, P.F.; Helmond, M.T.J.; Codogno, P.; Meijer, A.J. AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Autophagic Proteolysis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 34870–34879, doi:10.1074/jbc.M605488200.
97. Viana, R.; Aguado, C.; Esteban, I.; Moreno, D.; Viollet, B.; Knecht, E.; Sanz, P. Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *369*, 964–968, doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.126.
98. Nishimura, T.; Nakatake, Y.; Konishi, M.; Itoh, N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver¹¹The nucleotide sequence data reported in this paper will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases with accession numbers AB021975 and AB025718. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **2000**, *1492*, 203–206, doi:10.1016/S0167-4781(00)00067-1.

99. Staiger, H.; Keuper, M.; Berti, L.; Hrabě de Angelis, M.; Häring, H.-U. Fibroblast Growth Factor 21—Metabolic Role in Mice and Men. *Endocrine Reviews* **2017**, *38*, 468–488, doi:10.1210/er.2017-00016.
100. Fon Tacer, K.; Bookout, A.L.; Ding, X.; Kurosu, H.; John, G.B.; Wang, L.; Goetz, R.; Mohammadi, M.; Kuro-o, M.; Mangelsdorf, D.J.; et al. Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol Endocrinol* **2010**, *24*, 2050–2064, doi:10.1210/me.2010-0142.
101. Fisher, F.M.; Maratos-Flier, E. Understanding the Physiology of FGF21. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 223–241, doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105339.
102. Markan, K.R.; Naber, M.C.; Ameka, M.K.; Anderegg, M.D.; Mangelsdorf, D.J.; Kliewer, S.A.; Mohammadi, M.; Potthoff, M.J. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* **2014**, *63*, 4057–4063, doi:10.2337/db14-0595.
103. Chau, M.D.L.; Gao, J.; Yang, Q.; Wu, Z.; Gromada, J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 12553–12558, doi:10.1073/pnas.1006962107.
104. Kharitonov, A.; Shiyanova, T.L.; Koester, A.; Ford, A.M.; Micanovic, R.; Galbreath, E.J.; Sandusky, G.E.; Hammond, L.J.; Moyers, J.S.; Owens, R.A.; et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 1627–1635, doi:10.1172/JCI23606.
105. Owen, B.M.; Ding, X.; Morgan, D.A.; Coate, K.C.; Bookout, A.L.; Rahmouni, K.; Kliewer, S.A.; Mangelsdorf, D.J. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell Metab.* **2014**, *20*, 670–677, doi:10.1016/j.cmet.2014.07.012.
106. von Holstein-Rathlou, S.; BonDurant, L.; Peltekian, L.; Naber, M.C.; Yin, T.C.; Claflin, K.E.; Urizar, A.I.; Madsen, A.N.; Ratner, C.; Holst, B.; et al. FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab* **2016**, *23*, 335–343, doi:10.1016/j.cmet.2015.12.003.
107. Talukdar, S.; Owen, B.M.; Song, P.; Hernandez, G.; Zhang, Y.; Zhou, Y.; Scott, W.T.; Paratala, B.; Turner, T.; Smith, A.; et al. FGF21 Regulates Sweet and Alcohol Preference. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 344–349, doi:10.1016/j.cmet.2015.12.008.
108. Solon-Biet, S.M.; Cogger, V.C.; Pulpitel, T.; Heblinski, M.; Wahl, D.; McMahon, A.C.; Warren, A.; Durrant-Whyte, J.; Walters, K.A.; Krycer, J.R.; et al. Defining the Nutritional and Metabolic Context of FGF21 Using the Geometric Framework. *Cell Metabolism* **2016**, *24*, 555–565, doi:10.1016/j.cmet.2016.09.001.

109. FAO/WHO/UNU *Protein Quality Evaluation: Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA 4-8 December 1989*; Food & Agriculture Org., 1991; ISBN 978-92-5-103097-4.
110. Schaafsma, G. The protein digestibility-corrected amino acid score. *The Journal of Nutrition* **2000**, *130*, 1865S–7S, doi:10.1093/jn/130.7.1865S.
111. Rand, W.M.; Pellett, P.L.; Young, V.R. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 109–127, doi:10.1093/ajcn/77.1.109.
112. WHO/FAO/UNU Energy and protein requirements. *World Health Organ Tech Rep Ser* **1985**, *724*, 1–206.
113. Pencharz, P.B.; Ball, R.O. Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu. Rev. Nutr.* **2003**, *23*, 101–116, doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073247.
114. Rand, W.M.; Young, V.R. Statistical analysis of nitrogen balance data with reference to the lysine requirement in adults. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1920–1926, doi:10.1093/jn/129.10.1920.
115. Calloway, D.H.; Odell, A.C.F.; Margen, S. Sweat and Miscellaneous Nitrogen Losses in Human Balance Studies. *J Nutr* **1971**, *101*, 775–786, doi:10.1093/jn/101.6.775.
116. EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. *EFSA Journal* **2012**, *10*, n/a-n/a, doi:10.2903/j.efsa.2012.2557.
117. FAO/WHO/UNU *Protein and amino acid requirements in human nutrition : report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*; World Health Organization, 2007; ISBN 978-92-4-120935-9.
118. Jones, E.M.; Baumann, C.A.; Reynolds, M.S. Nitrogen Balances of Women Maintained on Various Levels of Lysine. *J Nutr* **1956**, *60*, 549–562, doi:10.1093/jn/60.4.549.
119. Nakagawa, I.; Takahashi, T.; Suzuki, T. Amino Acid Requirements of Children: Minimal Needs of Lysine and Methionine Based on Nitrogen Balance Method. *J Nutr* **1961**, *74*, 401–407, doi:10.1093/jn/74.4.401.
120. Rose, W.C.; Coon, M.J.; Lockhart, H.B.; Lambert, G.F. The amino acid requirements of man. XI. The threonine and methionine requirements. *J Biol Chem* **1955**, *215*, 101–110.
121. Kurpad, A.V.; Thomas, T. Methods to assess amino acid requirements in humans. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2011**, *14*, 434–439, doi:10.1097/MCO.0b013e3283496575.
122. Fomon, S.J.; Haschke, F.; Ziegler, E.E.; Nelson, S.E. Body composition of reference children from birth to age 10 years. *Am. J. Clin. Nutr.* **1982**, *35*, 1169–1175.

123. Hytten, F.E.; Leitch, I. *The Physiology of Human Pregnancy*; Blackwell Scientific Publications Limited, 1971; ISBN 978-0-632-07000-8.
124. Institute of Medicine *Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids*; National Academies Press: Washington, D.C, 2005; ISBN 978-0-309-08525-0.
125. Meguid, M.M.; Matthews, D.E.; Bier, D.M.; Meredith, C.N.; Soeldner, J.S.; Young, V.R. Leucine kinetics at graded leucine intakes in young men. *Am J Clin Nutr* **1986**, *43*, 770–780, doi:10.1093/ajcn/43.5.770.
126. Young, V.R.; Bier, D.M.; Pellett, P.L. A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *50*, 80–92, doi:10.1093/ajcn/50.1.80.
127. Meredith, C.N.; Wen, Z.M.; Bier, D.M.; Matthews, D.E.; Young, V.R. Lysine kinetics at graded lysine intakes in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* **1986**, *43*, 787–794, doi:10.1093/ajcn/43.5.787.
128. Zhao, X.H.; Wen, Z.M.; Meredith, C.N.; Matthews, D.E.; Bier, D.M.; Young, V.R. Threonine kinetics at graded threonine intakes in young men. *Am J Clin Nutr* **1986**, *43*, 795–802, doi:10.1093/ajcn/43.5.795.
129. El-Khoury, A.E.; Basile, A.; Beaumier, L.; Wang, S.Y.; Al-Amiri, H.A.; Selvaraj, A.; Wong, S.; Atkinson, A.; Ajami, A.M.; Young, V.R. Twenty-four-hour intravenous and oral tracer studies with L-[1-13C]-2-amino adipic acid and L-[1-13C]lysine as tracers at generous nitrogen and lysine intakes in healthy adults. *Am J Clin Nutr* **1998**, *68*, 827–839, doi:10.1093/ajcn/68.4.827.
130. Kurpad, A.V.; Thomas, T. Methods to assess amino acid requirements in humans. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **2011**, *14*, 434–439, doi:10.1097/MCO.0b013e3283496575.
131. Kim, K.-I.; McMillan, I.; Bayley, H.S. Determination of amino acid requirements of young pigs using an indicator amino acid. *British Journal of Nutrition* **1983**, *50*, 369–382, doi:10.1079/BJN19830104.
132. Elango, R.; Ball, R.O.; Pencharz, P.B. Indicator Amino Acid Oxidation: Concept and Application. *J Nutr* **2008**, *138*, 243–246, doi:10.1093/jn/138.2.243.
133. Zello, G.A.; Wykes, L.J.; Ball, R.O.; Pencharz, P.B. Recent advances in methods of assessing dietary amino acid requirements for adult humans. *J Nutr* **1995**, *125*, 2907–2915, doi:10.1093/jn/125.12.2907.

134. Bross, R.; Ball, R.O.; Pencharz, P.B. Development of a Minimally Invasive Protocol for the Determination of Phenylalanine and Lysine Kinetics in Humans during the Fed State. *J Nutr* **1998**, *128*, 1913–1919, doi:10.1093/jn/128.11.1913.
135. Meredith, C.N.; Wen, Z.M.; Bier, D.M.; Matthews, D.E.; Young, V.R. Lysine kinetics at graded lysine intakes in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* **1986**, *43*, 787–794.
136. Young, V.R.; Bier, D.M.; Pellett, P.L. A theoretical basis for increasing current estimates of the amino acid requirements in adult man, with experimental support. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *50*, 80–92.
137. Astarita, G.; Langridge, J. An emerging role for metabolomics in nutrition science. *J Nutrigenet Nutrigenomics* **2013**, *6*, 181–200, doi:10.1159/000354403.
138. Smith, R.E.; Richards, K.T. and K.M. Recent Advances in Metabolomics Available online: <https://www.eurekaselect.com/129997/article> (accessed on Aug 24, 2020).
139. Junot, C. L'analyse métabolomique par spectrométrie de masse: un nouvel outil pour la biochimie clinique ? *Bio trib. mag.* **2010**, *34*, 10–15, doi:10.1007/s11834-010-0003-y.
140. Sébédio, J.-L. Chapter Three - Metabolomics, Nutrition, and Potential Biomarkers of Food Quality, Intake, and Health Status. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Toldrá, F., Ed.; Academic Press, 2017; Vol. 82, pp. 83–116.
141. Jm, C.D.L.B.; D, M.-P.; V, M.; P, R.; R, G.; G, S. [Metabolome and mass spectrometry: new biomedical analysis perspectives]. *Ann Biol Clin (Paris)* **2015**, *73*, 126–130, doi:10.1684/abc.2014.1020.
142. Bartel, J.; Krumsiek, J.; Theis, F.J. STATISTICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF HIGH-THROUGHPUT METABOLOMICS DATA. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2013**, *4*, e201301009, doi:10.5936/csbj.201301009.
143. Habchi, B.; Alves, S.; Jouan-Rimbaud Bouveresse, D.; Moslah, B.; Paris, A.; Lécluse, Y.; Gauduchon, P.; Lebailly, P.; Rutledge, D.N.; Rathahao-Paris, E. An innovative chemometric method for processing direct introduction high resolution mass spectrometry metabolomic data: independent component–discriminant analysis (IC–DA). *Metabolomics* **2017**, *13*, 45, doi:10.1007/s11306-017-1179-x.
144. O'Donovan, C.B.; Walsh, M.C.; Nugent, A.P.; McNulty, B.; Walton, J.; Flynn, A.; Gibney, M.J.; Gibney, E.R.; Brennan, L. Use of metabotyping for the delivery of personalised nutrition. *Molecular Nutrition & Food Research* **2015**, *59*, 377–385, doi:10.1002/mnfr.201400591.

145. Fedry, J.; Blais, A.; Even, P.C.; Piedcoq, J.; Fromentin, G.; Gaudichon, C.; Azzout-Marniche, D.; Tomé, D. Urinary metabolic profile predicts high-fat diet sensitivity in the C57Bl6/J mouse. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *31*, 88–97, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.015.
146. Fischer, L.M.; daCosta, K.A.; Kwock, L.; Stewart, P.W.; Lu, T.-S.; Stabler, S.P.; Allen, R.H.; Zeisel, S.H. Sex and menopausal status influence human dietary requirements for the nutrient choline. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1275–1285, doi:10.1093/ajcn/85.5.1275.
147. Institute of Medicine *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*; The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health; National Academies Press (US): Washington (DC), 1998; ISBN 978-0-309-06411-8.
148. Fischer, L.M.; da Costa, K.-A.; Kwock, L.; Galanko, J.; Zeisel, S.H. Dietary choline requirements of women: effects of estrogen and genetic variation. *Am J Clin Nutr* **2010**, *92*, 1113–1119, doi:10.3945/ajcn.2010.30064.
149. Zeisel, S.H. Nutritional Genomics: Defining the Dietary Requirement and Effects of Choline. *J Nutr* **2011**, *141*, 531–534, doi:10.3945/jn.110.130369.
150. Fischer, L.M.; da Costa, K.A.; Galanko, J.; Sha, W.; Stephenson, B.; Vick, J.; Zeisel, S.H. Choline intake and genetic polymorphisms influence choline metabolite concentrations in human breast milk and plasma. *Am J Clin Nutr* **2010**, *92*, 336–346, doi:10.3945/ajcn.2010.29459.
151. Vennemann, F.B.C.; Ioannidou, S.; Valsta, L.M.; Dumas, C.; Ocké, M.C.; Mensink, G.B.M.; Lindtner, O.; Virtanen, S.M.; Tlustos, C.; D’Addezio, L.; et al. Dietary intake and food sources of choline in European populations. *Br J Nutr* **2015**, *114*, 2046–2055, doi:10.1017/S0007114515003700.
152. Lin, L.; C, L.; T, W.; G, W.; S, Q.; D, L.; J, W. Biomarkers for optimal requirements of amino acids by animals and humans. *Front Biosci (Schol Ed)* **2011**, *3*, 1298–1307, doi:10.2741/227.
153. Matsuzaki, K.; Kato, H.; Sakai, R.; Toue, S.; Amao, M.; Kimura, T. Transcriptomics and Metabolomics of Dietary Leucine Excess. *J Nutr* **2005**, *135*, 1571S–1575S, doi:10.1093/jn/135.6.1571S.
154. Harper, A.E.; Benevenga, N.J.; Wohlhueter, R.M. Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.* **1970**, *50*, 428–558, doi:10.1152/physrev.1970.50.3.428.
155. Wu, Z.; Li, M.; Zhao, C.; Zhou, J.; Chang, Y.; Li, X.; Gao, P.; Lu, X.; Li, Y.; Xu, G. Urinary metabonomics study in a rat model in response to protein-energy malnutrition by using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol Biosyst* **2010**, *6*, 2157–2163, doi:10.1039/c005291d.

156. Forslund, A.H.; Hambraeus, L.; van Beurden, H.; Holmbäck, U.; El-Khoury, A.E.; Hjorth, G.; Olsson, R.; Stridsberg, M.; Wide, L.; Akerfeldt, T.; et al. Inverse relationship between protein intake and plasma free amino acids in healthy men at physical exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2000**, *278*, E857-867.
157. Chalvon-Demersay, T.; Even, P.C.; Tomé, D.; Chaumontet, C.; Piedcoq, J.; Gaudichon, C.; Azzout-Marniche, D. Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *36*, 60–67, doi:10.1016/j.jnutbio.2016.07.002.
158. Chalvon-Demersay, T.; Even, P.C.; Chaumontet, C.; Piedcoq, J.; Viollet, B.; Gaudichon, C.; Tomé, D.; Foretz, M.; Azzout-Marniche, D. Modifying the Dietary Carbohydrate-to-Protein Ratio Alters the Postprandial Macronutrient Oxidation Pattern in Liver of AMPK-Deficient Mice. *J Nutr* **2017**, *147*, 1669–1676, doi:10.3945/jn.117.250803.
159. Chalvon-Demersay, T.; Moro, J.; Even, P.C.; Chaumontet, C.; Tomé, D.; Averous, J.; Piedcoq, J.; Gaudichon, C.; Maurin, A.-C.; Fafournoux, P.; et al. Liver GCN2 controls hepatic FGF21 secretion and modulates whole-body postprandial oxidation profile under a low-protein diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2019**, doi:10.1152/ajpendo.00022.2019.
160. Chaumontet, C.; Azzout-Marniche, D.; Blais, A.; Piedcoq, J.; Tomé, D.; Gaudichon, C.; Even, P.C. Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2019**, *316*, R486–R501, doi:10.1152/ajpregu.00316.2018.
161. Stepien, M.; Azzout-Marniche, D.; Even, P.C.; Khodorova, N.; Fromentin, G.; Tomé, D.; Gaudichon, C. Adaptation to a high-protein diet progressively increases the postprandial accumulation of carbon skeletons from dietary amino acids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2016**, *311*, R771–R778, doi:10.1152/ajpregu.00040.2016.
162. Primrose, S.; Draper, J.; Elsom, R.; Kirkpatrick, V.; Mathers, J.C.; Seal, C.; Beckmann, M.; Haladar, S.; Beattie, J.H.; Lodge, J.K.; et al. Metabolomics and human nutrition. *British Journal of Nutrition* **2011**, *105*, 1277–1283, doi:10.1017/S0007114510004812.
163. Nuss, E.T.; Tanumihardjo, S.A. Quality Protein Maize for Africa: Closing the Protein Inadequacy Gap in Vulnerable Populations. *Adv Nutr* **2011**, *2*, 217–224, doi:10.3945/an.110.000182.
164. Semba, R.D. The rise and fall of protein malnutrition in global health. *Ann Nutr Metab* **2016**, *69*, 79–88, doi:10.1159/000449175.
165. Tomé, D.; Bos, C. Lysine Requirement through the Human Life Cycle. *J Nutr* **2007**, *137*, 1642S-1645S, doi:10.1093/jn/137.6.1642S.

166. Bhutta, Z.A.; Berkley, J.A.; Bandsma, R.H.J.; Kerac, M.; Trehan, I.; Briend, A. Severe childhood malnutrition. *Nat Rev Dis Primers* **2017**, *3*, 17067, doi:10.1038/nrdp.2017.67.
167. Aparecida de França, S.; Dos Santos, M.P.; Garófalo, M.A.R.; Navegantes, L.C.; Kettelhut, I. do C.; Lopes, C.F.; Kawashita, N.H. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* **2009**, *25*, 1186–1192, doi:10.1016/j.nut.2009.03.011.
168. Swick, R.W.; Gribskov, C.L. The effect of dietary protein levels on diet-induced thermogenesis in the rat. *J. Nutr.* **1983**, *113*, 2289–2294, doi:10.1093/jn/113.11.2289.
169. White, B.D.; Porter, M.H.; Martin, R.J. Protein selection, food intake, and body composition in response to the amount of dietary protein. *Physiol. Behav.* **2000**, *69*, 383–389, doi:10.1016/s0031-9384(99)00232-2.
170. Blais, A.; Chaumontet, C.; Azzout-Marniche, D.; Piedcoq, J.; Fromentin, G.; Gaudichon, C.; Tomé, D.; Even, P.C. Low-protein diet-induced hyperphagia and adiposity are modulated through interactions involving thermoregulation, motor activity, and protein quality in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2018**, *314*, E139–E151, doi:10.1152/ajpendo.00318.2017.
171. Gosby, A.K.; Conigrave, A.D.; Lau, N.S.; Iglesias, M.A.; Hall, R.M.; Jebb, S.A.; Brand-Miller, J.; Caterson, I.D.; Raubenheimer, D.; Simpson, S.J. Testing Protein Leverage in Lean Humans: A Randomised Controlled Experimental Study. *PLOS ONE* **2011**, *6*, e25929, doi:10.1371/journal.pone.0025929.
172. Griffioen-Roose, S.; Mars, M.; Siebelink, E.; Finlayson, G.; Tomé, D.; de Graaf, C. Protein status elicits compensatory changes in food intake and food preferences¹²³. *Am J Clin Nutr* **2012**, *95*, 32–38, doi:10.3945/ajcn.111.020503.
173. Beck, B.; Dollet, J.-M.; Max, J.-P. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: Effects on food intake and body weight in rats. *Physiology & Behavior* **1989**, *45*, 761–765, doi:10.1016/0031-9384(89)90291-6.
174. Du, F.; Higginbotham, D.A.; White, B.D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 514–521, doi:10.1093/jn/130.3.514.
175. Mercer, L.P.; Kelley, D.S.; Humphries, L.L.; Dunn, J.D. Manipulation of Central Nervous System Histamine or Histaminergic Receptors (H1) Affects Food Intake in Rats. *J Nutr* **1994**, *124*, 1029–1036, doi:10.1093/jn/124.7.1029.
176. Menaker, L.; Navia, J.M. Appetite Regulation in the Rat Under Various Physiological Conditions: The Role of Dietary Protein and Calories. *J Nutr* **1973**, *103*, 347–352, doi:10.1093/jn/103.3.347.

