



HAL
open science

Etude de la biodisponibilité des protéines et acides aminés du tournesol chez le rat et l'Homme ; mise en œuvre de la méthode double traceur

Romain Tessier

► To cite this version:

Romain Tessier. Etude de la biodisponibilité des protéines et acides aminés du tournesol chez le rat et l'Homme ; mise en œuvre de la méthode double traceur. Alimentation et Nutrition. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASA017 . tel-03267957

HAL Id: tel-03267957

<https://pastel.hal.science/tel-03267957v1>

Submitted on 22 Jun 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.

Etude de la biodisponibilité des
protéines et acides aminés du
tournesol chez le rat et l'Homme ;
mise en œuvre de la méthode
double traceur

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, le 03 juillet 2020, par

Romain TESSIER

Composition du Jury

Philippe SCHMIDELY

Professeur, AgroParisTech

Président du Jury

Amélie DEGLAIRE

Maître de conférences, HDR,
Agrocampus Ouest

Rapporteur & Examinatrice

Rozenn RAVALLEC

Professeure, Université de Lille

Rapporteur & Examinatrice

Didier REMOND

Directeur de recherche, INRAE

Examineur

Olivier GALET

Ingénieur, Avril

Examineur

Claire GAUDICHON

Professeure, AgroParisTech

Directrice de thèse

Remerciements

Si la thèse est considérée comme l'aboutissement du travail d'un doctorant, elle ne serait pas possible sans la participation d'un grand nombre de personnes.

Je souhaiterais tout d'abord remercier Amélie Deglaire (Agrocampus Ouest) et Rozenn Ravallec (Université de Lille) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'Olivier Galet (Avril), Didier Rémond (INRAE) et Philippe Schmidely (AgroParisTech) d'avoir accepté d'être membres du jury en tant qu'examineurs.

Je souhaite remercier chaleureusement Claire Gaudichon de m'avoir fait confiance pour mener ce sujet de thèse et pour son encadrement. Je ne saurais exprimer ma gratitude pour tout ce qu'elle m'a apporté humainement et scientifiquement. Merci de m'avoir poussé à me dépasser quand il le fallait.

Un grand merci à Nadezda Khodorova de m'avoir patiemment formé à l'utilisation des appareils de spectrométrie de masse et d'avoir toujours été disponible pour m'aider à dompter ces machines capricieuses. Je n'aurais pas pu faire un quart de tout ce travail sans elle. Merci aussi d'avoir contribué au travail de mes biceps avec toutes ces bouteilles de gaz portées.

Je tiens à remercier Juliane Calvez pour son aide dans les manip au laboratoire et les jours d'expérimentation à l'hôpital, ainsi pour avoir toujours été disponible pour répondre aux moindres questions et interrogations que j'ai pu avoir.

Merci à Valérie Micard et Jean-Noël Thibault pour leur participation aux comités de thèse, leurs échanges enrichissants et leurs rappels que trois ans peuvent passer bien vite si on ne fait pas attention.

Je tiens à remercier Romain Kapel, Olivier Galet et Alain Quinsac, ainsi que tous les labos et entreprises impliqués dans les projets Prodiges et ProdiAl qui ont permis la réalisation de cette thèse, qui n'est qu'un maillon d'une longue chaîne. Plus particulièrement, je souhaite remercier Aurélie Dinard et Francis Cacérés de Terres Inovia pour la production et le marquage du tournesol, Oléad pour le décorticage des graines, l'UMR LRGP de Nancy pour la production des isolats, Food Innov pour la production des biscuits et Avril pour leur support et la gestion de la chaîne logistique. Je remercie l'INRA d'avoir co-financé ma thèse et Sofiprotéol d'avoir co-financé ma thèse et financé ma prolongation de contrat.

Merci au Pr. Robert Benamouzig et Dr Gheorghe Airinei de l'hôpital Avicenne de Bobigny où a été réalisée l'étude clinique. Un grand merci à Marie-Claude Amard pour son aide précieuse et pour toute la nourriture partagée (madeleines, brioches, croissants...) qui ont rendu ces longues journées bien plus agréables.