177. Morrison, C.D.; Laeger, T. Protein-dependent regulation of feeding and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **2015**, *26*, 256–262, doi:10.1016/j.tem.2015.02.008.
178. Beaton, J.R.; Feleki, V.; Stevenson, J.A.F. INSULIN HYPERPHAGIA IN RATS FED A LOW-PROTEIN DIET. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **2011**, doi:10.1139/y65-021.
179. Carreiro, A.L.; Dhillon, J.; Gordon, S.; Higgins, K.A.; Jacobs, A.G.; McArthur, B.M.; Redan, B.W.; Rivera, R.L.; Schmidt, L.R.; Mattes, R.D. The Macronutrients, Appetite, and Energy Intake. *Annu. Rev. Nutr.* **2016**, *36*, 73–103, doi:10.1146/annurev-nutr-121415-112624.
180. Sørensen, A.; Mayntz, D.; Raubenheimer, D.; Simpson, S.J. Protein-leverage in Mice: The Geometry of Macronutrient Balancing and Consequences for Fat Deposition. *Obesity* **2008**, *16*, 566–571, doi:10.1038/oby.2007.58.
181. Leung, P.M.; Rogers, Q.R. Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am. J. Physiol.* **1971**, *221*, 929–935, doi:10.1152/ajplegacy.1971.221.3.929.
182. Maurin, A.-C.; Jousse, C.; Balage, M.; Averous, J.; Parry, L.; Bruhat, A.; Cherasse, Y.; Zeng, H.; Zhang, Y.; Harding, H.; et al. La kinase GCN2 régule le comportement alimentaire des omnivores afin de maintenir l'homéostasie des acides aminés. *Med Sci (Paris)* **2005**, *21*, 799–801, doi:10.1051/medsci/20052110799.
183. Anthony, T.G.; Gietzen, D.W. Detection of amino acid deprivation in the central nervous system. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2013**, *16*, 96–101, doi:10.1097/MCO.0b013e32835b618b.
184. Gietzen, D.W.; Hao, S.; Anthony, T.G. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 63–78, doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093726.
185. Maurin, A.-C.; Jousse, C.; Averous, J.; Parry, L.; Bruhat, A.; Cherasse, Y.; Zeng, H.; Zhang, Y.; Harding, H.P.; Ron, D.; et al. The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metabolism* **2005**, *1*, 273–277, doi:10.1016/j.cmet.2005.03.004.
186. Gietzen, D.W. Neural Mechanisms in the Responses to Amino Acid Deficiency. *J Nutr* **1993**, *123*, 610–625, doi:10.1093/jn/123.4.610.
187. Torii, K.; Nijima, A. Effect of lysine on afferent activity of the hepatic branch of the vagus nerve in normal and l-lysine-deficient rats. *Physiology & Behavior* **2001**, *72*, 685–690, doi:10.1016/S0031-9384(01)00426-7.
188. Pezeshki, A.; Zapata, R.C.; Singh, A.; Yee, N.J.; Chelikani, P.K. Low protein diets produce divergent effects on energy balance. *Sci Rep* **2016**, *6*, 25145, doi:10.1038/srep25145.

189. Donald, P.; Pitts, G.C.; Pohl, S.L. Body weight and composition in laboratory rats: Effects of diets with high or low protein concentrations. *Science* **1981**, *211*, 185–186, doi:10.1126/science.7444462.
190. Aparecida de França, S.; Pavani dos Santos, M.; Nunes Queiroz da Costa, R.V.; Froelich, M.; Buzelle, S.L.; Chaves, V.E.; Giordani, M.A.; Pereira, M.P.; Colodel, E.M.; Marlise Balbinotti Andrade, C.; et al. Low-protein, high-carbohydrate diet increases glucose uptake and fatty acid synthesis in brown adipose tissue of rats. *Nutrition* **2014**, *30*, 473–480, doi:10.1016/j.nut.2013.10.004.
191. de França, S.A.; dos Santos, M.P.; Przygodna, F.; Garófalo, M.A.R.; Kettelhut, I.C.; Magalhães, D.A.; Bezerra, K.S.; Colodel, E.M.; Flouris, A.D.; Andrade, C.M.B.; et al. A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. *Lipids* **2016**, *51*, 303–310, doi:10.1007/s11745-016-4119-z.
192. Rothwell, N.J.; Stock, M.J.; Tyzbir, R.S. Energy Balance and Mitochondrial Function in Liver and Brown Fat of Rats Fed “Cafeteria” Diets of Varying Protein Content. *J Nutr* **1982**, *112*, 1663–1672, doi:10.1093/jn/112.9.1663.
193. Douris, N.; Stevanovic, D.M.; Fisher, ffolliott M.; Cisu, T.I.; Chee, M.J.; Nguyen, N.L.; Zarebidaki, E.; Adams, A.C.; Kharitononkov, A.; Flier, J.S.; et al. Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in Male Mice. *Endocrinology* **2015**, *156*, 2470–2481, doi:10.1210/en.2014-2001.
194. Hill, C.M.; Laeger, T.; Albarado, D.C.; McDougal, D.H.; Berthoud, H.-R.; Münzberg, H.; Morrison, C.D. Low protein-induced increases in FGF21 drive UCP1-dependent metabolic but not thermoregulatory endpoints. *Sci Rep* **2017**, *7*, doi:10.1038/s41598-017-07498-w.
195. Laeger, T.; Albarado, D.C.; Burke, S.J.; Trosclair, L.; Hedgepeth, J.W.; Berthoud, H.-R.; Gettys, T.W.; Collier, J.J.; Münzberg, H.; Morrison, C.D. Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell Reports* **2016**, *16*, 707–716, doi:10.1016/j.celrep.2016.06.044.
196. Véniant, M.M.; Sivits, G.; Helmering, J.; Komorowski, R.; Lee, J.; Fan, W.; Moyer, C.; Lloyd, D.J. Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 731–738, doi:10.1016/j.cmet.2015.04.019.
197. Samms, R.J.; Smith, D.P.; Cheng, C.C.; Antonellis, P.P.; Perfield, J.W.; Kharitononkov, A.; Gimeno, R.E.; Adams, A.C. Discrete Aspects of FGF21 In Vivo Pharmacology Do Not Require UCP1. *Cell Reports* **2015**, *11*, 991–999, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.046.

198. Wanders, D.; Burk, D.H.; Cortez, C.C.; Van, N.T.; Stone, K.P.; Baker, M.; Mendoza, T.; Mynatt, R.L.; Gettys, T.W. UCP1 is an essential mediator of the effects of methionine restriction on energy balance but not insulin sensitivity. *The FASEB Journal* **2015**, *29*, 2603–2615, doi:10.1096/fj.14-270348.
199. Hill, C.M.; Berthoud, H.-R.; Münzberg, H.; Morrison, C.D. Homeostatic sensing of dietary protein restriction: A case for FGF21. *Frontiers in Neuroendocrinology* **2018**, *51*, 125–131, doi:10.1016/j.yfrne.2018.06.002.
200. Rothwell, N.J.; Stock, M.J. Influence of carbohydrate and fat intake on diet-induced thermogenesis and brown fat activity in rats fed low protein diets. *J. Nutr.* **1987**, *117*, 1721–1726, doi:10.1093/jn/117.10.1721.
201. Malloy, V.L.; Krajcik, R.A.; Bailey, S.J.; Hristopoulos, G.; Plummer, J.D.; Orentreich, N. Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* **2006**, *5*, 305–314, doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00220.x.
202. Spring, S.; Singh, A.; Zapata, R.C.; Chelikani, P.K.; Pezeshki, A. Methionine Restriction Partly Recapitulates the Sympathetically Mediated Enhanced Energy Expenditure Induced by Total Amino Acid Restriction in Rats. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11030707.
203. Yap, Y.W.; Rusu, P.M.; Chan, A.Y.; Fam, B.C.; Jungmann, A.; Solon-Biet, S.M.; Barlow, C.K.; Creek, D.J.; Huang, C.; Schittenhelm, R.B.; et al. Restriction of essential amino acids dictates the systemic metabolic response to dietary protein dilution. *Nat Commun* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-16568-z.
204. Forney, L.A.; Wanders, D.; Stone, K.P.; Pierse, A.; Gettys, T.W. Concentration-dependent linkage of dietary methionine restriction to the components of its metabolic phenotype. *Obesity* **2017**, *25*, 730–738, doi:10.1002/oby.21806.
205. Waterlow, J.C. Whole-Body Protein Turnover in Humans—Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Nutr.* **1995**, *15*, 57–92, doi:10.1146/annurev.nu.15.070195.000421.
206. Bröer, S.; Bröer, A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochemical Journal* **2017**, *474*, 1935–1963, doi:10.1042/BCJ20160822.
207. Vary, T.C.; Jefferson, L.S.; Kimball, S.R. Amino acid-induced stimulation of translation initiation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* **1999**, *277*, E1077-1086, doi:10.1152/ajpendo.1999.277.6.E1077.
208. Carbone, J.W.; McClung, J.P.; Pasiakos, S.M. Recent Advances in the Characterization of Skeletal Muscle and Whole-Body Protein Responses to Dietary Protein and Exercise during Negative Energy Balance. *Adv Nutr* **2019**, *10*, 70–79, doi:10.1093/advances/nmy087.

209. Carbone, J.W.; Pasiakos, S.M. Dietary Protein and Muscle Mass: Translating Science to Application and Health Benefit. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:10.3390/nu11051136.
210. Hosokawa, N.; Hara, T.; Kaizuka, T.; Kishi, C.; Takamura, A.; Miura, Y.; Iemura, S.; Natsume, T.; Takehana, K.; Yamada, N.; et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **2009**, *20*, 1981–1991, doi:10.1091/mbc.e08-12-1248.
211. Tan, V.P.; Miyamoto, S. Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *J Mol Cell Cardiol* **2016**, *95*, 31–41, doi:10.1016/j.yjmcc.2016.01.005.
212. Zheng, L.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Li, F.; Wei, H.; Peng, J. Recent Advances in Understanding Amino Acid Sensing Mechanisms that Regulate mTORC1. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17101636.
213. Gallinetti, J.; Harputlugil, E.; Mitchell, J.R. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem J* **2013**, *449*, 1–10, doi:10.1042/BJ20121098.
214. Rabier, D.; Leverve, X.; Lissac, J. Foie et métabolisme azote interrelations avec l'équilibre acido-basique. *Réanimation Urgences* **1993**, *2*, 90–96, doi:10.1016/S1164-6756(05)80353-6.
215. Liu, X.; Wang, H.; Liang, X.; Roberts, M.S. Chapter 30 - Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. In *Liver Pathophysiology*; Muriel, P., Ed.; Academic Press: Boston, 2017; pp. 391–400 ISBN 978-0-12-804274-8.
216. de Camargo, J.L.V.; Angeleli, A.Y.O.; Burini, R.C.; Campana, A.O. Hepatic Lesions in Protein-deficient Adult Rats. *Br J Exp Pathol* **1978**, *59*, 158–166.
217. de Castro, E.S.; Boyd, E.M. Organ weights and water content of rats fed on protein-deficient diets. *Bull World Health Organ* **1968**, *38*, 971–977.
218. Henagan, T.M.; Laeger, T.; Navard, A.M.; Albarado, D.; Noland, R.C.; Stadler, K.; Elks, C.M.; Burk, D.; Morrison, C.D. Hepatic autophagy contributes to the metabolic response to dietary protein restriction. *Metabolism* **2016**, *65*, 805–815, doi:10.1016/j.metabol.2016.02.015.
219. Vis, H.L. Protein deficiency disorders. *Postgrad Med J* **1969**, *45*, 107–115, doi:10.1136/pgmj.45.520.107.
220. Hoffenberg, R.; Black, E.; Brock, J.F. Albumin and gamma-globulin tracer studies in protein depletion states. *J Clin Invest* **1966**, *45*, 143–152, doi:10.1172/JCI105319.
221. Seakins, A.; Waterlow, J.C. Effect of a low-protein diet on the incorporation of amino acids into rat serum lipoproteins. *Biochem J* **1972**, *129*, 793–795.

222. Wykes, L.J.; Fiorotto, M.; BæRRIN, D.G.; Rosario, M.D.; Frazer, M.E.; Pond, W.G.; Jahoor, F. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. **1996**, 8.
223. Glick, Z.; McNurlan, M.A.; Garlick, P.J. Protein Synthesis Rate in Liver and Muscle of Rats Following Four Days of Overfeeding. *J Nutr* **1982**, 112, 391–397, doi:10.1093/jn/112.2.391.
224. McNurlan, M.A.; Garlick, P.J. Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **1981**, 241, E238–E245, doi:10.1152/ajpendo.1981.241.3.E238.
225. Sève, B.; Reeds, P.J.; Fuller, M.F.; Cadenhead, A.; Hay, S.M. Protein synthesis and retention in some tissues of the young pig as influenced by dietary protein intake after early-weaning. Possible connection to the energy metabolism. *Reprod Nutr Dev* **1986**, 26, 849–861, doi:10.1051/rnd:19860509.
226. Yoshizawa, F.; Kimball, S.R.; Vary, T.C.; Jefferson, L.S. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **1998**, 275, E814–E820, doi:10.1152/ajpendo.1998.275.5.E814.
227. Mortimore, G.E.; Schworer, C.M. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* **1977**, 270, 174–176, doi:10.1038/270174a0.
228. Jackson, A.A.; Doherty, J.; de Benoist, M.H.; Hibbert, J.; Persaud, C. 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.* **1990**, 64, 371–385, doi:10.1079/bjn19900039.
229. Picou, D.; Phillips, M. Urea metabolism in malnourished and recovered children receiving a high or low protein diet. *Am J Clin Nutr* **1972**, 25, 1261–1266, doi:10.1093/ajcn/25.11.1261.
230. Kim, J.; Lee, K.S.; Kwon, D.-H.; Bong, J.J.; Jeong, J.Y.; Nam, Y.S.; Lee, M.S.; Liu, X.; Baik, M. Severe dietary lysine restriction affects growth and body composition and hepatic gene expression for nitrogen metabolism in growing rats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **2014**, 98, 149–157, doi:10.1111/jpn.12061.
231. Krajcovicová-Kudlácková, M.; Ozdín, L.; Bobek, P. Protein synthesis in growing and adult rats on casein and gluten nutrition. *Physiol Res* **1993**, 42, 17–22.
232. Hamard, A.; Sève, B.; Le Floc'h, N. A moderate threonine deficiency differently affects protein metabolism in tissues of early-weaned piglets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **2009**, 152, 491–497, doi:10.1016/j.cbpa.2008.12.002.

233. Wang, X.; Qiao, S.; Yin, Y.; Yue, L.; Wang, Z.; Wu, G. A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *J Nutr* **2007**, *137*, 1442–1446, doi:10.1093/jn/137.6.1442.
234. Ables, G.P.; Perrone, C.E.; Orentreich, D.; Orentreich, N. Methionine-restricted C57BL/6J mice are resistant to diet-induced obesity and insulin resistance but have low bone density. *PLoS One* **2012**, *7*, e51357, doi:10.1371/journal.pone.0051357.
235. Malloy, V.L.; Perrone, C.E.; Mattocks, D.A.L.; Ables, G.P.; Caliendo, N.S.; Orentreich, D.S.; Orentreich, N. Methionine restriction prevents the progression of hepatic steatosis in leptin-deficient obese mice. *Metabolism* **2013**, *62*, 1651–1661, doi:10.1016/j.metabol.2013.06.012.
236. Stone, K.P.; Wanders, D.; Orgeron, M.; Cortez, C.C.; Gettys, T.W. Mechanisms of increased in vivo insulin sensitivity by dietary methionine restriction in mice. *Diabetes* **2014**, *63*, 3721–3733, doi:10.2337/db14-0464.
237. Xu, J.; Lloyd, D.J.; Hale, C.; Stanislaus, S.; Chen, M.; Sivits, G.; Vonderfecht, S.; Hecht, R.; Li, Y.-S.; Lindberg, R.A.; et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* **2009**, *58*, 250–259, doi:10.2337/db08-0392.
238. Zhou, X.; He, L.; Wan, D.; Yang, H.; Yao, K.; Wu, G.; Wu, X.; Yin, Y. Methionine restriction on lipid metabolism and its possible mechanisms. *Amino Acids* **2016**, *48*, 1533–1540, doi:10.1007/s00726-016-2247-7.
239. Perrone, C.E.; Mattocks, D.A.L.; Jarvis-Morar, M.; Plummer, J.D.; Orentreich, N. Methionine restriction effects on mitochondrial biogenesis and aerobic capacity in white adipose tissue, liver, and skeletal muscle of F344 rats. *Metabolism* **2010**, *59*, 1000–1011, doi:10.1016/j.metabol.2009.10.023.
240. Pettit, A.P.; Jonsson, W.O.; Bargoud, A.R.; Mirek, E.T.; Peelor, F.F.; Wang, Y.; Gettys, T.W.; Kimball, S.R.; Miller, B.F.; Hamilton, K.L.; et al. Dietary Methionine Restriction Regulates Liver Protein Synthesis and Gene Expression Independently of Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation in Mice. *J Nutr* **2017**, *147*, 1031–1040, doi:10.3945/jn.116.246710.
241. Busquets, S.; Alvarez, B.; López-Soriano, F.J.; Argilés, J.M. Branched-chain amino acids: a role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *J Cell Physiol* **2002**, *191*, 283–289, doi:10.1002/jcp.10097.
242. Dardevet, D.; Sornet, C.; Balage, M.; Grizard, J. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr* **2000**, *130*, 2630–2635, doi:10.1093/jn/130.11.2630.

243. Mordier, S.; Deval, C.; Béchet, D.; Tassa, A.; Ferrara, M. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 29900–29906, doi:10.1074/jbc.M003633200.
244. Anthony, J.C.; Yoshizawa, F.; Anthony, T.G.; Vary, T.C.; Jefferson, L.S.; Kimball, S.R. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **2000**, *130*, 2413–2419, doi:10.1093/jn/130.10.2413.
245. Nagasawa, T.; Kido, T.; Yoshizawa, F.; Ito, Y.; Nishizawa, N. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *J Nutr Biochem* **2002**, *13*, 121–127, doi:10.1016/s0955-2863(01)00209-1.
246. Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C.; et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521–534, doi:10.1016/j.cell.2008.11.044.
247. Han, J.M.; Jeong, S.J.; Park, M.C.; Kim, G.; Kwon, N.H.; Kim, H.K.; Ha, S.H.; Ryu, S.H.; Kim, S. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **2012**, *149*, 410–424, doi:10.1016/j.cell.2012.02.044.
248. Li, F.; Yin, Y.; Tan, B.; Kong, X.; Wu, G. Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino Acids* **2011**, *41*, 1185–1193, doi:10.1007/s00726-011-0983-2.
249. Bolster, D.R.; Vary, T.C.; Kimball, S.R.; Jefferson, L.S. Leucine regulates translation initiation in rat skeletal muscle via enhanced eIF4G phosphorylation. *J Nutr* **2004**, *134*, 1704–1710, doi:10.1093/jn/134.7.1704.
250. Batistela, E.; Pereira, M.P.; Siqueira, J.T.; Paula-Gomes, S.; Zanon, N.M.; Oliveira, E.B.; Navegantes, L.C.C.; Kettelhut, I.C.; Andrade, C.M.B.; Kawashita, N.H.; et al. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin–proteasome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *92*, 445–454, doi:10.1139/cjpp-2013-0290.
251. Kobayashi, H.; Børsheim, E.; Anthony, T.G.; Traber, D.L.; Badalamenti, J.; Kimball, S.R.; Jefferson, L.S.; Wolfe, R.R. Reduced amino acid availability inhibits muscle protein synthesis and decreases activity of initiation factor eIF2B. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2003**, *284*, E488–E498, doi:10.1152/ajpendo.00094.2002.
252. dos Santos, M.P.; Batistela, E.; Pereira, M.P.; Paula-Gomes, S.; Zanon, N.M.; Kettelhut, I. do C.; Karatzaferi, C.; Andrade, C.M.B.; de França, S.A.; Baviera, A.M.; et al. Higher insulin sensitivity

- in EDL muscle of rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet inhibits the caspase-3 and ubiquitin-proteasome proteolytic systems but does not increase protein synthesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2016**, 34, 89–98, doi:10.1016/j.jnutbio.2016.04.008.
253. Tawa, N.E.; Goldberg, A.L. Suppression of muscle protein turnover and amino acid degradation by dietary protein deficiency. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **1992**, 263, E317–E325, doi:10.1152/ajpendo.1992.263.2.E317.
 254. Waterlow, J.C.; Stephen, J.M.L. The effect of low protein diets on the turnover rates of serum, liver and muscle proteins in the rat, measured by continuous infusion of L-[¹⁴C]lysine. *Clinical Science* **1968**, 35, 287–305.
 255. Yin, J.; Li, Y.; Zhu, X.; Han, H.; Ren, W.; Chen, S.; Bin, P.; Liu, G.; Huang, X.; Fang, R.; et al. Effects of Long-Term Protein Restriction on Meat Quality, Muscle Amino Acids, and Amino Acid Transporters in Pigs. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65, 9297–9304, doi:10.1021/acs.jafc.7b02746.
 256. Tawa, N.E.; Kettelhut, I.C.; Goldberg, A.L. Dietary protein deficiency reduces lysosomal and nonlysosomal ATP-dependent proteolysis in muscle. *Am. J. Physiol.* **1992**, 263, E326–334, doi:10.1152/ajpendo.1992.263.2.E326.
 257. Salter, D.N.; Montgomery, A.I.; Hudson, A.; Quelch, D.B.; Elliott, R.J. Lysine requirements and whole-body protein turnover in growing pigs. *British Journal of Nutrition* **1990**, 63, 503–513, doi:10.1079/BJN19900137.
 258. De Sousa-Coelho, A.L.; Marrero, P.F.; Haro, D. Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* **2012**, 443, 165–171, doi:10.1042/BJ20111748.
 259. Laeger, T.; Henagan, T.M.; Albarado, D.C.; Redman, L.M.; Bray, G.A.; Noland, R.C.; Münzberg, H.; Hutson, S.M.; Gettys, T.W.; Schwartz, M.W.; et al. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* **2014**, 124, 3913–3922, doi:10.1172/JCI74915.
 260. Pérez-Martí, A.; Garcia-Guasch, M.; Tresserra-Rimbau, A.; Carrilho-Do-Rosário, A.; Estruch, R.; Salas-Salvadó, J.; Martínez-González, M.Á.; Lamuela-Raventós, R.; Marrero, P.F.; Haro, D.; et al. A low-protein diet induces body weight loss and browning of subcutaneous white adipose tissue through enhanced expression of hepatic fibroblast growth factor 21 (FGF21). *Mol Nutr Food Res* **2017**, 61, doi:10.1002/mnfr.201600725.
 261. Hill, C.M.; Laeger, T.; Dehner, M.; Albarado, D.C.; Clarke, B.; Wanders, D.; Burke, S.J.; Collier, J.J.; Qualls-Creekmore, E.; Solon-Biet, S.M.; et al. FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism. *Cell Rep* **2019**, 27, 2934–2947.e3, doi:10.1016/j.celrep.2019.05.022.

262. Meyer, J.H.; Hargus, W.A. Factors influencing food intake of rats fed low-protein rations. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **1959**, *197*, 1350–1352, doi:10.1152/ajplegacy.1959.197.6.1350.
263. Inagaki, T.; Dutchak, P.; Zhao, G.; Ding, X.; Gautron, L.; Parameswara, V.; Li, Y.; Goetz, R.; Mohammadi, M.; Esser, V.; et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism* **2007**, *5*, 415–425, doi:10.1016/j.cmet.2007.05.003.
264. Müller, T.D.; Tschöp, M.H. Play down protein to play up metabolism? *J. Clin. Invest.* **2014**, *124*, 3691–3693, doi:10.1172/JCI77508.
265. Badman, M.K.; Kennedy, A.R.; Adams, A.C.; Pissios, P.; Maratos-Flier, E. A very low carbohydrate ketogenic diet improves glucose tolerance in ob/ob mice independently of weight loss. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *297*, E1197-1204, doi:10.1152/ajpendo.00357.2009.
266. Yamazaki, T.; Okawa, S.; Takahashi, M. The effects on weight loss and gene expression in adipose and hepatic tissues of very-low carbohydrate and low-fat isoenergetic diets in diet-induced obese mice. *Nutrition & Metabolism* **2016**, *13*, 78, doi:10.1186/s12986-016-0139-1.
267. Hao, L.; Huang, K.H.; Ito, K.; Sae-Tan, S.; Lambert, J.D.; Ross, A.C. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) gene expression is elevated in the liver of mice fed a high-carbohydrate liquid diet and attenuated by a lipid emulsion but is not upregulated in the liver of mice fed a high-fat obesogenic diet. *The Journal of nutrition* **2016**, *146*, 184–190, doi:10.3945/jn.115.216572.
268. Uebanso, T.; Taketani, Y.; Yamamoto, H.; Amo, K.; Ominami, H.; Arai, H.; Takei, Y.; Masuda, M.; Tanimura, A.; Harada, N.; et al. Paradoxical Regulation of Human FGF21 by Both Fasting and Feeding Signals: Is FGF21 a Nutritional Adaptation Factor? *PLoS One* **2011**, *6*, doi:10.1371/journal.pone.0022976.
269. Lundsgaard, A.-M.; Fritzen, A.M.; Sjøberg, K.A.; Myrmel, L.S.; Madsen, L.; Wojtaszewski, J.F.P.; Richter, E.A.; Kiens, B. Circulating FGF21 in humans is potently induced by short term overfeeding of carbohydrates. *Mol Metab* **2017**, *6*, 22–29, doi:10.1016/j.molmet.2016.11.001.
270. Dushay, J.R.; Toschi, E.; Mitten, E.K.; Fisher, F.M.; Herman, M.A.; Maratos-Flier, E. Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol Metab* **2014**, *4*, 51–57, doi:10.1016/j.molmet.2014.09.008.
271. Maekawa, R.; Seino, Y.; Ogata, H.; Murase, M.; Iida, A.; Hosokawa, K.; Joo, E.; Harada, N.; Tsunekawa, S.; Hamada, Y.; et al. Chronic high-sucrose diet increases fibroblast growth factor 21 production and energy expenditure in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2017**, *49*, 71–79, doi:10.1016/j.jnutbio.2017.07.010.

272. Iizuka, K.; Takeda, J.; Horikawa, Y. Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2882–2886, doi:10.1016/j.febslet.2009.07.053.
273. Ables, G.P.; Ouattara, A.; Hampton, T.G.; Cooke, D.; Perodin, F.; Augie, I.; Orentreich, D.S. Dietary Methionine Restriction in Mice Elicits an Adaptive Cardiovascular Response to Hyperhomocysteinemia. *Sci Rep* **2015**, *5*, doi:10.1038/srep08886.
274. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition *Nutrient Requirements of Laboratory Animals*,: *Fourth Revised Edition*, 1995; 1995; ISBN 978-0-309-05126-2.
275. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **1993**, *123*, 1939–1951, doi:10.1093/jn/123.11.1939.
276. Schaart, M.W.; Schierbeek, H.; van der Schoor, S.R.D.; Stoll, B.; Burrin, D.G.; Reeds, P.J.; van Goudoever, J.B. Threonine Utilization Is High in the Intestine of Piglets. *J Nutr* **2005**, *135*, 765–770, doi:10.1093/jn/135.4.765.
277. Bastianelli, D.; Quentin, M.; Bouvarel, I.; Relandeau, C.; Lescoat, P.; Picard, M.; Tesseraud, S. Early lysine deficiency in young broiler chicks. *Animal : an international journal of animal bio-science* **2007**, *1*, 587–94, doi:10.1017/S1751731107685073.
278. Calderon Diaz, J.; Vallet, J.; Boyd, R.; Lents, C.; Prince, T.; DeDecker, A.; Phillips, C.; Foxcroft, G.; Stalder, K. Effect of feeding three lysine to energy diets on growth, body composition and age at puberty in replacement gilts. *Animal Reproduction Science* **2017**, *184*, doi:10.1016/j.anireprosci.2017.06.007.
279. Han, Y.; Baker, D.H. Effects of Sex, Heat Stress, Body Weight, and Genetic Strain on the Dietary Lysine Requirement of Broiler Chicks1. *Poultry Science* **1993**, *72*, 701–708, doi:10.3382/ps.0720701.
280. Jiang, Y.; Xie, M.; Fan, W.; Xue, J.; Zhou, Z.; Tang, J.; Chen, G.; Hou, S. Transcriptome Analysis Reveals Differential Expression of Genes Regulating Hepatic Triglyceride Metabolism in Pekin Ducks During Dietary Threonine Deficiency. *Front Genet* **2019**, *10*, 710, doi:10.3389/fgene.2019.00710.
281. Specter, S.E.; Hamilton, J.S.; Stern, J.S.; Horwitz, B.A. Chronic Protein Restriction Does Not Alter Energetic Efficiency or Brown Adipose Tissue Thermogenic Capacity in Genetically Obese (fa/fa) Zucker Rats. *J Nutr* **1995**, *125*, 2183–2193, doi:10.1093/jn/125.8.2183.
282. Santoso, P.; Nakata, M.; Shiizaki, K.; Boyang, Z.; Parmila, K.; Otgon-Uul, Z.; Hashimoto, K.; Satoh, T.; Mori, M.; Kuro-O, M.; et al. Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose,

- activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep* **2017**, 7, 45819, doi:10.1038/srep45819.
283. Geller, S.; Arribat, Y.; Netzahualcoyotzi, C.; Lagarrigue, S.; Carneiro, L.; Zhang, L.; Amati, F.; Lopez-Mejia, I.C.; Pellerin, L. Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism* **2019**, 30, 833-844.e7, doi:10.1016/j.cmet.2019.08.004.
 284. Faure, M.; Moënnos, D.; Montigon, F.; Mettraux, C.; Breuillé, D.; Ballèvre, O. Dietary Threonine Restriction Specifically Reduces Intestinal Mucin Synthesis in Rats. *J Nutr* **2005**, 135, 486–491, doi:10.1093/jn/135.3.486.
 285. National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, N.R. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Third revised edition, 1978; 1978*;
 286. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **2000**, 28, 27–30, doi:10.1093/nar/28.1.27.
 287. Bassat, M.; Mokady, S. The effect of amino-acid-supplemented wheat gluten on cholesterol metabolism in the rat*. *British Journal of Nutrition* **1985**, 53, 25–30, doi:10.1079/BJN19850006.
 288. Ridlon, J.M.; Harris, S.C.; Bhowmik, S.; Kang, D.-J.; Hylemon, P.B. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. *Gut Microbes* **2016**, 7, 22–39, doi:10.1080/19490976.2015.1127483.



Review

Histidine: A Systematic Review on Metabolism and Physiological Effects in Human and Different Animal Species

Joanna Moro ¹, Daniel Tomé ¹, Philippe Schmidely ², Tristan-Chalvon Demersay ³ and Dalila Azzout-Marniche ^{1,*}

¹ AgroParisTech, Université Paris-Saclay, INRAE, UMR PNCA, 75005 Paris, France; joanna.moro@agroparistech.fr (J.M.); tome@agroparistech.fr (D.T.)

² AgroParisTech, Université Paris-Saclay, INRAE, UMR0791 Mosar, 75005 Paris, France; philippe.schmidely@agroparistech.fr

³ Ajinomoto Animal Nutrition Europe, 75017 Paris, France; Chalvon-Demersay_Tristan@eli.ajinomoto.com

* Correspondence: dalila.azzout-marniche@agroparistech.fr; Tel.: +33-1-44087244

Received: 1 April 2020; Accepted: 8 May 2020; Published: 14 May 2020



Abstract: Histidine is an essential amino acid (EAA) in mammals, fish, and poultry. We aim to give an overview of the metabolism and physiological effects of histidine in humans and different animal species through a systematic review following the guidelines of PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). In humans, dietary histidine may be associated with factors that improve metabolic syndrome and has an effect on ion absorption. In rats, histidine supplementation increases food intake. It also provides neuroprotection at an early stage and could protect against epileptic seizures. In chickens, histidine is particularly important as a limiting factor for carnosine synthesis, which has strong anti-oxidant effects. In fish, dietary histidine may be one of the most important factors in preventing cataracts. In ruminants, histidine is a limiting factor for milk protein synthesis and could be the first limiting AA for growth. In excess, histidine supplementation can be responsible for eating and memory disorders in humans and can induce growth retardation and metabolic dysfunction in most species. To conclude, the requirements for histidine, like for other EAA, have been derived from growth and AA composition in tissues and also have specific metabolic roles depending on species and dietary levels.

Keywords: histidine; metabolism; physiological effects; human; animal species

1. Introduction

Histidine is an essential amino acid in mammals, fish and poultry because it is not de novo synthesized and must be obtained through the diet [1,2]. In these organisms, histidine deficiency induces a decrease in body weight. Moreover, nitrogen balances cannot be maintained with a histidine-devoid diet. In the study by Kriengsinyos et al. [3], it has been shown that histidine deficiency may not affect nitrogen balance if the total protein intake is higher than the current recommendation (0.75 g/kg). However, histidine deficiency induces a decrease in AA oxidation and a decrease in protein turnover. Taking into account these other parameters of protein metabolism, histidine is considered as an indispensable AA in healthy adults. Some studies have also reported the indispensability of histidine for ruminants [4]. Histidine is abundant in red meat and fish, but its content varies among fish species, from histidine-rich fish (dark muscle fish) to histidine-poor fish (white muscle fish). Histidine is present in the body of different species in different forms, including free L-histidine, N (alpha)-acetylhistidine (NAH), histidine-containing protein, and histidine-containing dipeptides such as carnosine and anserine (HRC).

Depending on the species, the requirements and toxicity of histidine differ, as does its effect on metabolism. Therefore, our aim is to present a systematic review following the guidelines of PRISMA [5] (methodology in Supplementary Material, Table S1) of the metabolic and physiological effects of histidine in humans and different animal species. The scope of this review is to compare histidine supplementation on different species, the effect of histidine supplementation on the metabolism, and to analyze the requirement and toxicity for each species. Firstly, common physiological roles of histidine in different species are described, and then, a species-by-species description is made for humans, rodents, pigs, chickens, fish, and ruminants.

2. Common Physiological Roles of Histidine in Different Species

2.1. Histidine Requirements and Metabolism

Histidine requirements are expressed differently among species. For humans, histidine requirements are expressed as daily intake per kilogram body weight. For other species, lysine is frequently used as the reference AA, being known as the first limiting AA. Hence, the requirement patterns for other AAs, including histidine, are expressed in ratio to lysine requirements. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), the histidine ratio (percent histidine/lysine) varies: 36 for pigs (20 to 50 kg), 32 for chicks (0 to 3 wk), 36 for rats, 33 for salmonids, 39 for trout, 37 for common carp and 34 for tilapia.

Histidine undergoes different metabolic pathways (Figure 1). It can be methylated to either 1-methyl or 3-methyl histidine, or converted to imidazole-pyruvic acid by transaminase, which produces imidazole-lactic acid by reduction. Transaminase activity is elevated in fetal rat livers and decreases after birth. Its activity can be modulated by diet: it increases when diet protein content is above 25%, whereas it is not modified below 25%. Histidine can be condensed with β -alanine to form carnosine and anserine, which are involved in protection against oxidative stress [6]. It can also be condensed with decarboxylation to form histamine, or it can undergo irreversible degradation. An irreversible, non-oxidative deamination leads to the formation of trans-uocanic acid and ammonia by the histidine ammonia-lyase, also called histidase, which is a cytoplasmic enzyme [6]. To do this, the α -amino group of L-histidine is removed [7]. This is the primary step in histidine degradation that has been studied in mammals and bacteria.

Urocanic acid has a protective role against harmful effects of ultraviolet rays on the skin. It is metabolized in the liver to 4, 5-dihydro-4-oxo-5-imidazolepropanoic acid by urocanate hydratase, and is then converted to formimino-glutamate (FIGLU) and N⁵-formimino-tetrahydro-folate. In epiderma, urocanate hydratase is not present, and urocanic acid is the last compound of histidine catabolism. This compound accumulates in the epidermis and acts as a natural sunscreen that protects the skin from the effects of UV light [8,9]. Histidase, located only in the liver and epidermis, is the rate-limiting enzyme of histidine degradation [10]. Its activity is very low in the fetal liver and increases progressively during the first three weeks after birth [11]. Some cases of histidase deficiency have been described. In this context, the main step in histidine catabolism is transamination with the accumulation of imidazole-pyruvate, imidazole-lactate and imidazole-acetate [11]. Gene expression of histidase can be modulated by diet. High protein diets or amino acid-imbalanced diets stimulate its expression [12]. Histidase activity increases proportionally to the increase of protein content in the diet. Rats fed histidine-imbalanced diets have shown a lower food intake and weight gain with a higher histidase gene expression [12]. In the case of undernutrition, there is a decrease in histidase activity and histidase mRNA abundance in the liver. This decrease seems to prevent histidine catabolism [13]. It was also shown that in rats on a low protein diet, a load of histidine induced a lower histidine oxidation compared to rats on an adequate diet [14]. Lastly, some studies have shown that histidase can be controlled by estrogen. In female rats, the activity of this enzyme is down-regulated upon ovariectomy [15].

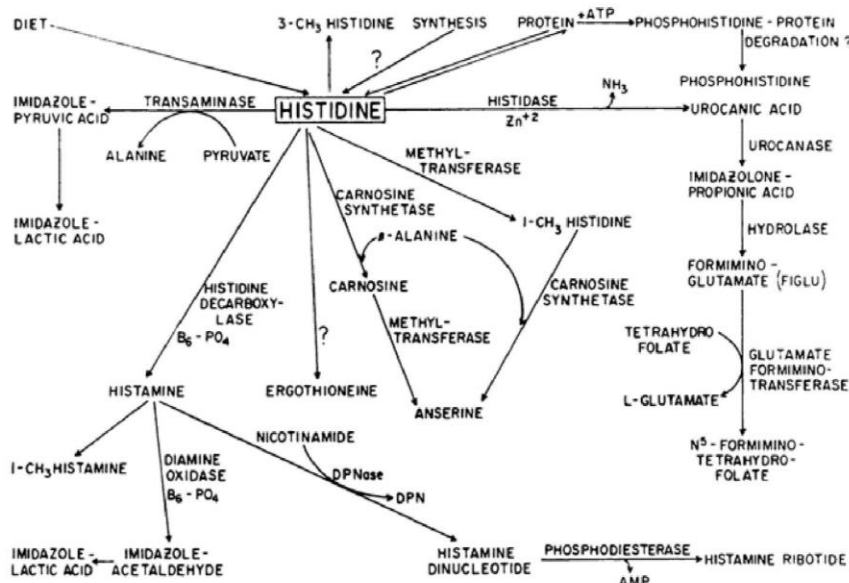


Figure 1. Catabolic pathways of histidine [11].

2.2. Physiological Role of Histidine is Common for All Species

Incorporation into protein: Borsook and Wolf reported that the main region for histidine retention was the viscera. This was determined by the injection of labeled AAs into rodents and the subsequent analysis of the rate of incorporation into protein tissue [16,17]. The maximum rate of histidine incorporation into proteins is slower (max at 30 min after injection of labeled AAs) than for leucine and lysine (max at 10 min for lysine and 20 min for leucine). In guinea pigs, 30 min after intravenous injection of 16 mg/kg of histidine, the rate of incorporation of histidine is 0.9 μ M in small intestine and 1.7 μ M in liver per g of protein per hour. The highest incorporation was measured in microsome fractions [16].

Synthesis of carnosine and anserine: Carnosine is highly concentrated in muscle (except in cardiac muscle) and brain tissues of all mammals and birds, with a particularly high content in the horse [18]. Anserine is found in skeletal muscle of certain mammals such as rabbits, rats and whales, but is not found in any human tissues [11]. Carnosine has been proven to scavenge reactive oxygen species (ROS) as well as alpha-beta unsaturated aldehydes formed from peroxidation of cell membrane fatty acids during oxidative stress. Carnosine and anserine have a beneficial role as anti-oxidant, antiglycation molecules and anti-aging agents and are furthermore considered functional, bioactive compounds when consumed by humans [19].

Decarboxylation of histidine to histamine by histidine decarboxylase: This metabolic conversion is common in all animal species except fish. This enzyme is present in microorganisms of the large intestine and in many tissues (lung, liver, muscle and gastric mucosa). In contrast to histamine, histidine can cross the blood brain barrier. After crossing the blood-brain barrier, and once in the tuberomammillary nucleus (TMN) of the hypothalamus, histidine is converted into histamine by histidine decarboxylase [20]. Subsequently, histamine is oxidized to imidazoleacetaldehyde and then to imidazoleacetic acid [11]. Histamine is a major mediator in allergic diseases and has multiple effects that are mediated by specific surface receptors on target cells. Inflammation is known as the main pathophysiological characteristic of allergies [21]. Moreover, histamine exerts different effects on inflammation [22]. On the one hand, histamine can induce inflammation contributing to pulmonary fibrosis, cardiovascular diseases and atherosclerosis, atopic dermatitis, colitis, nerve tissue damage, and by influencing Th1/Th2 balance. On the other hand, histamine can regulate inflammation. It is involved in wound healing in skin lesions, in the reduction of colitis severity and autoimmune

encephalomyelitis in experimental models, inhibits tumor development, and microbiota-derived histamine is associated with a reduction of asthma severity [22].

Histamine is a neurotransmitter [23] that plays a role in the control of food intake, along with other neurotransmitters (catecholamines, 5-hydroxytryptamine). Studies have shown that histidine decreases food intake through histamine [20,21]. Vaziri et al. studied the effect of histidine administered by intragastric or intraperitoneal routes to rats and measured food intake after blocking the conversion of histidine to histamine by FMH, α -fluoromethylhistidine. They found that histidine decreased food intake, but that the use of FMH reversed the effect of histidine on food intake [24]. Histamine is also involved in sleep mechanisms [25]. There are histamine-expressing neurons in the TMN that are considered wake-active, owing to histamine that acts via H1 and H3 receptors [26]. Some studies have demonstrated that antihistamine treatment induced sleep, blocking effects of histamine on TMN H1 and cholinergic receptors [27,28].

Buffering role of histidine and histidine-related compounds (HRC): Histidine and HRC have a specific role in the intracellular, non-bicarbonate buffering capacity of vertebrate muscle, which is mainly supported by the imidazole groups of free histidine or histidine residues in proteins as well as HRC, in the pH range of 6.5–7.5 (Figure 2). This metabolic process reduces the decrease of intracellular pH caused by proton accumulation during high-intensity anaerobic exercise, and a consequent ATP hydrolysis to ADP. The decrease of intracellular pH inhibits glycolysis and the buffering capacity of histidine, and HRC enhance the capability for anaerobic exercise performance by stabilizing the pH. The contribution of HRC to buffering capacity among species is described in [29].

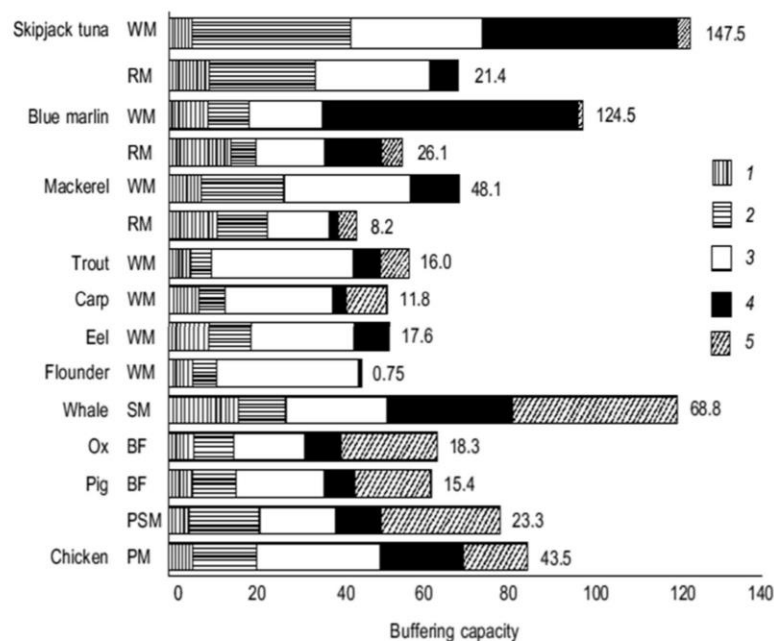


Figure 2. Muscle histidine and histidine-related compounds buffering contribution (4) in comparison with proteins among species (contractile (1) and soluble (2)), inorganic orthophosphate (3), and unknown compounds (5)). Buffering capacity is expressed as $\mu\text{mol NaOH}$ per pH unit per g muscle over pH 6.5–7.5. Values indicated on the bars represent the concentration of total histidine-related compounds ($\mu\text{mol/g}$ muscle). WM, white muscle; RM, red muscle; SM, skeletal muscle; BF, *biceps femoris*; PSM, *psoas muscle*; PM, *pectoralis minor* [29].

2.3. Histidine Strongly Binds Metal (CO(II), Ni(II), Cd(II), Zn(II), Cu(II), and Fe(III) Ions)

The imidazole sidechain of histidine is a common coordinating ligand in metalloproteins. Histidyl residues of metal-activated enzymes and metalloproteins are believed to play an important role in

metal binding by these proteins [30]. Histidine acts on metal regulation, chelating different metal ions such as cobalt(II), nickel(II), copper(II), zinc(II) cadmium(II), and iron(II) [31].

3. Effect of Histidine Level and Supplementation in Humans

According to the FAO, the daily requirement for histidine is 8 to 12 mg/kg of body weight per day in adults. The average intake of histidine in typical, adult diets in Europe, the USA and Japan was reported to be between 2.12 and 2.40 g per day (i.e., about 30 to 35 mg/kg of body weight per day), where men of 50–70 years of age at 5.20 g/day represented the 99th percentile intake [32,33].

3.1. Histidine Intake and Consequences on Body Histidine Status

Steele and Le Bovit [34] have studied histidine tolerance in women who received two levels of L-histidine, 1.5 and 5 g/day. Results showed that at thirty minutes after ingestion, the 1.5 g dose elevated plasma histidine 2- to 8-fold more than the fasting level, while the 5 g dose elevated the level 7- to 11-fold. In both cases (1.5 and 5 g/day), the plasma histidine content remained elevated for a short time and then declined until reaching the fasting level. The rate of fall of the red blood cell histidine was much slower than that of plasma. Block and colleagues [35] also studied histidine tolerance in three healthy adults (two females and one male) that received 5 g of free histidine dissolved in 100 mL water. Blood samples were collected at one, two, and four-hour intervals. One hour after ingestion of 5 g histidine, the amount of histidine in the plasma increased to approximately 7.5, 12.5 and 15 times the fasting level. At the two-hour interval, the amount of plasma histidine for all subjects was less than for the one-hour sample, and continued to decrease. However, it did not return to the fasting level by the end of the tolerance test. These two studies have shown that high doses of histidine rapidly induce a large increase in plasma histidine, that then decrease in a few hours.

3.2. Histidine Supplementation and Eating Disorders

Henkin [36] demonstrated that within four to six days after different amounts of histidine supplementation in healthy, young college men, subjects spontaneously complained of anorexia onset. In volunteers receiving 8 g of histidine daily, anorexia was severe and induced a weight loss of 2–3 lbs over a period of one week, despite persistent encouragement to complete their meals. In general, breakfast was the best-tolerated meal, followed by lunch, and dinner being the least-tolerated meal. With continued administration of larger quantities of histidine, 16 and 32 g daily, all subjects developed a decrease in taste acuity (hypogeusia), and then a decrease in smell acuity, (hyposmia). Further administration of larger doses of histidine was associated with the development of distortions of taste (dysgeusia) and smell perception (dyssomnia). Excessive dietary histidine (50 g of histidine/kg of food) has been reported in some Japanese populations. Okubo and Sasaki [37] examined the correlation between dietary histidine and energy intake among 1689 Japanese female students by using a self-administered diet history survey. Results showed that the ratio of histidine to protein (histidine/protein) was negatively and significantly correlated with energy intake, independent of other dietary factors. Nakajima and colleagues [38] also identified a negative association between histidine/protein and energy intake in 26 male and 38 female students ($r = -0.18$ in men and $r = -0.34$ in women, $p < 0.05$).

In order to investigate the possible efficacy of oral histidine as anorectic therapy in men, Schechter and Prakash [39] fed eight healthy men (ages 32 to 38) with 4 g of histidine supplement per day for four weeks. Results showed that this amount had no significant effect on appetite, taste or smell perception, food intake, or body weight. In addition, total serum zinc, albumin-bound zinc, macroglobulin-bound zinc concentrations, and urinary histidine excretion had not significantly changed. Based on these studies and a risk assessment, the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (Holvik et al., 2016) concluded that supplementation with 4 to 4.5 g/day, corresponding to 57 mg/kg of body weight per day for a 70 kg adult, does not have adverse effects in humans. The scientific committee concluded

that the specified doses of 0.55 and 0.60 g/day of histidine in food supplements are unlikely to cause adverse health effects in adults (≥ 18 years), adolescents (14 to <18 years) or children (10 to <14 years).

3.3. Histidine and Memory Disorders

Geliebter et al. studied the effect of daily histidine doses, from 24 to 64 g, mixed into orange juice, on healthy subjects for four weeks [40]. They reported ensuing headaches, weakness, drowsiness, and nausea in subjects. Two subjects who received 64 g per day reported painful sensations in their eyes and difficult focusing. One subject showed mental confusion after taking 64 g per day, poor memory, and depression with episodes of crying [40]. In contrast, Sasahara and colleagues [41] reported that daily histidine intake (1.65 g/day) actually decreased feelings of fatigue, increased efficiency while performing memory tasks, and promoted clear thinking and concentration in subjects with high fatigue and sleep disruption scores. The large difference in histidine doses likely explains the contradictory effects between studies by Geliebter et al. and Sasahara et al.

3.4. Histidine and Metal Ion Status

Some studies have investigated the effect of histidine on ion absorption. In 113 subjects, for example, iron absorption was not affected by histidine supplementation (416 to 2080 mg/day) [42]. In another study, zinc histidine complexes were better absorbed than zinc sulfate in ten healthy subjects. Therefore, the ingestion of zinc complexes with histidine at a ratio of 1:2 or 1:12 increased serum-zinc concentration 25% more than ingestion of zinc sulfate. No changes in zinc excretion was observed in this study [43]. In 1980, Henkin and colleagues studied the effects of graded increases of histidine doses (8.1–64.8 g, daily) in healthy volunteers and in patients with scleroderma. They observed a graded increase in urinary zinc excretion. In subjects receiving high doses of histidine, urinary zinc excretion increased from 454 ± 50 μg per day to 5269 ± 840 μg per day compared to the control state. In some subjects that received the highest level of histidine supplementation (64.8 g daily), approximately 0.5% of the estimated total body zinc pool was lost through urine each day.

Menkes disease (MD) is a neurodegenerative disorder caused by mutations in the *ATP7A* gene, and can lead to death in early childhood. Symptoms of this disease are attributed to deficient activity of Cu-dependent enzymes (cytochrome oxidase, tyrosinase, superoxide dismutase, dopamine beta hydroxylase, lysyl oxidase, and sulfhydryl oxidase). In patients suffering from MD, copper therapy has been shown to be inefficient. Interestingly, however, due to the chelating effect, copper histidine therapy is beneficial in reversing the skin and hair changes, improving appendicular tone, socio-cognitive milestones, weight gain, and immunity [44–46].

3.5. Histidine and Skin Dysfunction

Histidine status seems to be important in skin dysfunction and various cutaneous diseases. The deficiency in histidine, as in other essential AA (Ile, Leu, Lys, Met, Cys, Phe, Tyr, Thr, Trp, Val, Arg, or Gln) significantly decreased hyaluronan levels in human dermal fibroblasts [47]. Hyaluronan plays an important role in tissue repair and in cellular proliferation and migration in skin. Moreover, Voorhees et al. [48] detected an increasing quantity of labelled histidine within keratohyalin, a “histidine-rich” protein (HRP) that has been isolated and characterized in human necropsy epiderma. However, no changes were observed in HRP synthesis in psoriatic lesions. Regarding dermatitis disease, Tan and colleagues reported that daily oral histidine intake (4 g per day) increased filaggrin formation. Filaggrin is a protein that constitutes the granular layer of keratinocytes that contributes to barrier function through skin hydration and maintenance of stratum corneum acidity. This increase of filaggrin induced a decrease of atopic dermatitis disease severity [49].

3.6. Histidine and Metabolic Syndrome

Dietary histidine may be associated with factors improving metabolic syndrome related to obesity. An internet-based, cross-sectional study conducted in a northern Chinese population by Yan-Chuan Li

and colleagues [50] reported an association between higher dietary histidine intake (1400 mg/d), above dietary requirements (8 to 12 mg/kg of body weight per day in adult according to FAO, corresponding from 560 to 840 mg/day for a healthy adult of 70 kg) and lower prevalence of overweight conditions and obesity, lower BMI, waist circumference, and blood pressure. Insulin resistance, which is an important feature of the metabolic syndrome, seems to be improved in overweight and obese individuals with histidine supplementation [50,51].

Obesity is also associated with a high level of pro-inflammatory cytokines and inflammation biomarkers [52]. In the study by Li et al., results show that dietary histidine is inversely associated with some pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, and the inflammation biomarker CRP. These results are consistent with what was found by the team of Lee [53]. It seems that supplementation with histidine might improve inflammation in overweight and obese people. Adiponectin, an adipocytokine that appears to play a role in the development of insulin resistance, could also be involved in histidine's effect on obesity. A positive correlation was also found between histidine supplementation and serum adiponectin in overweight and obese individuals. Histidine could increase secretion of adiponectin by inhibiting oxidative stress and inflammation in adipose tissue [50].

4. Effect of Histidine Level and Supplementation in Rodents (Rats and Mice)

4.1. Effect on Food Intake

Many studies have shown that histidine acts on feeding behavior [54]. Results of these studies in rats reported that food intake is decreased with increased dietary histidine [20,55]. Kasaoka and colleagues showed a decrease in food intake with a daily dose of 20% casein plus 2.5% or 5% histidine (25 g/kg or 50 g/kg of diet) for eight days, compared with a group that received 20% casein without supplemental histidine. The decrease in food intake caused by dietary histidine can be explained by an activation of histamine neurons [54,56]. Intraperitoneal or intracerebroventricular injection of L-histidine also suppresses food intake. In addition, inhibition of histidine decarboxylase (HDC) reverses this effect, which suggests that histidine suppresses food intake through its conversion into histamine in the hypothalamus [57]. The released histamine acts on food intake through histamine H1 receptors [54]. All of these studies have shown that a higher histidine intake induces a decrease in food intake. As in humans, this decrease in food intake seems to be due to the effect of histamine.

In contrast to these studies showing a decrease in food intake, a study by Holeček demonstrated an increase in food intake in rats that drank histidine-enriched water [58]. They hypothesized that in other studies, the histidine-enriched diet induced an imbalance in AA concentration, leading to competition for cellular transporters to the brain. There was then a reduction of several AA in the brain causing the decrease in food intake. While in their study, to balance the increase in histidine in water, rats increased their food intake. The results might be different if it was not the water but the diet that was enriched with histidine.

4.2. Effect on Neuroprotection

Cerebral ischemia is a major cause of death in adults. Six hours after a cerebral ischemia, astrocytes are activated to induce neuron survival [59]. To avoid the spread of the lesion and to induce the local immune response, astrocytes come together to form a barrier called the glial scar. This barrier can inhibit neurogenesis at a late stage after cerebral ischemia [60].

An early study by Liao and colleagues [61] showed that histidine, converted into histamine, seems to induce neuroprotection at an early stage after cerebral ischemia. With its action on neurons, more specifically on astrocytes, histidine protects them from oxygen-glucose deprivation-induced injuries and inflammatory cells by inhibiting their recruitment. More recently, the same researchers demonstrated that there is also an effect on the late stage after cerebral ischemia [62]. A dose- and stage-dependent treatment with histidine at a high dose of 1000 mg/kg at an early stage, and a decreased dose of 500 mg/kg at a late stage induced astrocyte migration toward the infarct area. This migration

enables neurogenesis in the lesion area, indicating that histidine provides long-term neuroprotection after cerebral ischemia.

Some studies have reported that histidine could protect against epileptic seizures. A study by Chen et al. [63] showed that seizures induced in rats by pentylenetetrazole, a central nervous system (CNS) stimulant, could be reversed by histidine in a dose-dependent manner. The study reported that with 500 mg/kg of histidine in rats, there was a large increase of histamine that entered the cortex, hippocampus and amygdala. These observed effects seemed due to the increase in histamine synthesis owing to its precursor, histidine. A decrease in histamine led to an increase in the duration of epileptic seizures [64], which suggests that there is a link between seizures and histamine concentration in the brain. Actions of histamine on convulsions could be mediated through presynaptic H₃-receptors and postsynaptic H₁-receptors. Moreover, one study suggested that anserine, which is water soluble, could be an active peptide. In mice, the anserine supplementation improved memory functions in Alzheimer disease-model mice by exerting a protective effect on the neurovascular units, which are composed of endothelial cells, pericytes, and supporting glial cells. Therefore, histidine could also have a neuroprotection effect through anserine production [65].

4.3. Effect on Growth and Metabolic Dysfunctions

In a study in which the level of histidine was >2 g/kg BW/day, rats from 7 to 46 weeks showed growth retardation, hepatomegaly and hypercholesterolemia [66,67]; when histidine was >4 g/kg BW/day, hypercholesterolemia was observed after 46 days of treatment [68].

An excess of histidine can have a negative impact on growth, but the effect can be mitigated by increasing dietary protein content. Muramatsu et al. [69] studied the adverse effect of excess levels of histidine in growing rats. When male weanling rats were fed with a diet consisting of 10% casein supplemented with 50 g/kg BW/day of histidine for three weeks, growth was reduced by 77%. However, in rats fed a 25% casein diet supplemented with 50 g/kg BW/day of histidine for three weeks, growth decreased by 23% compared to the unsupplemented control rats [70,71]. Another study [72] showed that, at 6% casein and 20 g/kg diet histidine, growth depression was severe. However, when the protein content of the diet was increased to 12%, the degree of growth depression was lessened. This indicates that rats can better tolerate an excess of histidine with an increased protein content in the diet. These findings are consistent with the observation that activities of histidine-catabolizing enzymes are higher in rats fed moderate- and high-protein diets compared to low-protein diets, and that this results in an enhanced ability to degrade excess histidine with a concomitant decrease in histidine toxicity [70,71]. A 13-week feeding study sought to evaluate the effect of diets containing 0, 3.1, 6.2, 12.5, 25, and 50 g/kg of histidine (L-histidine monohydrochloride) on male and female F344 rats [73]. With the higher dose of histidine, body weight and food intake decreased in males and demonstrated an increase in hemoglobin volume and hematocrit. This effect seemed due to the high dose of histidine, because it is a major component of hemoglobin. The level of blood urea nitrogen and creatinine increased in females, and the level of blood urea nitrogen also increased in females fed 12.5 g/kg histidine. Concerning body composition, there was an increase in the weight of some organs, including the kidney for males of the 25 g/kg and 50 g/kg groups, testis for males of the 50 g/kg group and kidney for females of the 50 g/kg group. Owing to the different adverse effects observed for 50 g/kg fed rats, the authors concluded that the maximum tolerable dose of histidine is 25 g/kg of the diet. In obese rats, histidine (1875 g/kg BW) was seen to improve inflammatory and oxidative status [74] via the NF- κ B- and PPAR γ -involved pathways.

4.4. Effect of Histidine on Mineral Metabolism

As previously described, histidine can chelate metal ions. Some studies have investigated the effect of histidine intake on iron, copper and zinc absorption and retention. Tissue levels of iron and fecal losses of iron were not affected by the histidine supplementation [75]. When histidine was added to an ⁵⁹Fe solution that contained ascorbic acid, it increased absorption [76]. This suggests some direct

reaction between iron and histidine and is consistent with the hypothesis that an AA-iron chelate is formed and subsequently absorbed. Regarding copper, no effect of histidine intake was observed in rats [75]. In vitro, histidine was found to facilitate copper uptake in hepatic, placental, and brain cells [77–80]. Some studies have investigated the effect of histidine-feeding on zinc status, finding that the effect of histidine supplementation is controversial. Freeman and Taylor [81] investigated effects of both acute (intravenous infusion of 250 mg/hr histidine) and chronic (500 mg/day was given by gavage for 43 days) histidine supplementation. They reported an increase in zinc excretion by three to six times following acute and chronic administration of histidine. Elsewhere, however, the decrease of plasma zinc has been observed in acute, but not chronic, supplementation. In young adult rats, dietary repletion with zinc chloride supplemented with L-histidine (40 mg/kg of diet) was more effective at reversing cognitive impairment due to zinc depletion, rather than repletion with a zinc salt alone. This effect could be explained by the stimulation of ^{65}Zn transport across the brain endothelium when histidine was added to perfusion [82]. Snedeker and Greger [75] reported that zinc absorption and utilization were more strongly impacted by protein levels in the diet than by the level of histidine. Nonetheless, other studies have reported that histidine could induce a zinc deficiency. In rats fed histidine levels superior to 4 g/kg BW/day from seven to 46 weeks, a significant reduction in plasma zinc was observed. Interestingly, supplementation of a rat diet with 50 g/kg histidine did not affect the rate of turnover of zinc (the rate of turnover of ^{65}Zn from two to four weeks after a single injection of the tracer), whereas the diet supplemented with 8% histidine induced a severe zinc deficiency (50% reduction in the plasma zinc content) [83]. This effect of histidine supplementation on zinc status could depend on dietary zinc intake. Indeed, when rats were fed a zinc-adequate diet, histidine supplementation did not cause any changes to the zinc status (zinc concentrations, ^{65}Zn tissue distribution, and tissue-specific activities). However, when zinc intake was low, histidine supplementation led to a lower ^{65}Zn retention, associated with increased fecal excretion and a shorter biological half-life [84].

4.5. Histidine and Cancer

Recent data suggest that histidine catabolism and intake influence the sensitivity of cancer cells to methotrexate [85]. Methotrexate is an anticancer treatment for certain solid tumors and blood cancers, but may be toxic for various non-cancer cells. CRISPR/Cas9-mediated depletion of formimidoyltransferase cyclodeaminase (FTCD), histidine ammonia lyase (*HAL*), and amidohydrolase domain containing 1 (*AMDHD1*) decreased the sensitivity of cells to methotrexate. Moreover, methotrexate and histidine treatment of mice induced a marked decrease in tumor size that was significantly greater than in any of the other treatment cohorts. Taken together, these data highlight the role of the histidine degradation pathway in the efficiency of chemotherapy agent methotrexate [86].

4.6. Toxicity Dose

Toxicity doses have been studied in rats from different perspectives: their carcinogenicity as well as lethal doses. No mortality or adverse effects were observed during a 13-week period during which rats were fed with different amounts of histidine (containing 0, 3.1, 6.2, 12.5, 25, and 50 g/kg of histidine) [73]. Another study investigated the long-term toxicity and carcinogenicity of histidine in 100 rats for 104 weeks [87]. This study was performed using two groups, 50 males and 50 females, fed with diets containing 0, 12.5, and 25 g/kg histidine. They observed that tumors developed in all three groups. However, these tumors were the same as those that develop spontaneously in F344 rats. No significant differences for the incidence or the type of tumor were observed between these three groups. The authors concluded that histidine was not carcinogenic in these rats under their experimental conditions. Gullino and colleagues [88] studied toxicity of AAs. They studied the DL50, the dose of histidine that kills 50% of rats, and the DL99.9, the dose that kills all rats. The toxicity data showed that the DL50 was 23 mmol/kg of body weight and the DL100 was 33 mmol/kg of body weight. There was no difference concerning the dose between the two isomers L-histidine and D-histidine.

5. Effect of Histidine Level and Supplementation in Breeding Farmed, Monogastric Pigs and Chickens

5.1. Histidine in Pigs

Figuerola and colleagues [89] studied the effects of AA supplementation on growing pigs submitted to different levels of crude protein (CP) (16%, 12%, or 11% CP), where the limiting AA CP diet (11%) was supplemented or not with histidine or other AAs. The diet at 12% of CP and 11% of CP induced a reduction of growth performance, even if the diet was supplemented with lysine, tryptophan, threonine, and methionine. Results showed that the performance was higher with 16% or 12% CP compared to 11% CP, and that histidine supplementation alone failed to reverse this effect. However, when the supplementation of histidine was combined with valine, pigs exhibited similar feed intake and weight gain compared to the pigs fed the 16% or 12% CP diet, suggesting that valine is limiting before histidine in the diet. Of note, gain-to-feed, defined as the ratio of body weight gain to feed consumption, was still significantly higher with pigs fed the 16% CP diet compared to 11% CP. Lastly, results showed a large reduction in plasma urea concentrations correlated to the decrease in crude protein level in the diet. Supplementation with histidine with valine or valine + isoleucine further reduced plasma urea at d14. Some studies have investigated the effect of dietary supplementation of blood meal as a source of histidine and its impact on anserine and carnosine synthesis. A diet of 95% basal diet +5% blood meal tends to increase the concentration of carnosine in two types of muscle, longissimus dorsi and vastus intermediate [90]. However, this is not the case for anserine, probably due to the little activity of carnosine methylation compared to anserine in pig muscles. Dietary supplementation of blood meal by increasing the histidine concentration seems to be a useful diet strategy in pigs to produce carnosine-enriched pork, as observed in broiler chickens.

5.2. Histidine in Chicken

Few studies have investigated the effect of histidine supplementation in chicken. High supplementation of histidine (4 g/kg on an as fed basis) was shown to reduce average daily gain by 48 to 51% in eight-day-old crossbred chicks [91]. Similarly, growth depression of 31% was observed with a diet supplemented with 3 g/kg of histidine. The main histidine role described for chickens is that of an anti-oxidant through carnosine and anserine, which have a significant anti-oxidative activity. Auh et al. and Park et al. [92,93] have shown that diet supplementation with 5% blood meal increases the concentration of carnosine in chicken breast. In connection with this property, various studies have evaluated diet supplementation with histidine to increase the anti-oxidant capacity of muscle and the nutritional value of meat. A study by Kralik et al. [94] showed that supplementation with histidine induced an increase of carnosine concentration in breast muscle tissue. Diet supplementation with 0.3% histidine induced an increase of carnosine by 8.88%, and a supplementation with 0.5% histidine increased carnosine concentration by 25.96%. Haug et al. [95] experimented with different diets supplemented with histidine, at 1 g/kg, 2 g/kg, and 3 g/kg. They found that with a supplementation of 1 g/kg, there was an increase in breast muscle carnosine concentration of 62% compared to the control group. Kai et al. [96] examined the carnosine and anserine content in muscles of female broilers fed with diets supplemented with graded levels of histidine at 67%, 100% (control) and 200% of histidine requirements according to the NRC (1994). They reported that these dipeptides were decreased in the low histidine group (67%). In particular, carnosine was not detected in muscles in this group. In contrast, these two dipeptides were increased in the high histidine group (200%).

Kopeck studied the effects of histidine and zinc supplementation on broiler chickens [97]. To do so, they used supplementation with histidine (6.83 g/kg diet), either using the pure AA or spray-dried blood cells (SDBC) rich in histidine (6.14 g/kg diet), with or without Zn. There was an increase in anserine/carnosine content in muscle with the pure AA and with SDBC. Concerning enzyme activity, supplementation of histidine enables an increase in superoxide dismutase activity in muscles,

and erythrocytes and glutathione peroxidase activity in plasma, compared to the control diet without histidine supplementation.

In conclusion, the addition of histidine in the diet can increase carnosine and anserine and improve meat quality.

6. Effect of Histidine Level and Supplementation in Fish

6.1. Histidine Effect on Fish Growth

In grass carp fed a histidine-supplemented diet for two weeks (2.0 [control], 3.7, 5.9, 7.9, 9.8 and 12.2 g/kg diet), the dietary histidine requirement of young grass carp (279.1–685.4 g) was 7.63 g/kg, based on growth performance [98]. Above this level, growth performance was lower (Figure 3).

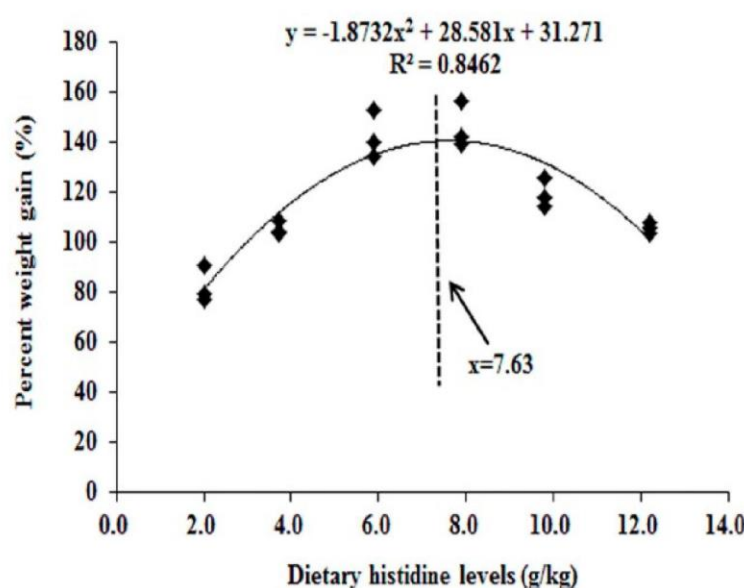


Figure 3. Quadratic regression of the weight gain percentage of grass carp as a function of histidine dose [98].

In catfish, the requirement was demonstrated to be 3.7 ± 0.1 g/kg of histidine based on dry diet, or 15.4 g/kg of histidine when expressed as a percentage of dietary protein. Dietary histidine caused no increase in serum-free histidine levels until the dietary requirement was reached. Muscle carnosine could not be detected in the catfish [99]. In Nile tilapia juveniles fed diets containing graded levels of histidine (4.2, 5.4, 7.1, 8.9, 9.8, and 11.5 g/kg dry diet), the final weight, weight gain, feed conversion ratio, protein efficiency ratio and net protein utilization were optimized in fish fed 8.9 g/kg of histidine kg. However, whole-body protein content was higher in fish fed 7.1 and 9.8 g/kg of histidine kg dry diet. Contrary to mammals and birds, fish are able to recruit new muscles fibers throughout their lifetime. Muscle growth can be modulated by different molecules as myogenic regulatory factors. This study showed that myogenin expression was higher in fish fed 9.8 and 11.5 g/kg of histidine kg dry diet, compared to fish fed 4.2 to 7.1 g/kg of histidine kg dry diet [100]. These results demonstrated that dietary histidine intake positively affects muscle growth.

6.2. Buffering Role of Histidine in Fish

Fish contain a large amount of free histidine and HRC. The HRC buffering capacity has been studied by Abe and al. [101] in two fish species: rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and the Pacific blue marlin (*Makaira nigricans*). They found that HRC contribution to total cellular buffering varied from a high of 62% for white marlin muscle to a low of 7% for red trout muscle. These results suggest

that the HRC buffering capacity depends on fish species and type of muscle. In red muscle, other principal buffers are phosphate and protein with taurine. Buffering capacities of histidine could act through N (alpha)-acetylhistidine (NAH) presence in very high concentrations exclusively in the brain and lens of ectothermic vertebrates, including ray-finned fishes, amphibians and reptiles, but not in those of endothermic birds and mammals. Although NAH is known to be synthesized from histidine and acetyl-CoA by histidine *N*-acetyltransferase (HISAT; EC 2.3.1.33), the gene that encodes HISAT remains unidentified. It was observed that 13 species (seven cichlids, five anabantids, and one catfish) contained considerable amounts of NAH in their skeletal muscles ($>1 \mu\text{mol/g}$). The highest level of NAH ($10.37 \mu\text{mol/g}$) was found in the tissue of *Betta splendens* (Siamese fighting fish). Moreover, the NAH contents in the tissues of *Trichogaster trichopterus* (three spot gourami), *Kryptopterus bicirrhys* (glass catfish), *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), *Mikrogeophagus ramirezi* (ram cichlid), and *Parachromis managuensis* (Guapote tiger) were 3.17–6.16 micromol/g. The skeletal muscle of amphibians (five species) and reptiles (four species) had a low level ($<0.25 \mu\text{mol/g}$) of NAH [29].

6.3. Role of Histidine in Preventing Cataracts in Fish

Another functional aspect of histidine is its capacity to decrease the incidence and severity of cataracts in fish. Cataracts are a major concern in the aquaculture industry. This function of histidine was suggested after an outbreak of cataracts in rapid growth Atlantic salmon fed with feeds free of blood meal, a good source of histidine in the diet [102].

N (alpha)-acetylhistidine (NAH) is a prominent biomolecule in the lens; lens NAH concentrations directly reflect dietary histidine levels in Atlantic salmon. Dietary histidine appears to be one of the important factors in preventing cataracts. The beneficial effects are related to high levels of histidine and the buildup of NAH in the lens, which possess buffering and antioxidant properties [103]. In cultured lenses, the concentration of NAH was significantly reduced in those that were oxidatively stressed. Also, the innate antioxidative defense system was influenced by histidine enrichment in the media through an increase of glutaredoxin expression [104]. NAH in lens has moreover been reported to be involved in lens-water homeostasis. The volume homeostasis and lens transparency were reported to be particularly important in both freshwater and seawater. NAH is exported to ocular fluid where a specific acylase cleaves histidine, which is then actively taken up by the lens and re-synthesized into NAH. Each NAH molecule released into ocular fluid down its gradient carries 33 molecules of bound water, thus effectively transporting the water against a water gradient. Therefore, NAH functions as a molecular water pump to maintain a highly dehydrated lens and thus prevents cataract formation [105]. Dietary levels of histidine modulate lens NAH concentration and have been found to prevent or slow the progression of cataract development. Different studies have investigated the effect of dietary histidine on cataract severity and prevalence. Trösse et al. [106], for instance, reported that lens N-acetyl histidine contents reflected dietary histidine levels. They found that NAH contents were negatively correlated to cataract scores in adult Atlantic salmon (1.7 kg) fed three different amounts of dietary histidine (9, 13, and 17 g histidine/kg diet) for four months. Microarray analysis of the lens transcriptome revealed that among the differentially expressed transcripts were metallothionein A and B (1.5–1.7), as well as transcripts involved in lipid metabolism (Fatty acid-binding protein. Intestinal -2.1), carbohydrate metabolism, regulation of ion homeostasis, and protein degradation. Similarly, in salmon smolts fed different levels of histidine (10, 12, 14, 16 and 18 g histidine/kg diet) for 13 weeks, lens NAH concentrations were positively correlated with histidine intake. Furthermore, cataract prevalence and severity were negatively correlated with the dietary histidine concentration. The authors concluded that the amount of dietary histidine that minimized the risk of cataract development was 14.4 g histidine/kg of diet [105]. In an interesting experiment, Waagbø et al. [107] investigated the effects of histidine diet content (9.3, 12.8 and 17.2 g/kg of diet) and feeding time period (June to July, July to September, September to October) on cataract severity. They observed the development of severe cataracts between July and September [107]. The cataract severity was directly related to the dietary histidine level fed during the first and second periods. The authors

concluded that the risk of cataract development could be prevented by histidine supplementation just before and during the early phase of cataract development.

7. Effect of Histidine Level and Supplementation in Ruminants

7.1. Effect of Histidine on Growth

Schoof et al. [108] explored whether histidine is the first limiting AA for growing ruminants. As such, they used a canula to evaluate the effects of continuous duodenal infusion of histidine on the retention of nitrogen and AA (AA) utilization. They conducted three experiments. In experiments I and II, young bulls were fed with a basal diet containing 125 g of crude protein/kg dry matter, infused intraduodenally with 8 g histidine per day. In experiment III, growing bulls were fed with a low-protein diet containing 94 g CP/kg dry matter, infused with 6 g of histidine per day. Results showed that with the normal-protein or low-protein diet, there were no significant differences for N retention between treatments with or without histidine infusion. The utilization of individual AA was calculated with the ratio 'retained AA to apparently digested intestinal AA'. They found that the most used AA was histidine at 80%, followed by arginine (72%), methionine (60%), leucine (45%), and lysine (44%) during periods without supplementation of histidine. The study concluded that histidine from the basal diet was sufficient to maintain growth under the experimental conditions employed. Nevertheless, in all AA present in the duodenum, histidine could be the first limiting AA for growth [108]. Similarly, a study by Oldham [109] also concluded that histidine was the first limiting AA in raising cattle with maize silage.

On the other hand, a study by Gabel and Poppe [110] used a factorial method to demonstrate that the quantity of histidine present in the rumen and from the diet was insufficient to maintain growth in young bulls.

7.2. Effect of Histidine on Milk Protein Synthesis

Gao and colleagues studied the effects of leucine and histidine, separately, on the mTOR signaling pathway in milk protein synthesis [111]. To do so, they used CMEC-H (bovine mammary epithelial cells) in Earle's balanced salt solution (EBSS), devoid of AAs to eliminate the impact of other AAs, and supplemented with Leucine (Leu) or histidine. Results showed that Leu and histidine stimulated the expression of different casein forms: α s-casein, β -casein, and κ -casein. This suggested that Leu and histidine are limiting factors for milk protein synthesis. Subsequently, the authors studied the effects of histidine on molecules involved in protein synthesis. It is well known that mTOR is a key regulator of milk protein synthesis, and it seems that AAs play a role in mTOR regulation due to a phosphorylation on Ser²⁴⁴⁸. This study proved that there is another phosphorylation site, Ser²⁴⁸¹, that is an indicator of mTOR pathway activation in CMEC-H. P-mTOR was increased with addition of histidine in the full concentration range (0.15, 1.20, 4.80, and 9.60 mmol/L). They also studied the effects of histidine on Raptor and G β L, two other mTORC1 components. Their expression was also increased with histidine supplementation compared to the control group. Concerning S6K1, an mTOR target, there was an increase in phosphorylation within all concentration ranges. This result contrasts to what was found by Prizant and Barash [112], but is in accordance with the study by Toerien et al. [113]. In the study by Prizant and Barash, CMEC (bovine mammary epithelial cells) were incubated with histidine for ten minutes, while in Gao's work, they were incubated for six hours. Gao and al suggest that the lack of AAs in the medium induced a stress and the supplementation of histidine improve cell survival before milk protein synthesis. There was also an increase in P-4EBP1 with histidine supplementation, which is in accordance with the fact that mTOR regulates protein translation by inducing the phosphorylation of 4EBP1. Gao's work seems to show that with the addition of histidine, there is an increase in casein expression through activation of the mTOR pathway.

Another study investigated the effects of histidine-supplemented drinking water on the performance of lactating dairy cows [114]. Their hypothesis was that a sufficient proportion of

histidine added to drinking water would have an effect on milk synthesis in lactating cows. Eight dairy cows were fed with an ad libitum corn and alfalfa silage-based, total mixed ration. The cows had access to water enriched with 0 or 2.5 g/L of histidine, in a crossover design of two periods of 7 days. When histidine was added to the drinking water, water intake increased from 85.1 to 92.1 L/d. On the last day of each period, plasma samples were collected: the concentration of histidine was increased from 14.6 to 21.6 μM , while the concentration of other AAs was not affected. Moreover, the supplementation with histidine had an impact on milk yield with an increase of 1.7 L/d, and on lactose yield with an increase of 90 g/d. This was accompanied by an increase in protein yield and a decrease in fat percentage. However, the effect of water intake was not discussed.

S. Hadrova et al. [115] evaluated the effect of histidine on milk yield and milk composition on high-yield, lactating Holstein cows. The cows were fed with a histidine deficient diet (18% deficiency) and with a diet supplemented in histidine at 13.6 g/d. The food intake did not differ between these two treatments. In accordance with a study by Doelman et al. [114], the yields of milk, protein, casein and lactose were significantly higher with histidine supplementation compared to the control group. Their results seem to show that histidine could be a limiting AA for lactation in dairy cows, in cases where the diet is composed of methionine, lysine, and leucine in proportions that meet requirements.

8. Conclusions

Histidine is an essential AA and its requirements have been derived from growth and AA composition in tissues. In addition to its role in protein metabolism, histidine, as a functional AA, has specific metabolic roles.

As such, when histidine is limiting in the diet in relation to the need for growth, its supplementation can be associated with a better performance. When this supplementation provides histidine beyond growth requirement, other benefits can be observed as described exhaustively in this paper. However, when this supplementation provides histidine in excess, AA imbalance can trigger a decrease in growth and food intake and other unwanted effects. These dose-effects of histidine are summarized thereafter:

- In human, the daily requirement for histidine is 8 to 12 mg/kg of body weight per day in adults, and the average intake in typical adult diets in Europe, USA and Japan was reported to be between 30 to 35 mg/kg of body weight per day (2.12 and 2.40 g per day). Daily histidine supplementation, under 2 g/daily, improves inflammation in overweight and obese people, decreases feelings of fatigue, and increases concentration and efficiency at work. A daily intake of 4 g decreases severity in atopic dermatitis disease. If the supplementation increases up to 8 g of histidine, a severe anorexia is induced. Finally, supplementation with a large dose, from 16 to 64 g/day, induces a decrease in taste and smell acuity, and the onset of headaches, weakness, drowsiness, nausea, and memory disorder.
- In rodents, histidine supplementation up to 25 g/kg of diet is beneficial. A large dose of 50 g/kg of diet can have different adverse effects, such as a large decrease in body weight gain, in food intake, and a growth retardation. Due to this negative effect, maximal tolerable dose of histidine was fixed to 25 g/kg of the diet.
- In pigs, histidine, when combined with other amino acids, can improve performance and amino acid balance in a context of low-protein diet.
- In chickens, the major benefit of histidine supplementation is the increase in carnosine and anserine in the muscle allowing an increase in anti-oxidant capacity.
- In salmonids, a beneficial effect of histidine supplementation is its capacity to decrease the incidence and severity of cataracts.
- In ruminants, histidine supplementation induces an increase in milk yield and an increase in milk protein synthesis.

To conclude, histidine supplementation can be interesting for different aspects depending on the species. In humans, data suggest both clinical and nutritional interests of histidine supplementation

as a strategy to improve metabolic syndrome features, skin dysfunctions, and memory. In animal production, histidine supplementation can be of interest to promote both the yield and quality of end-products. The indispensability of histidine, and the accumulating evidence of its importance in numerous physiological functions make histidine a unique AA which deserves further consideration in both human and animal nutrition.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/12/5/1414/s1>, Table S1: The PRISMA Statement.

Author Contributions: Conceptualization, T.-C.D.; D.T.; D.A.-M. Writing—original draft preparation, J.M and D.A.-M.; writing—review and editing, J.M., D.A.-M., D.T., P.S., T.-C.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Supported by Ajinomoto.

Conflicts of Interest: None of the authors has any conflict of interest.

References

- Rose, W.C. The amino acid requirements of adult man. *Nutr. Abstr. Rev.* **1957**, *27*, 631–647. [PubMed]
- Wu, G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* **2009**, *37*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
- Kriengsinyos, W.; Rafii, M.; Wykes, L.J.; Ball, R.O.; Pencharz, P.B. Long-term effects of histidine depletion on whole-body protein metabolism in healthy adults. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3340–3348. [CrossRef]
- Onodera, R. Essentiality of histidine in ruminant and other animals including human Beings. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **2003**, *16*, 445–454. [CrossRef]
- Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G. PRISMA group preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* **2009**, *6*, e1000097. [CrossRef]
- Taylor, R.G.; Levy, H.L.; McInnes, R.R. Histidase and histidinemia. Clinical and molecular considerations. *Mol. Biol. Med.* **1991**, *8*, 101–116. [PubMed]
- Mehler, A.H.; Tabor, H. Deamination of histidine to form urocanic acid in liver. *J. Biol. Chem.* **1953**, *201*, 775–784.
- Kinuta, M.; Ubuka, T.; Yao, W.B.; Zhao, Y.Q.; Shimizu, H. Isolation of S-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl]-3-thiolactic acid, a new metabolite of histidine, from normal human urine and its formation from S-[2-carboxy-1-(1H-imidazol-4-yl)ethyl]cysteine. *Biochem. J.* **1994**, *297*, 475–478. [CrossRef] [PubMed]
- Hais, I.M.; Štrych, A. Increase in urocanic acid concentration in human epidermis following insolation. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1969**, *34*, 649–655. [CrossRef]
- Zannoni, V.G.; La Du, B.N. Determination of histidine α -deaminase in human stratum corneum and its absence in histidinaemia. *Biochem. J.* **1963**, *88*, 160–162. [CrossRef]
- Stifel, F.B.; Herman, R.H. Histidine metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **1971**, *24*, 207–217. [CrossRef] [PubMed]
- Torres, N.; Beristain, L.; Bourges, H.; Tovar, A.R. Histidine-imbalanced diets stimulate hepatic histidase gene expression in rats. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1979–1983. [CrossRef]
- Tovar, A.R.; Santos, A.; Halhali, A.; Bourges, H.; Torres, N. Hepatic histidase gene expression responds to protein rehabilitation in undernourished growing rats. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1631–1635. [CrossRef] [PubMed]
- Kang-Lee, Y.A.; Harper, A.E. Effect of induction of histidase on histidine metabolism in vivo. *J. Nutr.* **1979**, *109*, 291–299. [CrossRef] [PubMed]
- Feigelson, M. Estrogenic regulation of hepatic histidase during postnatal development and adulthood. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 5088–5093. [PubMed]
- Borsook, H.; Deasy, C.L.; Haagen-Smit, A.J.; Keighley, G.; Lowy, P.H. Metabolism of c^{14} -labeled glycine, L-histidine, L-leucine, and L-lysine. *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 839–848. [PubMed]
- Wolf, G. The metabolism of α - C^{14} -histidine in the intact rat. I. Radioactivity in amino acids from protein. *J. Biol. Chem.* **1953**, *200*, 637–645.
- Harris, R.C.; Marlin, D.J.; Dunnett, M.; Snow, D.H.; Hultman, E. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the thoroughbred horse, greyhound dog and man. *Comp. Biochem. Physiol. A* **1990**, *97*, 249–251. [CrossRef]
- Guiotto, A.; Calderan, A.; Borin, G.; Ruzza, P. Carnosine and Carnosine-Related Antioxidants: A Review. Available online: <http://www.eurekaselect.com/60152/article> (accessed on 28 February 2018).

20. Asahi, R.; Tanaka, K.; Fujimi, T.J.; Kanzawa, N.; Nakajima, S. Proline decreases the suppressive effect of histidine on food intake and fat accumulation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **2016**, *62*, 277–280. [CrossRef]
21. Xie, H.; He, S.-H. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol. WJG* **2005**, *11*, 2851–2857. [CrossRef]
22. Branco, A.C.C.C.; Yoshikawa, F.S.Y.; Pietrobon, A.J.; Sato, M.N. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. *Mediat. Inflamm.* **2018**, *2018*, 9524075. [CrossRef] [PubMed]
23. Sheiner, J.B.; Morris, P.; Anderson, G.H. Food intake suppression by histidine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1985**, *23*, 721–726. [CrossRef]
24. Vaziri, P.; Dang, K.; Anderson, G.H. Evidence for histamine involvement in the effect of histidine loads on food and water intake in rats. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1519–1526. [CrossRef] [PubMed]
25. Zeitzer, J.M. Chapter Six—Control of Sleep and Wakefulness in Health and Disease. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Gillette, M.U., Ed.; Chronobiology: Biological Timing in Health and Disease; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; Volume 119, pp. 137–154.
26. Lin, J.S. Brain structures and mechanisms involved in the control of cortical activation and wakefulness, with emphasis on the posterior hypothalamus and histaminergic neurons. *Sleep Med. Rev.* **2000**, *4*, 471–503. [CrossRef] [PubMed]
27. Simons, F.E.R. Advances in H1-antihistamines. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 2203–2217. [CrossRef]
28. Scammell, T.E.; Jackson, A.C.; Franks, N.P.; Wisden, W.; Dauvilliers, Y. Histamine: Neural circuits and new medications. *Sleep* **2019**, *42*, zsy183. [CrossRef]
29. Abe Details and Download Full Text PDF: Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. Available online: <https://www.pubfacts.com/detail/10951092/Role-of-histidine-related-compounds-as-intracellular-proton-buffering-constituents-in-vertebrate-mus> (accessed on 23 March 2018).
30. Nair, N.G.; Perry, G.; Smith, M.A.; Reddy, V.P. NMR studies of zinc, copper, and iron binding to histidine, the principal metal ion complexing site of amyloid- β peptide. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20*, 57–66. [CrossRef]
31. Morris, P.J.; Bruce Martin, R. Stereoselective formation of cobalt(II), nickel(II) and zinc(II) chelates of histidine. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 2891–2897. [CrossRef]
32. Schmidt, J.A.; Rinaldi, S.; Scalbert, A.; Ferrari, P.; Achaintre, D.; Gunter, M.J.; Appleby, P.N.; Key, T.J.; Travis, R.C. Plasma concentrations and intakes of amino acids in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans: A cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2016**, *70*, 306–312. [CrossRef]
33. Iwasaki, M.; Ishihara, J.; Takachi, R.; Todoriki, H.; Yamamoto, H.; Miyano, H.; Yamaji, T.; Tsugane, S. Validity of a self-administered food-frequency questionnaire for assessing amino acid intake in japan: Comparison with intake from 4-day weighed dietary records and plasma levels. *J. Epidemiol.* **2016**, *26*, 36–44. [CrossRef]
34. Steele, B.F.; Le Bovit, C.B. Leucine and histidine tolerance in the human. *J. Nutr.* **1951**, *45*, 235–244. [CrossRef] [PubMed]
35. Block, W.D.; Westhoff, M.H.; Steele, B.F. Histidine metabolism in the human adult: Histidine blood tolerance, and the effect of continued free L-histidine ingestion on the concentration of imidazole compounds in blood and urine. *J. Nutr.* **1967**, *91*, 189–194. [CrossRef] [PubMed]
36. Henkin, R.I. New aspects in the control of food intake and appetite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1977**, *300*, 321–334. [CrossRef] [PubMed]
37. Okubo, H.; Sasaki, S. Histidine intake may negatively correlate with energy intake in human: A cross-sectional study in Japanese female students aged 18 years. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **2005**, *51*, 329–334. [CrossRef] [PubMed]
38. Nakajima, S.; Hamada, M.; Tsuchiya, T.; Okuda, H. Suppression of food intake by histidine-rich protein under low energy intake. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **2000**, *53*, 207–214. [CrossRef]
39. Schechter, P.J.; Prakash, N.J. Failure of oral L-histidine to influence appetite or affect zinc metabolism in man: A double-blind study. *Am. J. Clin. Nutr.* **1979**, *32*, 1011–1014. [CrossRef]
40. Geliebter, A.A.; Hashim, S.A.; Van Itallie, T.B. Oral L-histidine fails to reduce taste and smell acuity but induces anorexia and urinary zinc excretion. *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, *34*, 119–120. [CrossRef]
41. Sasahara, I.; Fujimura, N.; Nozawa, Y.; Furuhashi, Y.; Sato, H. The effect of histidine on mental fatigue and cognitive performance in subjects with high fatigue and sleep disruption scores. *Physiol. Behav.* **2015**, *147*, 238–244. [CrossRef]

42. Layrisse, M.; Martínez-Torres, C.; Leets, I.; Taylor, P.; Ramírez, J. Effect of histidine, cysteine, glutathione or beef on iron absorption in humans. *J. Nutr.* **1984**, *114*, 217–223. [\[CrossRef\]](#)
43. Schölmerich, J.; Freudemann, A.; Kötting, E.; Wietholtz, H.; Steiert, B.; Löhle, E.; Häussinger, D.; Gerok, W. Bioavailability of zinc from zinc-histidine complexes. I. Comparison with zinc sulfate in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **1987**, *45*, 1480–1486. [\[CrossRef\]](#)
44. Yoganathan, S.; Sudhakar, S.V.; Arunachal, G.; Thomas, M.; Subramanian, A.; George, R.; Danda, S. Menkes disease and response to copper histidine: An Indian case series. *Ann. Indian Acad. Neurol.* **2017**, *20*, 62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Jain, P.; Kannan, L.; Chakrabarty, B.; Kumar, A.; Gupta, N.; Kabra, M.; Gulati, S. Menkes disease—An important cause of early onset refractory seizures. *J. Pediatr. Neurosci.* **2014**, *9*, 11–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Christodoulou, J.; Danks, D.M.; Sarkar, B.; Baerlocher, K.E.; Casey, R.; Horn, N.; Tümer, Z.; Clarke, J.T. Early treatment of Menkes disease with parenteral copper-histidine: Long-term follow-up of four treated patients. *Am. J. Med. Genet.* **1998**, *76*, 154–164. [\[CrossRef\]](#)
47. Yamane, T.; Inoue, Y.; Kobayashi-Hattori, K.; Oishi, Y. Effects of an Amino acid Deficiency on Hyaluronan Synthesis in Human Dermal Fibroblasts. *Food Sci. Technol. Res.* **2016**, *22*, 279–281. [\[CrossRef\]](#)
48. Voorhees, J.J.; Chakrabarti, S.G.; Bernstein, I.A. The metabolism of “histidine-rich” protein in normal and psoriatic keratinization. *J. Invest Dermatol* **1968**, *51*, 344–354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Tan, S.P.; Brown, S.B.; Griffiths, C.E.; Weller, R.B.; Gibbs, N.K. Feeding filaggrin: Effects of l-histidine supplementation in atopic dermatitis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2017**, *10*, 403–411. [\[CrossRef\]](#)
50. Li, Y.-C.; Li, C.-L.; Qi, J.-Y.; Huang, L.-N.; Shi, D.; Du, S.-S.; Liu, L.-Y.; Feng, R.-N.; Sun, C.-H. Relationships of dietary histidine and obesity in northern Chinese adults, an internet-based cross-sectional study. *Nutrients* **2016**, *8*, 420. [\[CrossRef\]](#)
51. Feng, R.N.; Niu, Y.C.; Sun, X.W.; Li, Q.; Zhao, C.; Wang, C.; Guo, F.C.; Sun, C.H.; Li, Y. Histidine supplementation improves insulin resistance through suppressed inflammation in obese women with the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *Diabetologia* **2013**, *56*, 985–994. [\[CrossRef\]](#)
52. Greenberg, A.S.; Obin, M.S. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 461S–465S. [\[CrossRef\]](#)
53. Lee, Y.; Hsu, C.; Lin, M.; Liu, K.; Yin, M. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *513*, 145–150. [\[CrossRef\]](#)
54. Ookuma, K.; Yoshimatsu, H.; Sakata, T.; Fujimoto, K.; Fukagawa, F. Hypothalamic sites of neuronal histamine action on food intake by rats. *Brain Res.* **1989**, *490*, 268–275. [\[CrossRef\]](#)
55. Kasaoka, S.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; Kawahara, Y.; Inoue, S.; Tsuji, M.; Ezaki, O.; Kato, H.; Tsuchiya, T.; Okuda, H.; Nakajima, S. Histidine supplementation suppresses food intake and fat accumulation in rats. *Nutrition* **2004**, *20*, 991–996. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Schwartz, J.C.; Lampart, C.; Rose, C. Histamine formation in rat brain in vivo: Effects of histidine loads. *J. Neurochem.* **1972**, *19*, 801–810. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Yoshimatsu, H.; Chiba, S.; Tajima, D.; Akehi, Y.; Sakata, T. Histidine suppresses food intake through its conversion into neuronal histamine. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 63–68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Holeček, M.; Vodeníčarovová, V. Effects of histidine supplementation on amino acid metabolism in rats. *Physiol. Res.* **2020**, *69*, 99–111. [\[CrossRef\]](#)
59. Rossi, D.J.; Brady, J.D.; Mohr, C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1377–1386. [\[CrossRef\]](#)
60. Yiu, G.; He, Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 617–627. [\[CrossRef\]](#)
61. Liao, R.; Jiang, L.; Wang, R.; Zhao, H.; Chen, Y.; Li, Y.; Wang, L.; Jie, L.-Y.; Zhou, Y.; Zhang, X.; et al. Histidine provides long-term neuroprotection after cerebral ischemia through promoting astrocyte migration. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15356. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhao, Y.-Y.; Yuan, Y.; Chen, Y.; Jiang, L.; Liao, R.-J.; Wang, L.; Zhang, X.-N.; Ohtsu, H.; Hu, W.-W.; Chen, Z. Histamine promotes locomotion recovery after spinal cord hemisection via inhibiting astrocytic scar formation. *CNS Neurosci. Ther.* **2015**, *21*, 454–462. [\[CrossRef\]](#)
63. Chen, Z.; Li, W.-D.; Zhu, L.-J.; Shen, Y.-J.; Wei, E.-Q. Effects of histidine, a precursor of histamine, on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* **2002**, *23*, 361–366.

64. Wada, Y. Biphasic action of the histamine precursor l-histidine in the rat kindling model of epilepsy. *Neurosci. Lett.* **1996**, *204*, 205–208. [\[CrossRef\]](#)
65. Kaneko, J.; Enya, A.; Enomoto, K.; Ding, Q.; Hisatsune, T. Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged A β PPswe/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12571. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Solomon, J.K.; Geison, R.L. L-histidine-induced hypercholesterolemia: Characteristics of cholesterol biosynthesis in rat livers. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.* **1978**, *159*, 44–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Ohmura, E.; Aoyama, Y.; Yoshida, A. Changes in lipids in liver and serum of rats fed a histidine-excess diet or cholesterol-supplemented diets. *Lipids* **1986**, *21*, 748–753. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Harvey, P.W.; Hunsaker, H.A.; Allen, K.G. Dietary L-histidine-induced hypercholesterolemia and hypocupremia in the rat. *J. Nutr.* **1981**, *111*, 639–647. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Muramatsu, K.; Odagiri, H.; Morishita, S.; Takeuchi, H. Effect of excess levels of individual amino acids on growth of rats fed casein diets. *J. Nutr.* **1971**, *101*, 1117–1125. [\[CrossRef\]](#)
70. Benevenga, N.J.; Steele, R.D. Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Annu. Rev. Nutr.* **1984**, *4*, 157–181. [\[CrossRef\]](#)
71. Schirmer, M.D.; Harper, A.E. Adaptive responses of mammalian histidine-degrading enzymes. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1204–1211.
72. Harper, A.E.; Becker, R.V.; Stucki, W.P. Some effects of excessive intakes of indispensable amino acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med.* **1966**, *121*, 695–699. [\[CrossRef\]](#)
73. Ikezaki, S.; Nishikawa, A.; Furukawa, F.; Imazawa, T.; Enami, T.; Mitsui, M.; Takahashi, M. 13-week subchronic toxicity study of L-histidine monohydrochloride in F344 rats. *Eisei Shikenjo Hokoku* **1994**, 57–63.
74. Sun, X.; Feng, R.; Li, Y.; Lin, S.; Zhang, W.; Li, Y.; Sun, C.; Li, S. Histidine supplementation alleviates inflammation in the adipose tissue of high-fat diet-induced obese rats via the NF- κ B- and PPAR γ -involved pathways. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 477–485. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Snedeker, S.M.; Greger, J.L. Metabolism of Zinc, Copper and Iron as Affected by Dietary Protein, Cysteine and Histidine. *J. Nutr.* **1983**, *113*, 644–652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Van Campen, D.; Gross, E. Effect of Histidine and Certain Other Amino Acids on the Absorption of Iron-59 by Rats. *J. Nutr.* **1969**, *99*, 68–74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Darwish, H.M.; Cheney, J.C.; Schmitt, R.C.; Ettinger, M.J. Mobilization of copper(II) from plasma components and mechanisms of hepatic copper transport. *Am. J. Physiol.* **1984**, *246*, G72–G79. [\[CrossRef\]](#)
78. Hartter, D.E.; Barnea, A. Brain tissue accumulates 67copper by two ligand-dependent saturable processes. A high affinity, low capacity and a low affinity, high capacity process. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 799–805.
79. Mas, A.; Sarkar, B. Uptake of 67Cu by isolated human trophoblast cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1992**, *1135*, 123–128. [\[CrossRef\]](#)
80. McArdle, H.J.; Guthrie, J.R.; Ackland, M.L.; Danks, D.M. Albumin has no role in the uptake of copper by human fibroblasts. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *31*, 123–131. [\[CrossRef\]](#)
81. Freeman, R.M.; Taylor, P.R. Influence of histidine administration on zinc metabolism in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* **1977**, *30*, 523–527. [\[CrossRef\]](#)
82. Buxani-Rice, S.; Ueda, F.; Bradbury, M.W.B. Transport of Zinc-65 at the Blood-Brain Barrier During Short Cerebrovascular Perfusion in the Rat: Its Enhancement by Histidine. *J. Neurochem.* **2002**, *62*, 665–672. [\[CrossRef\]](#)
83. Wensink, J.; Van den Hamer, C.J. Effect of excess dietary histidine on rate of turnover of 65Zn in brain of rat. *Biol. Trace Elem. Res.* **1988**, *16*, 137–150. [\[CrossRef\]](#)
84. Van Wouwe, J.P.; Hoogenkamp, S.; Van den Hamer, C.J. A histidine supplement and regulation of the zinc status in Swiss random mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **1990**, *24*, 207–216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Frezza, C. Histidine metabolism boosts cancer therapy. *Nature* **2018**, *559*, 484–485. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Kanarek, N.; Keys, H.R.; Cantor, J.R.; Lewis, C.A.; Chan, S.H.; Kunchok, T.; Abu-Remaih, M.; Freinkman, E.; Schweitzer, L.D.; Sabatini, D.M. Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity. *Nature* **2018**, *559*, 632–636. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Ikezaki, S.; Nishikawa, A.; Furukawa, F.; Enami, T.; Mitsui, M.; Tanakamaru, Z.; Kim, H.C.; Lee, I.S.; Imazawa, T.; Takahashi, M. Long-term toxicity/carcinogenicity study of L-histidine monohydrochloride in F344 rats. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **1996**, *34*, 687–691. [\[CrossRef\]](#)

88. Gullino, P.; Winitz, M.; Birnbaum, S.M.; Cornfield, J.; Otey, M.C.; Greenstein, J.P. Studies on the metabolism of amino acids and related compounds in vivo. I. Toxicity of essential amino acids, individually and in mixtures, and the protective effect of L-arginine. *Arch. Biochem. Biophys.* **1956**, *64*, 319–332. [\[CrossRef\]](#)
89. Figueroa, J.L.; Lewis, A.J.; Miller, P.S.; Fischer, R.L.; Diedrichsen, R.M. Growth, carcass traits, and plasma amino acid concentrations of gilts fed low-protein diets supplemented with amino acids including histidine, isoleucine, and valine. *J. Anim. Sci.* **2003**, *81*, 1529–1537. [\[CrossRef\]](#)
90. Park, S.W.; Kim, C.H.; Kim, J.W.; Shin, H.S.; Paik, I.K.; Kil, D.Y. Effect of dietary supplementation of blood meal and additional magnesium on carnosine and anserine concentrations of pig muscles. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2014**, *34*, 252–256. [\[CrossRef\]](#)
91. Edmonds, M.S.; Baker, D.H. Comparative effects of individual amino acid excesses when added to a corn-soybean meal diet: Effects on growth and dietary choice in the chick. *J. Anim. Sci.* **1987**, *65*, 699–705. [\[CrossRef\]](#)
92. Auh, J.; Namgung, N.; Shin, K.; Park, S.; Paik, I. Effects of supplementary blood meal on the content of carnosine and anserine in broiler meat. *J. Poult. Sci.* **2010**, *47*, 302–309. [\[CrossRef\]](#)
93. Park, S.W.; Kim, C.H.; Namgung, N.; Jung, B.Y.; Paik, I.K.; Kil, D.Y. Effects of dietary supplementation of histidine, β -alanine, magnesium oxide, and blood meal on carnosine and anserine concentrations of broiler breast meat. *J. Poult. Sci.* **2013**, *50*, 251–256. [\[CrossRef\]](#)
94. Kralik, G.; Sak-Bosnar, M.; Kralik, Z.; Galović, O.; Grčević, M.; Kralik, I. Effect of β -alanine and L-histidine on concentration of carnosine in muscle tissue and oxidative stability of chicken meat. *Poljoprivreda* **2015**, *21*, 190–194. [\[CrossRef\]](#)
95. Haug, A.; Rødbotten, R.; Mydland, L.T.; Christophersen, O.A. Increased broiler muscle carnosine and anserine following histidine supplementation of commercial broiler feed concentrate. *Acta Agric. Scand. Sect.-Anim. Sci.* **2008**, *58*, 71–77. [\[CrossRef\]](#)
96. Kai, S.; Watanabe, G.; Kubota, M.; Kadowaki, M.; Fujimura, S. Effect of dietary histidine on contents of carnosine and anserine in muscles of broilers. *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho* **2015**, *86*, 541–546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
97. Kopeć, W.; Jamroz, D.; Wiliczekiewicz, A.; Biazik, E.; Pudło, A.; Hikawczuk, T.; Skiba, T.; Korzeniowska, M. Influence of different histidine sources and zinc supplementation of broiler diets on dipeptide content and antioxidant status of blood and meat. *Br. Poult. Sci.* **2013**, *54*, 454–465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Jiang, W.-D.; Qu, B.; Feng, L.; Jiang, J.; Kuang, S.-Y.; Wu, P.; Tang, L.; Tang, W.-N.; Zhang, Y.-A.; Zhou, X.-Q.; et al. Histidine prevents Cu-induced oxidative stress and the associated decreases in mRNA from encoding tight junction proteins in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
99. Wilson, R.P.; Poe, W.E.; Robinson, E.H. Leucine, isoleucine, valine and histidine requirements of fingerling channel catfish. *J. Nutr.* **1980**, *110*, 627–633. [\[CrossRef\]](#)
100. Michelato, M.; Zaminhan, M.; Boscolo, W.R.; Nogaroto, V.; Vicari, M.; Artoni, R.F.; Furuya, V.R.B.; Furuya, W.M. Dietary histidine requirement of Nile tilapia juveniles based on growth performance, expression of muscle-growth-related genes and haematological responses. *Aquaculture* **2017**, *467*, 63–70. [\[CrossRef\]](#)
101. Abe, H.; Dobson, G.P.; Hoeger, U.; Parkhouse, W.S. Role of histidine-related compounds to intracellular buffering in fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **1985**, *249*, R449–R454. [\[CrossRef\]](#)
102. Breck, O.; Bjerkås, E.; Campbell, P.; Arnesen, P.; Haldorsen, P.; Waagbø, R. Cataract preventative role of mammalian blood meal, histidine, iron and zinc in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) of different strains. *Aquac. Nutr.* **2003**, *9*, 341–350. [\[CrossRef\]](#)
103. Bjerkås, E.; Breck, O.; Waagbø, R. The role of nutrition in cataract formation in farmed fish. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* **2006**, *1*. [\[CrossRef\]](#)
104. Remø, S.C.; Olsvik, P.A.; Torstensen, B.E.; Amlund, H.; Breck, O.; Waagbø, R. Susceptibility of Atlantic salmon lenses to hydrogen peroxide oxidation ex vivo after being fed diets with vegetable oil and methylmercury. *Exp. Eye Res.* **2011**, *92*, 414–424. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Remø, S.C.; Hevrøy, E.M.; Olsvik, P.A.; Fontanillas, R.; Breck, O.; Waagbø, R. Dietary histidine requirement to reduce the risk and severity of cataracts is higher than the requirement for growth in Atlantic salmon smolts, independently of the dietary lipid source. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1759–1772. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Trösse, C.; Waagbø, R.; Breck, O.; Stavrum, A.-K.; Petersen, K.; Olsvik, P.A. Genome-wide transcription analysis of histidine-related cataract in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 1332–1350.

107. Waagbø, R.; Trösse, C.; Koppe, W.; Fontanillas, R.; Breck, O. Dietary histidine supplementation prevents cataract development in adult Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in seawater. *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, 1460–1470. [CrossRef]
108. Schoof, A.; Gabel, M.; Voigt, J.; Schönhusen, U.; Kluth, H. Investigations on the influence of duodenal histidine infusion on nitrogen and amino acid turnover of growing German Holstein bulls. *Arch. Tierernähr.* **2000**, *53*, 303–321. [CrossRef] [PubMed]
109. Alderman, G.; Jarrige, R. Feed Evaluation and Protein Requirement Systems for Ruminants. Available online: <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/72fd322e-2083-4a19-9105-758eda4faf9b/language-en> (accessed on 2 March 2018).
110. Gabel, M.; Poppe, S. Intestinal amino acid in supply in relation to the amino acid requirements in growing bulls. *Arch. Tierernähr.* **1986**, *36*, 227–234. [CrossRef] [PubMed]
111. Gao, H.; Hu, H.; Zheng, N.; Wang, J. Leucine and histidine independently regulate milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells via mTOR signaling pathway. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2015**, *16*, 560–572. [CrossRef] [PubMed]
112. Prizant, R.L.; Barash, I. Negative effects of the amino acids Lys, His, and Thr on S6K1 phosphorylation in mammary epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105*, 1038–1047. [CrossRef]
113. Toerien, C.A.; Trout, D.R.; Cant, J.P. Nutritional stimulation of milk protein yield of cows is associated with changes in phosphorylation of mammary eukaryotic initiation factor 2 and ribosomal s6 kinase 1. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 285–292. [CrossRef]
114. Doelman, J.; Purdie, N.G.; Osborne, V.R.; Cant, J.P. Short communication: The effects of histidine-supplemented drinking water on the performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2008**, *91*, 3998–4001. [CrossRef]
115. Hadrová, S.; Krizova, L.; Richter, M.; Třináctý, J.; Dračková, M. The effect of duodenal infusion of histidine on milk yield, milk composition, and plasma amino acids in dairy cows. *J. Anim. Feed Sci.* **2012**, *21*, 555–565. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESEARCH ARTICLE

Liver GCN2 controls hepatic FGF21 secretion and modulates whole body postprandial oxidation profile under a low-protein diet

Tristan Chalvon-Demersay,¹ Joanna Moro,¹ Patrick C. Even,¹ Catherine Chaumontet,¹ Daniel Tomé,¹ Julien Averous,² Julien Piedcoq,¹ Claire Gaudichon,¹ Anne-Catherine Maurin,² Pierre Fafournoux,² and Dalila Azzout-Marniche¹

¹UMR PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris, France; and ²UMR 1019 Nutrition Humaine, INRA, Université Clermont 1, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, Saint Genès Champanelle, France

Submitted 11 February 2019; accepted in final form 18 September 2019

Chalvon-Demersay T, Moro J, Even PC, Chaumontet C, Tomé D, Averous J, Piedcoq J, Gaudichon C, Maurin AC, Fafournoux P, Azzout-Marniche D. Liver GCN2 controls hepatic FGF21 secretion and modulates whole body postprandial oxidation profile under a low-protein diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317: E1015–E1021, 2019. First published October 1, 2019; doi:10.1152/ajpendo.00022.2019.—General control nonderepressible 2 (GCN2) is a kinase that detects amino acid deficiency and is involved in the control of protein synthesis and energy metabolism. However, the role of hepatic GCN2 in the metabolic adaptations in response to the modulation of dietary protein has been seldom studied. Wild-type (WT) and liver GCN2-deficient (KO) mice were fed either a normo-protein diet, a low-protein diet, or a high-protein diet for 3 wk. During this period, body weight, food intake, and metabolic parameters were followed. In mice fed normo- and high-protein diets, GCN2 pathway in the liver is not activated in WT mice, leading to a similar metabolic profile with the one of KO mice. On the contrary, a low-protein diet activates GCN2 in WT mice, inducing FGF21 secretion. In turn, FGF21 maintains a high level of lipid oxidation, leading to a different postprandial oxidation profile compared with KO mice. Hepatic GCN2 controls FGF21 secretion under a low-protein diet and modulates a whole body postprandial oxidation profile.

fibroblast growth factor 21; general control non-derepressible 2; liver; protein

INTRODUCTION

General control nonderepressible 2 (GCN2) is a serine/threonine kinase that was first identified to play a major role in sensing amino acid deprivation. When the availability of one or several amino acids decreases, GCN2 phosphorylates the eukaryotic initiation factor 2 α , which leads to the blockade of translation initiation and protein synthesis (6). Simultaneously, GCN2/eukaryotic initiation factor 2 α signaling activates a gene expression program mediated by the translational upregulation of the transcription factor activating transcription factor 4 (ATF4) (2). GCN2 is also a sensor of amino acid availability, indeed, GCN2 phosphorylation in the liver is repressed in rats fed a high-protein diet for 14 days (4).

GCN2 is also involved in the control of carbohydrates and lipid metabolism. GCN2-deficient (KO) mice have a less

efficient neoglucogenesis in the fasting state and are not able to repress phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) expression in the fed state (19). In response to a leucine-deficient diet, GCN2-KO (KO) mice also have an increase in fatty acid synthase expression in the liver and develop steatosis (10). Moreover, in response to a low-protein diet, GCN2-KO mice are not able to induce the secretion of fibroblast growth factor 21 (FGF21), which is involved in the regulation of β -oxidation, ketogenesis, neoglucogenesis, and lipogenesis via ATF4 (5, 12). When fed a normo-protein diet, no difference in term of body composition, food intake, and energy expenditure is observed between wild-type (WT) and GCN2-KO mice, whereas when fed a low-protein diet, some of the features observed in WT mice, such as the increase in food intake and in energy expenditure and the decrease in body weight and lean body mass, are blunted in GCN2-KO mice during the first weeks after the introduction of the diet (14).

However, to which extent GCN2, especially hepatic GCN2, is involved in the regulation of energy metabolism in response to changes in dietary protein intake is not clear at this time. To assess the contribution of hepatic GCN2 on the adaptation to dietary protein level, wild-type mice and genetically modified mice, in which the expression of GCN2 in the liver is deleted, were fed diets differing in their relative protein to carbohydrate content, and parameters related to energy metabolic pathways were examined.

In this paper, we highlight the following: 1) hepatic GCN2 controls FGF21 secretion under a low-protein diet; 2) hepatic GCN2 deletion's metabolic consequences depend on dietary protein content; and 3) hepatic GCN2 modulates whole body postprandial oxidation profile through FGF21.

MATERIALS AND METHODS

Animals. The study was approved by the French National Animal Care Committee (no. 14–15) and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals.

GCN2 knockout liver-specific *C57BL/6* mice were generated by crossing albumin-Cre transgenic mice with floxed GCN2 mice. The deletion was confirmed by PCR genotyping as previously described (3).

Male ($n = 52$; 27 WT and 25 GCN2-KO) liver-specific mice were produced and housed in the light and temperature-controlled animal facility of AgroParisTech (12:12-h reversed light/dark cycle, lights on at 21:00, 24°C). Spawners were fed a 20% protein diet throughout the test. Young mice were weaned at 25 days and fed with a normo-protein (14%) diet (NP) for 3 wk (run-in period) before being

Address for reprint requests and other correspondence: D. Azzout-Marniche, UMR PNCA, AgroParisTech 16 rue Claude Bernard F-75005 Paris, France (e-mail: dalila.azzout-marniche@agroparistech.fr).

switched to their experimental diet (test period). Diet compositions are detailed in Table 1.

Experimental Design. During an additional 3-wk period, corresponding to the test period, mice were either kept on the NP diet ($n = 18$, 9 KO and 9 WT), switched to a low-protein (LP) diet ($n = 18$, 9 KO and 9 WT), or switched to a high-protein (HP) diet ($n = 16$, 7 KO and 9 WT). Feed intake was measured daily, except on weekends.

Each mouse was submitted to two meal tolerance tests during the study. To this purpose, they were fasted overnight and refed a standardized test meal (1-g pellet of their usual diet) in the morning. The first meal tolerance test was performed during the second week while the mice were housed in an indirect calorimeter during which respiratory exchanges and spontaneous motor activity were continuously recorded at 2-s intervals to compute the evolution of glucose and lipid oxidation during the transition from the fasting to the fed state as previously described (8). At the termination of the study, the meal tolerance test was repeated to standardize the energy intake for all mice. Thus, only the macronutrients composition of the diet could impact the metabolic orientation. Mice were fasted overnight. At 0700, 50 μ L of blood was collected from the tail vein to measure plasma parameters in the fasting state (see below). At 0800, the mice were fed with a 1-g pellet of their test diet, and 2 h after the meal they were killed with a pentobarbital injection (50 mg/kg). Blood was taken from the vena cava (~200 μ L), collected on EDTA, and centrifuged (4°C, 3,000 revolutions/min for 10 min), and plasma was stored at -80°C until analysis.

Afterwards, body composition was analyzed by dissection and weighing of organs and tissues. Samples of liver, gastrocnemius muscle, epididymal adipose tissue, and brown adipose tissue were placed in TRIzol (Invitrogen) and frozen at -80°C for further measurement of mRNA abundance. Additional liver samples were frozen to assay glycogen and triglyceride content.

Glucose and lipid oxidation in response to ingestion of the test meal. Each mouse was housed individually from 1700 to 1600 the next day in an indirect calorimeter in which temperature was maintained at 30°C and oxygen consumption ($\dot{V}O_2$), carbon dioxide production ($\dot{V}CO_2$), and motor activity (assessed by piezoelectric cells) were continuously recorded at 2-s intervals.

After an overnight fast (~1700 to 0900 the next day), a 1-g pellet (16 kJ) of their test diet was introduced in the calorimetry cage, and it was controlled so that the food was eaten within 15 min.

Glucose (Gox) and lipid oxidation (Lox) were computed according to the Weir formula (8): $Gox \text{ (in W)} = [(4.57 \times \dot{V}CO_2) - (3.23 \times \dot{V}O_2) - (2.87 \times N)] \times (0.279)$; $Lox \text{ (in W)} = [(1.69 \times \dot{V}O_2) - (1.69 \times \dot{V}CO_2) - (1.92 \times N)] \times (0.628)$, with $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ in mL/min and N in mg/min.

Table 1. *Macronutrient composition of the diets*

	P20	NP	LP	HP
Weight content, g/kg				
Milk proteins	200	140	50	530
Starch	570	622	700	287
Sucrose	93	100	113	46
Soy oil	40	40	40	40
Minerals	35	35	35	35
Vitamins	10	10	10	10
Cellulose	50	50	50	50
Choline	2	2	2	2
Energy content, %				
Protein	20.5	14.5	5.2	54.6
Carbohydrate	68.5	75.0	84.0	34.9
Fat	10.5	10.5	10.5	10.5
Energy density, kJ/g	14.57	14.56	14.54	14.60

Diets were prepared by the "atelier de préparation des aliments," UPAAE, INRA, Jouy en Josas, France. Energy density is computed assuming a metabolizable energy of 16.7 kJ/g for carbohydrates and proteins and 37.7 kJ/g for fat. HP, high protein; LP, low protein; NP, normo-protein; P20, 20% protein.

Conversion factors of Gox and Lox from mg/min to W, respectively, are indicated by 0.279 and 0.628 (8). N was estimated assuming that protein oxidation ($Pox = N \times 6.25$) usually contributes to resting metabolic rate in proportion to the protein content in each diet, i.e., 5%, 14%, and 55%, respectively, for LP, NP, and HP diets. However, it was noted that in response to ingestion of an HP meal, only half of the deaminated amino acids are oxidized 4 h after meal onset (9, 18), and therefore protein oxidation was limited to 25% of resting metabolic rate after ingestion of the HP test meal. To validate these calculations and to compare protein oxidation between WT and KO mice, the floor of the calorimetry cage was covered with blotting paper to collect excreted urea. The blotting paper was changed when the meal was given to separate collection during the pre- and post-meal periods. Urea was recovered by soaking the blotting paper into sterile water overnight. Urea was measured using a kit (Urea Kit, Biomérieux) and real protein oxidation calculated assuming (8): $Pox_{\text{in W}} = 6.25 \times \text{excreted urea (mg/min)} \times 2 \times (15.6/60)$.

Analytical procedures. Glucose was measured immediately from a drop of blood using automatic analyzer (Life-Scan, One Touch Vita). Metabolite profile [nonesterified fatty acid, urea, cholesterol, HDL cholesterol, β -hydroxybutyrate, triglycerides (TGs)] was measured using an automated chemistry analyzer, Olympus AU400. Hepatic TG concentration was assayed on homogenized samples of liver using a TG assay kit (Randox Triglycerides). Glycogen was extracted from liver samples using KOH 30%, digested into glucose using amyloglucosidase (Sigma), and assayed using a glucose assay kit (Randox Gluc). Plasma insulin and FGF21 were assayed using enzyme-linked immunosorbent assay kit (Mercodia Mouse Insulin/FGF21 ELISA kit, Symanis).

RNA preparation and gene expression measurement. We investigated lipid and carbohydrate metabolism and energy expenditure assessing mRNA abundance of key genes involved in lipogenesis, lipolysis, glycolysis, neoglucogenesis, and glycogen synthesis in the liver, muscle, and white adipose tissue. We also studied the expression of genes involved in the GCN2/ATF4 pathway specifically in the liver.

Total RNA from samples of liver, gastrocnemius muscle, epididymal adipose tissue, brown adipose tissue, hypothalamus, nucleus accumbens, and epithelial cells from ileum and duodenum was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA concentration was estimated using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm, and RNA integrity was confirmed by electrophoresis on agarose gel. To synthesize cDNA using a High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), retrotranscription was accomplished on 0.4 μ g of RNA. Real-time PCR was performed to measure gene expression on the Step One (Applied Biosystems) using Power SYBR Green PCR Mix (Applied Biosystems) on 5 ng (2.5 μ L) of cDNA. Gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{\text{Gene}} - CT_{18S}$. Data were expressed as a percentage of the values of the WT mice fed the NP diet. Negative controls were used to detect potential contamination (control without retrotranscriptase or RNA). For each run, a melt curve was performed to analyze the products generated and controlled for possible contamination resulting from residual genomic DNA amplification (using control without reverse transcriptase) and/or from primer dimer formation (controls with no cDNA template and no reverse transcriptase) and/or primer specificity. PCR efficiency was determined for each gene using a serial dilution of reverse-transcribed RNA. PCR primers were designed using Primer Express and are available under request. The sequences of primers used are detailed in Supplemental Table S1 (Supplemental Material is available online at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.8187989.v2>).

Statistical analysis. Data are presented as means $\pm$ SE. The effect of the diets and genotype was tested by two-way ANOVA with interaction using R. Pairwise comparisons were performed with post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Food intake, body weight, body composition, and hepatic triglyceride and glycogen concentrations. To investigate how hepatic GCN2 is involved in the regulation of energy metabolism in response to changes in dietary protein intake, wild-type mice and liver-specific GCN2-KO mice were fed for 3 wk with low-, normo-, and high-protein diets. Results showed that in comparison with the NP diet, food intake was larger with the LP diet and lower with the HP diet (Table 2). Thus, mice fed the LP diet had a food intake 1.3-fold and 1.7-fold higher than mice fed the NP and HP diets, respectively. No difference was observed between body weights, but weights of total fat and, in particular, of mesenteric, epididymal, retroperitoneal, and subcutaneous fat pads were reduced in HP-fed mice compared with LP- and NP-fed mice, whereas there was no significant difference between NP- and LP-fed mice. Hepatic triglycerides and glycogen contents decreased with the increase in the protein content of the diet. However, no differences were observed between WT and KO mice on all of these parameters.

Glucose and lipid oxidations in response to ingestion of the test meal. Basal glucose and lipid oxidation measured in overnight-fasted mice were similar in all groups, also indicating that basal metabolic rate (sum of glucose, lipid, and protein oxidation) was similar in all groups. Meal-induced changes in glucose and lipid oxidation were larger in response to the LP test meal and lower in response to the HP meal, which fit with the largest carbohydrate content in the LP meal and the lowest in the HP meal. No difference in glucose and lipid oxidations were observed between KO and WT mice fed the NP and HP meals, whereas when fed the LP meal, from 0.25 h to 2.5 h after ingestion of the test meal, KO mice exhibited a small but significantly larger increase in glucose oxidation and decrease in lipid oxidation than WT mice (Fig. 1). In all groups, since changes in glucose oxidation were quite exactly compensated by similar and opposite changes in lipid oxidation, the thermogenic response to feeding was not different (data not shown).

Plasma metabolites and hormonal concentration. Fasting (but not fed) blood glucose was lower in KO mice compared

with WT mice and lower in LP-fed mice compared with HP-fed mice (Table 2).

Triglycerides, nonesterified fatty acids, total cholesterol, and HDL cholesterol, as well as insulin, were not affected by the protein content of the diet nor by the deletion of hepatic GCN2 (Supplemental Table S2). However, there was a trend toward higher insulinemia for HP-fed mice (diet effect $P = 0.082$).

Plasma urea was higher in HP-fed mice both in the fasting and fed states in comparison with both NP- and LP-fed mice. Interestingly, fasting plasma β -hydroxybutyrate was higher in LP-fed mice, whereas in the fed state it was higher in HP-fed mice. No effect of the deletion was observed on these two parameters (Supplemental Table S2).

Fasting plasma FGF21 concentration was higher in LP-fed mice than in NP- and HP-fed mice. Ingestion of the test meal significantly increased plasma FGF21 only in WT mice that were fed the LP diet and not in KO mice (Fig. 2).

Gene expression measurement. In liver, but not in muscle (Table 3), as expected, GCN2 mRNA abundance was more reduced in KO mice. Residual expression is due to the abundance of Kupffer cells (blood cells in the liver) (7). Expressions of genes involved in lipid metabolism were affected only by the protein content of the diet; mRNA-encoding fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase a (ACCA), and elongation of very-long-chain fatty acids protein 6 were lower in mice fed the HP diet compared with NP or LP diets, and mRNA-encoding diglyceride acyltransferase and glycerol-3-phosphate acyltransferase were higher in mice fed the LP diet compared with mice fed the NP diet. These changes suggest that the decrease in protein and the parallel increase in carbohydrates in the diet induced an increase in hepatic fatty acid synthesis. Moreover, the expression of lipoprotein lipase and low-density lipoprotein receptor was higher in mice fed the LP diet, suggesting that these higher expressions could help coping with the higher triglyceride synthesis.

Regarding carbohydrate metabolism, mRNA-encoding PEPCCK was higher in mice fed the HP diet, whereas the expression of glucose-6-phosphatase (*G6pc1*) was lower in mice fed the LP test meal. Taken together, these observations suggest that neogluco-

Table 2. Body composition, food intake and fasting glucose of WT and KO mice fed NP, LP or HP diets

Diet (Genotype)	NP		LP		HP		Genotype	Test Diet	Interaction
	WT	KO	WT	KO	WT	KO			
Cumulative food intake, g	68.26 $\pm$ 3.16	70.93 $\pm$ 2.83*	93.64 $\pm$ 2.74	88.45 $\pm$ 3.16†	54.26 $\pm$ 2.58	52.37 $\pm$ 3.80‡	NS	<0.001	NS
Initial weight, g	21.83 $\pm$ 0.28	21.76 $\pm$ 0.58	21.87 $\pm$ 0.43	21.36 $\pm$ 0.54	22.21 $\pm$ 0.48	21.44 $\pm$ 0.49	NS	NS	NS
Final weight, g	23.17 $\pm$ 0.48	23.54 $\pm$ 0.55	22.07 $\pm$ 0.44	21.6 $\pm$ 0.61	22.51 $\pm$ 0.89	22.56 $\pm$ 0.79	NS	NS	NS
Fat mass, g	1.91 $\pm$ 0.11	1.98 $\pm$ 0.16*	2.16 $\pm$ 0.16	1.97 $\pm$ 0.18*	1.1 $\pm$ 0.13	1.2 $\pm$ 0.14†	NS	<0.001	NS
Epididymal adipose tissue, g	0.45 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.05*	0.47 $\pm$ 0.04	0.44 $\pm$ 0.05*	0.27 $\pm$ 0.04	0.29 $\pm$ 0.03†	NS	<0.001	NS
Retroperitoneal adipose tissue, g	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02*	0.2 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.02*	0.07 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01†	NS	<0.001	NS
Mesenteric adipose tissue, g	0.19 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.02*	0.2 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.03*	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01†	NS	<0.001	NS
Subcutaneous adipose tissue, g	1.04 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.08*	1.18 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.09*	0.58 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.09†	NS	<0.001	NS
Hepatic triglycerides	44.3 $\pm$ 6.94	43.42 $\pm$ 7.86*	52.57 $\pm$ 7	56.98 $\pm$ 7.21*	18.58 $\pm$ 2.68	26.25 $\pm$ 8.15†	NS	<0.001	NS
Hepatic glycogen	29.44 $\pm$ 2.5	34.3 $\pm$ 2.61*	38.96 $\pm$ 3.47	40.93 $\pm$ 3.55†	25.12 $\pm$ 4.34	20.97 $\pm$ 2.99‡	NS	<0.001	NS
Fasting glucose	112.25 $\pm$ 14.9	91.78 $\pm$ 10.04	84 $\pm$ 13.2	62.78 $\pm$ 7.21	122.57 $\pm$ 17.86	96.83 $\pm$ 18.27	<0.05	<0.05	NS

Values are means $\pm$ SE. HP, high protein; KO, general control nonderepressible 2-deficient; LP, low protein; NP, normo-protein; NS, not significant; WT, wild-type. *, †, ‡ Different symbols within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$).

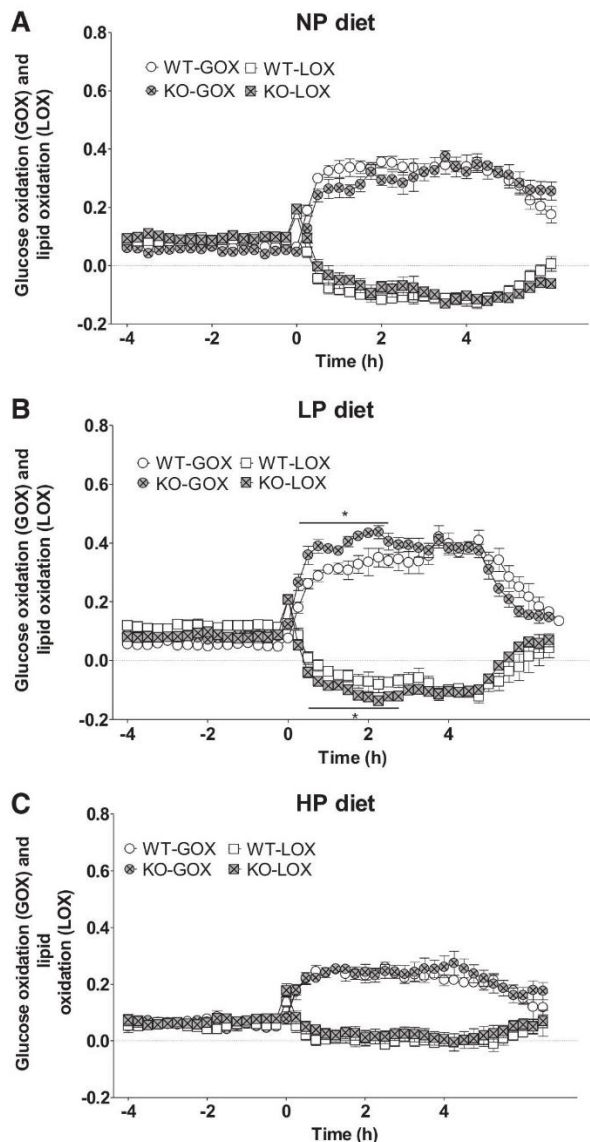


Fig. 1. Meal-induced changes in glucose oxidation (GOX) and lipid oxidation (LOX) following the ingestion of a test meal. *A*: glucose and lipid oxidation in wild-type (WT) and general control nonderepressible 2-deficient (KO) mice fed the normo-protein (NP) diet. *B*: GOX and LOX in WT and KO mice fed the low-protein (LP) diet. *C*: GOX and LOX in WT and KO mice fed the high-protein (HP) diet. Fasted mice were fed at 0900 ($T = 0$) with 1 g of their respective maintenance diet. Data are mean $\pm$ SE ($n = 6-8$). $*P < 0.05$ between WT and KO mice.

genesis is stimulated when the diet is high in protein and low in carbohydrates and inhibited when the diet is low in protein and high in carbohydrates.

Interestingly, the expressions of *Atf4* and target genes *Ddit3* (encoding CCAAT/enhancer-binding protein- β homologous protein, CHOP) and *Trib3* (encoding tribbles homolog 3, TRB3), were decreased in KO mice under the LP diet com-

pared with WT mice. Similarly, liver mRNA-encoding FGF21 was lower in KO mice fed the LP test meal (Fig. 3A).

No effect was observed on the expression of gene-encoding proteins involved in ketogenesis (acetyl-CoA acyltransferase, ACAA; hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, HMG lyase), in fatty acid oxidation [carnitine palmitoyltransferase (CPT1) a], and glycolysis (liver pyruvate kinase, L-PK) (Supplemental Table S3).

In brown adipose tissue (Table 3), mRNA expression was affected only by the protein content of the diet. mRNA encoding for CPT1a, CPT1b, and uncoupling protein (UCP) 2 was larger in LP-fed mice and ACCa was lower in HP-fed mice, whereas no significant changes were observed for UCP1. In line with these observations, in white adipose tissue, mRNA expression was also affected only by the protein content of the diet. LP diet intake was associated with higher levels of mRNA-encoding ACCa and fatty acid synthase (Table 3). Taken together, these observations suggest a concomitant up-regulation of lipogenesis, fatty acid oxidation, and energy expenditure in these two tissues. Interestingly, UCP3 mRNA was lower in KO mice fed the LP diet compared with WT mice (Fig. 3B). In muscle, UCP2 mRNA was higher in mice fed the LP diet (Table 3), but no effect of the diet or the genotype was observed on the expression of other genes (Supplemental Table S3). No effect of genotype or diet was observed on gene-encoding proteins involved in the control of food intake in the hypothalamus, nucleus accumbens, or epithelial intestinal cells (Supplemental Table S3).

DISCUSSION

The purpose of this study was to get a better understanding of the role played by liver GCN2 in the metabolic adaptations to dietary protein content. To this end, wild-type mice and liver-specific GCN2-KO mice were fed for 3 wk with low-, normo-, and high-protein diets.

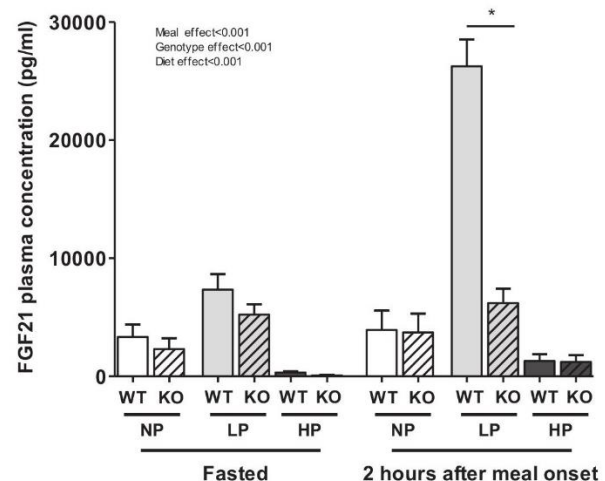


Fig. 2. FGF21 concentration. Modulation of FGF21 protein abundance in the plasma in the fasting state and 2 h after meal onset. Data are mean $\pm$ SE ($n = 7-9$). $*P < 0.05$ between WT and KO mice. HP, high protein; KO, general control nonderepressible 2-deficient; LP, low protein; NP, normo-protein; WT, wild-type.

Table 3. mRNA abundance in liver, BAT, WAT, and muscle of WT and KO mice fed LP, NP, or HP diets 2 h after meal onset

Diet (Genotype)	NP		LP		HP		Genotype	Test Diet	Interaction
	WT	KO	WT	KO	WT	KO			
Liver									
GCN2	1 ± 0.23	0.16 ± 0.02	0.84 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.92 ± 0.14	0.20 ± 0.04	<0.0001	NS	NS
CHOP	1 ± 0.16	0.90 ± 0.08*	7.28 ± 2.11	1.33 ± 0.29†‡	1.27 ± 0.21	1.69 ± 0.28*	<0.01	<0.01	<0.01
TRB3	1 ± 0.10	0.96 ± 0.17*	35.1 ± 12.4	2.23 ± 0.88†‡	1.20 ± 0.42	2.80 ± 1.19*	<0.01	<0.01	<0.01
ATF4	1 ± 0.18	0.98 ± 0.08	2.15 ± 0.43	1.09 ± 0.15‡	1.25 ± 0.46	1.17 ± 0.14	0.08	0.07	NS
FAS	1 ± 0.27	1 ± 0.27*	0.61 ± 0.05	0.65 ± 0.14*†	0.48 ± 0.11	0.48 ± 0.08†	NS	<0.05	NS
ACCa	1 ± 0.15	0.82 ± 0.13*†	0.96 ± 0.11	0.97 ± 0.07*	0.66 ± 0.12	0.71 ± 0.08†	NS	<0.05	NS
Elovl6	1 ± 0.2	0.86 ± 0.12*†	1.01 ± 0.15	1.2 ± 0.17*	0.66 ± 0.16	0.5 ± 0.08†	NS	<0.01	NS
DGAT	1 ± 0.12	1.11 ± 0.18*	1.4 ± 0.31	1.78 ± 0.19†	1.26 ± 0.25	1.31 ± 0.16*†	NS	<0.05	NS
GPAT	1 ± 0.12	0.65 ± 0.04*	1.35 ± 0.21	1.62 ± 0.21†	0.64 ± 0.07	0.97 ± 0.17*	NS	<0.0001	<0.05
LPL	1 ± 0.15	2.12 ± 0.9*	5 ± 1.87	4.8 ± 1.62†	1.21 ± 0.22	1.52 ± 0.21*	NS	<0.05	NS
LDLr	1 ± 0.18	0.75 ± 0.11*	1.31 ± 0.17	1.55 ± 0.21†	0.69 ± 0.1	0.83 ± 0.18*	NS	<0.001	NS
PEPCK	1 ± 0.44	0.86 ± 0.21*	1.07 ± 0.36	1.1 ± 0.31*†	1.88 ± 0.54	1.77 ± 0.31†	NS	<0.05	NS
G6PC1	1 ± 0.18	1.05 ± 0.28*	0.28 ± 0.06	0.62 ± 0.12†	0.91 ± 0.21	0.92 ± 0.15*	NS	<0.01	NS
BAT									
ACCa	1 ± 0.14	0.94 ± 0.21*	1.25 ± 0.17	1.02 ± 0.16*	0.52 ± 0.07	0.49 ± 0.09*	NS	<0.001	NS
CPT1a	1 ± 0.35	0.8 ± 0.09*	1.86 ± 0.35	1.55 ± 0.3†	0.82 ± 0.15	1.06 ± 0.26*	NS	<0.01	NS
CPT1b	1 ± 0.13	1.4 ± 0.25*	2.09 ± 0.31	1.44 ± 0.11†	1.45 ± 0.18	1.62 ± 0.19*†	NS	<0.05	NS
UCP2	1 ± 0.14	0.59 ± 0.11*	1.57 ± 0.26	1.63 ± 0.17†	0.68 ± 0.09	0.92 ± 0.23*	NS	<0.0001	NS
UCP1	1 ± 1.16	1.00 ± 0.48	1.35 ± 0.75	0.79 ± 0.35	1.08 ± 0.46	1.38 ± 1.12	NS	NS	NS
WAT									
ACCa	1 ± 0.12	1.13 ± 0.19*	1.94 ± 0.21	1.67 ± 0.19†	0.78 ± 0.15	1.49 ± 0.61*	NS	<0.0001	NS
FAS	1 ± 0.21	1.24 ± 0.17*	3.05 ± 0.69	2 ± 0.41†	0.85 ± 0.33	2.7 ± 1.87*	NS	<0.01	NS
Muscle									
GCN2	1 ± 0.26	1.11 ± 0.17	1.08 ± 0.20	0.96 ± 0.18	0.98 ± 0.12	1.21 ± 0.19	NS	NS	NS
UCP2	1 ± 0.20	1.68 ± 0.50*	1.86 ± 0.38	2.01 ± 0.22†	1.14 ± 0.08	1.84 ± 0.54*†	NS	<0.001	NS

Values are means ± SE. ACCa, acetyl-CoA carboxylase a; ATF4, activating transcription factor 4; BAT, brown adipose tissue; CHOP, CCAAT/enhancer-binding protein-β homologous protein; CPT1a, carnitine palmitoyltransferase a; DGAT, diglyceride acyltransferase; Elovl6, elongation of very-long-chain fatty acids protein 6; FAS, fatty acid synthase; G6PC1, glucose-6-phosphatase; GCN2, general control nonderepressible 2; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; HP, high protein; KO, GCN2-deficient; LDLr, low-density lipoprotein receptor; LP, low protein; LPL, lipoprotein lipase; NP, normo-protein; NS, not significant; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; TRB3, tribbles homolog 3; UCP, uncoupling protein; WT, wild-type. *,†,‡Different symbols within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$).

KO mice exhibited globally lower fasting blood glucose levels and, when fed the LP test meal, had a higher increase in glucose oxidation and a higher decrease in lipid oxidation and failed to induce FGF21, ATF4, CHOP, and TRB3 mRNA, as did the WT mice. The consumption of a low-protein diet was associated with an increase in food intake and an increase in gene expression involved in lipogenesis, fatty acid oxidation, and energy expenditure as reported previously (1, 12, 15). These processes probably compensated for each other as mice fed the LP diet did not exhibit

significant differences in terms of body composition with NP-fed mice. On the contrary, we observed that the HP diet induced a decrease in food intake associated with a decrease in adiposity, which is consistent with the literature (15). Moreover, HP diet intake induced an increase in ketogenesis in the fed state and potentially an increase in gluconeogenesis or glyconeogenesis, as suggested by the upregulation of PEPCK expression in the liver.

Laeger et al. (13) have reported that general deletion of GCN2 in mice resulted in an inability to induce FGF21

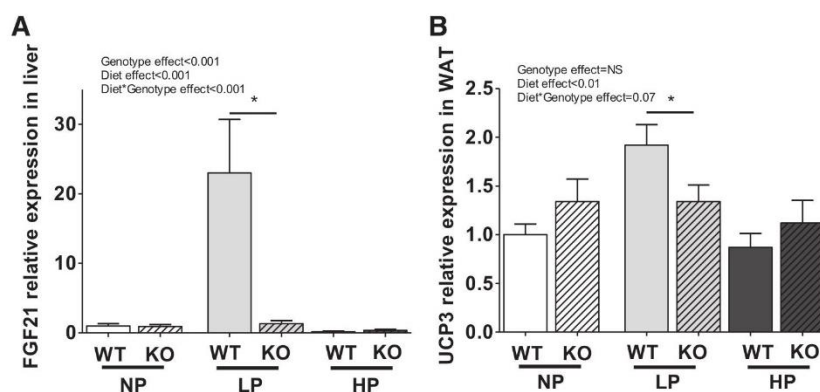


Fig. 3. FGF21 and uncoupling protein (UCP)3 gene expressions. A: modulation of FGF21 mRNA abundance in the liver of mice 2 h after meal onset. B: modulation of UCP3 mRNA abundance in the white adipose tissue (WAT) of mice 2 h after meal onset. Data are mean ± SE ($n = 7-9$). * $P < 0.05$ between WT and KO mice. HP, high protein; KO, general control nonderepressible 2-deficient; LP, low protein; NP, normo-protein; NS, not significant; WT, wild-type.

secretion in response to the intake of a low-protein diet. Our results are in line with this observation and suggest the central roles of hepatic GCN2 in the sensing of protein content and in the expressions of genes encoding ATF4, CHOP, and TRB3 in the liver. These results should be confirmed by measuring protein changes of the GCN2 signaling pathway. In addition, it has been reported that FGF21 treatment in cardiomyocytes in culture induces the expression of genes encoding UCP3 (16). In our study, we observed that UCP3 mRNA was increased in white adipose tissue in WT but not in KO mice that were fed an LP diet. UCP3 is highly expressed in brown adipose tissue (11), and thus the increase of its expression in white adipose tissue suggests a browning of white adipose tissue and could explain the maintenance of a slightly higher rate of LOX observed in LP-fed WT mice.

Laeger et al. (13) also reported that the higher food intake observed with LP diets was suppressed in GCN2-KO and FGF21-deficient mice, suggesting that FGF21 is responsible for the higher intake observed with LP diets. In the present study, we observed that WT and KO mice fed the LP diet had the same food intake but that an LP test meal induced the secretion of FGF21 only in WT mice. Moreover, no changes in gene expression encoding neuropeptides in the hypothalamus were observed. This leads us to hypothesize that the increase in feed intake is not mediated only by the GCN2 signaling pathway in liver but involves another sensing pathway and/or other organs. However, these results should be confirmed by measuring protein changes of the GCN2 signaling pathway.

We also observed that, following the meal tolerance tests, the rates of glucose and lipid oxidation were the same between wild-type and KO mice after ingestion of an NP or HP test meal but that, after ingestion of the LP test meal, KO mice exhibited larger changes in the rates of glucose and lipid oxidation. In the context of this study, one possible mechanism is that, after ingestion of the NP and HP test meals, the flow of amino acids to the liver was sufficient to prevent the phosphorylation of GCN2. Therefore, the lack of GCN2 in KO mice did not affect the metabolic fate of glucose and free fatty acids in comparison with WT mice. In contrast, in response to the LP test meal, the reduced flow of amino acids to the liver would activate the GCN2 pathway in wild-type mice. Since KO mice were not able to activate this adaptive pathway, we observed in KO mice a defective postprandial metabolic fate of dietary carbohydrates and lipids characterized by an exaggerated increase in glucose oxidation and an exaggerated decrease in lipid oxidation (hyperflexibility). Since WT but not KO mice exhibited a huge increase in FGF21 secretion after refeeding, this response was probably mediated by FGF21. Accordingly, FGF21 is known to stimulate lipid oxidation (18) and could therefore explain why post-meal lipid oxidation was less reduced in WT than in KO mice and according to the Randle's cycle why symmetrically, glucose oxidation less increased (17).

In addition, Xu et al. (20) have reported that in GCN2-KO mice, the expression of PEPCK, the rate-limiting enzyme involved in gluconeogenesis, is not repressed in the postprandial state compared with wild-type mice both at the mRNA and protein level. Hepatic neosynthesized glucose could therefore be oxidized in peripheral tissues, which could partially explain the increase in glucose oxidation. However, our experiments failed to show any difference in liver PEPCK mRNA between

wild-type and GCN2-KO liver-specific mice, but that remained to be confirmed at the protein level. In this same study, Xu et al. reported that in GCN2-KO mice, blood glucose was lower 24 and 48 h after fasting and that gluconeogenesis from exogenous pyruvate was less efficient. In line with these results, we observed that, whatever the diet, fasting blood glucose was globally lower in KO mice compared with WT mice.

In conclusion, the consequences of GCN2 deletion depend on the protein content of the diet. When the dietary protein content is sufficient, the GCN2 pathway remains inactivated, and silencing of the GCN2 pathway in the liver does not affect substrate handling by the liver. In contrast, when the dietary protein content is low, GCN2 is activated in the liver of WT mice. This, in turn, induces FGF21 secretion and leads to adaptive changes in the postprandial oxidation profile of glucose and free fatty acids, a response that is blunted in GCN2-KO mice.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Morgane Dufay who took care of the animals.

GRANTS

This study was funded by the mixed unit of research Nutrition Physiology and Ingestive Behavior.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

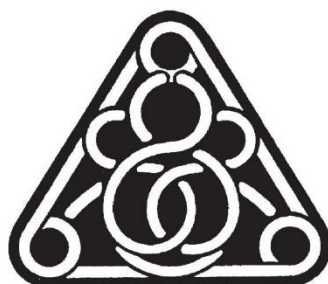
AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.C.-D., P.C.E., C.C., D.T., J.A., C.G., A.-C.M., P.F., and D.A.-M. conceived and designed research; T.C.-D., J.M., P.C.E., C.C., J.P., and D.A.-M. performed experiments; T.C.-D., J.M., A.-C.M., and D.A.-M. analyzed data; T.C.-D., P.C.E., D.T., J.A., C.G., P.F., and D.A.-M. interpreted results of experiments; T.C.-D. prepared figures; T.C.-D. drafted manuscript; T.C.-D., J.M., P.C.E., D.T., and D.A.-M. edited and revised manuscript; T.C.-D., P.C.E., C.C., D.T., J.A., J.P., C.G., A.-C.M., P.F., and D.A.-M. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Aparecida de França S, Dos Santos MP, Garófalo MA, Navegantes LC, Kettelhut IC, Lopes CF, Kawashita NH. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 25: 1186–1192, 2009. doi:10.1016/j.nut.2009.03.011.
2. B'chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 41: 7683–7699, 2013. doi:10.1093/nar/gkt563.
3. Chalvon-Demersay T, Even PC, Chaumontet C, Piedcoq J, Viollet B, Gaudichon C, Tomé D, Foretz M, Azzout-Marniche D. Modifying the dietary carbohydrate-to-protein ratio alters the postprandial macronutrient oxidation pattern in liver of AMPK-deficient mice. *J Nutr* 147: 1669–1676, 2017. doi:10.3945/jn.117.250803.
4. Chotechuan N, Azzout-Marniche D, Bos C, Chaumontet C, Gausserès N, Steiler T, Gaudichon C, Tomé D. mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1313–E1323, 2009. doi:10.1152/ajpendo.91000.2008.
5. De Sousa-Coelho AL, Marrero PF, Haro D. Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem J* 443: 165–171, 2012. doi:10.1042/BJ20111748.
6. Dever TE, Hinnebusch AG. GCN2 whets the appetite for amino acids. *Mol Cell* 18: 141–142, 2005. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.023.
7. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol* 3: 785–797, 2013. doi:10.1002/cphy.c120026.

8. Even PC, Nadkarni NA. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303: R459–R476, 2012. doi:10.1152/ajpregu.00137.2012.
9. Fromentin C, Azzout-Marniche D, Tomé D, Even P, Luengo C, Piedcoq J, Fromentin G, Gaudichon C. The postprandial use of dietary amino acids as an energy substrate is delayed after the deamination process in rats adapted for 2 weeks to a high protein diet. *Amino Acids* 40: 1461–1472, 2011. doi:10.1007/s00726-010-0756-3.
10. Guo F, Cavener DR. The GCN2 eIF2 α kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab* 5: 103–114, 2007. doi:10.1016/j.cmet.2007.01.001.
11. Hilse KE, Kalinovich AV, Rupprecht A, Smorodchenko A, Zeitz U, Staniek K, Erben RG, Pohl EE. The expression of UCP3 directly correlates to UCP1 abundance in brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* 1857: 72–78, 2016. doi:10.1016/j.bbabo.2015.10.011.
12. Huang X, Hancock DP, Gosby AK, McMahon AC, Solon SM, Le Couteur DG, Conigrave AD, Raubenheimer D, Simpson SJ. Effects of dietary protein to carbohydrate balance on energy intake, fat storage, and heat production in mice. *Obesity (Silver Spring)* 21: 85–92, 2013. doi:10.1002/oby.20007.
13. Laeger T, Henagan TM, Albarado DC, Redman LM, Bray GA, Noland RC, Münzberg H, Hutson SM, Gettys TW, Schwartz MW, Morrison CD. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J Clin Invest* 124: 3913–3922, 2014. doi:10.1172/JCI74915.
14. Laeger T, Albarado DC, Burke SJ, Trosclair L, Hedgepeth JW, Berthoud HR, Gettys TW, Collier JJ, Münzberg H, Morrison CD. Metabolic responses to dietary protein restriction require an increase in FGF21 that is delayed by the absence of GCN2. *Cell Reports* 16: 707–716, 2016. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.044.
15. Morrison CD, Laeger T. Protein-dependent regulation of feeding and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 26: 256–262, 2015. doi:10.1016/j.tem.2015.02.008.
16. Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, Garrabou G, Casademont J, Giral M, Villarroya F. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res* 106: 19–31, 2015. doi:10.1093/cvr/cvu263.
17. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 281: P785–P789, 1963. doi:10.1016/S0140-6736(63)91500-9.
18. Samms RJ, Murphy M, Fowler MJ, Cooper S, Emmerson P, Coskun T, Adams AC, Kharitonov A, Ebling FJ, Tsintzas K. Dual effects of fibroblast growth factor 21 on hepatic energy metabolism. *J Endocrinol* 227: 37–47, 2015. doi:10.1530/JOE-15-0334.
19. Stepien M, Gaudichon C, Fromentin G, Even P, Tomé D, Azzout-Marniche D. Increasing protein at the expense of carbohydrate in the diet down-regulates glucose utilization as glucose sparing effect in rats. *PLoS One* 6: e14664, 2011. [Erratum in: *PLoS One* 6: 2011.] doi:10.1371/journal.pone.0014664.
20. Xu X, Hu J, McGrath BC, Cavener DR. GCN2 regulates the CCAAT enhancer binding protein beta and hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E1007–E1017, 2013. doi:10.1152/ajpendo.00063.2013.



Titre : Impact de la déficience en acides aminés indispensables sur le métabolisme protéique et énergétique, et identification de signatures métaboliques

Mots clés : Protéines, acides aminés, besoin, métabolisme protéique, métabolisme énergétique, métabolomique

Résumé : La disponibilité de sources de protéines pour l'alimentation humaine est une préoccupation majeure du fait des transitions démographiques, économiques et nutritionnelles mondiales. Les apports en protéines doivent couvrir les besoins en neuf acides aminés considérés comme indispensables (AAI). Il est important que leur besoin soit couvert pour éviter des situations de déséquilibre du métabolisme protéique et énergétique. Différentes études ont été développées afin de déterminer ce besoin : bilan azoté, méthode factorielle, et méthodes utilisant les isotopes stables. Cependant, ces méthodes sont lourdes et invasives et les valeurs de besoins obtenues présentent des différences importantes. Il est donc nécessaire de développer des approches plus précises et non invasives, telle que la métabolomique, recommandée par la FAO.

Les objectifs de cette thèse sont d'évaluer l'impact de la déficience en protéines et en AAI (lysine et thréonine) sur le métabolisme protéique et énergétique et d'identifier des marqueurs de la déficience de ces deux acides aminés chez le rat en croissance. Des niveaux sévères de déficience (85% ; 75%) en protéines et en lysine et thréonine diminuent le poids et la masse maigre et augmentent la prise alimentaire. Ces effets sont associés à une diminution de la synthèse protéique, et à une augmentation du métabolisme énergétique pour les faibles apports en protéines. Ces effets semblent médiés par FGF21. Les analyses de métabolomiques dans les urines révèlent que des variations du pipécolate et de la taurine signalent respectivement une déficience en lysine et en thréonine.

Title: Impact of indispensable amino acid deficiency on protein and energy metabolism, and identification of metabolic signatures

Keywords : Protein, amino acids, requirement, protein metabolism, energy metabolism

Abstract: The availability of protein sources for human nutrition is a major concern due to global demographics, economics, and nutritional transitions. Protein intakes must cover the need for nine indispensable amino acids (IAA). It is important that this need is met to avoid situations of protein and energy metabolism imbalance. Various studies have been developed to determine this need: nitrogen balance, the factorial method, and methods using stable isotopes. However, these methods are difficult and invasive, and the obtained values of needs present significant differences. It is therefore necessary to develop more precise and non-invasive approaches, such as metabolomics, as recommended by the FAO.

The objectives of this thesis are to assess the impact of protein and IAA (lysine and threonine) deficiency on protein and energy metabolism and to identify markers of deficiency for these two amino acids in the growing rat. Severe levels of deficiency (85%; 75%) in protein and lysine and threonine decrease weight and lean mass and increase food intake. These effects are associated with a decrease in protein synthesis and an increase in energy metabolism in low protein diets. These effects seem to be mediated by FGF21. Analyses of metabolomics in urine show that variations in pipicolate and taurine indicate lysine and threonine deficiencies, respectively.