Je tiens à remercier Daniel Tomé de m'avoir accueilli dans le laboratoire et par ses commentaires scientifiques toujours justes de mes articles. Merci à Dalila Azzout-Marniche de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir veillé à la bonne intégration des doctorants au sein de celle-ci. Merci à Julien Piedcoq pour son aide, notamment pour la mise au point du dosage de l'urée. Un grand merci à Morgane Dufay pour son aide à l'animalerie et avec les animaux. Merci à Angélique Foucault et Vanessa Hudry pour leur aide dans la réalisation de cette thèse. Merci à Catherine Chaumontet pour son aide et son rire reconnaissable entre mille. Merci à Véronique Mathé pour son aide et pour son attention quotidienne au port des équipements de protection individuels. Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire que je n'ai pas cités. Cela aura été un plaisir de partager tout ce temps avec eux, que ce soit au laboratoire ou dans les moments conviviaux fréquents et nécessaires.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : Maude, Zhen, Fanny, Myriam, Pierre-Louis et Séverine. Leur contribution dans cette thèse n'est pas négligeable et j'ai beaucoup appris à les encadrer.

Une petite pensée pour les volontaires qui ont participé à l'étude clinique et supporté les sondes et les prises de sang ainsi que pour les rats qui ont servi durant les études animales.

Au moment de finir mes études, j'ai une pensée pour tous ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ces longues années. Merci à Maude Le Gall en particulier, de m'avoir pris en stage de Master 2 et de m'avoir tant appris. Je suis particulièrement fier de l'article que nous avons publié ensemble.

Une énorme pensée pour tous les doctorant(e)s, et docteurs que j'ai pu croiser pendant ces quatre années au laboratoire : Trenton, Simon, Sandra, Olivier, Olga, Nathalie, Moufidath, Marion, Lauriane, Joséphine, Joanna, Gabrielle, Florence, Erwan, Clélia, Chloé, Armelle, Alya et Alison. Merci pour toutes les conversations sans fins, les fous rires, votre participation au « projet commun », et tous les moments passés dans le bureau ou en dehors. La vie de doctorant ne serait pas la même dans ce laboratoire sans vous.

Je tiens à remercier ma famille, et notamment mes parents et mon frère, de m'avoir toujours soutenu dans la réalisation de cette thèse, malgré une incompréhension totale de mon sujet et de ce que je fais.

Pour finir, je tiens à remercier Claire, celle qui partage ma vie, pour son soutien indéfectible et pour avoir toujours cru en moi. Sa présence pendant le confinement a été précieuse pour ma motivation et mon équilibre psychologique.

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	5
Liste des abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Contexte de réalisation de la thèse	12
Valorisation scientifique	13
Introduction générale	16
Chapitre I – Introduction bibliographique	21
1. La consommation de protéines : du besoin à la qualité protéique	21
1.1. Physiologie digestive des protéines.....	21
1.2. Besoins en protéines.....	23
1.2.1. Définitions et évaluation du besoin en protéines.....	23
1.2.2. Spécificités du besoin en protéines : importance des conditions physiologiques de l'individu.....	26
1.3. Qualité des protéines : composition et méthodes d'évaluation.....	27
1.3.1. Qualité des protéines sur la base de la composition en acides aminés.....	27
1.3.2. Qualité des protéines à travers différents indices.....	32
1.3.2.1. Coefficient d'efficacité protéique.....	32
1.3.2.2. Utilisation nette des protéines.....	33
1.3.2.3. Valeur biologique.....	34
1.3.2.4. Digestibilité.....	34
1.3.2.5. PDCAAS.....	36
1.3.2.6. DIAAS.....	36
2. La digestibilité des protéines et acides aminés	38
2.1. Facteurs de variation de la digestibilité.....	38
2.1.1. Les modèles d'études.....	38
2.1.2. Environnement des protéines dans le repas.....	44
2.2. Méthodes de mesure de la digestibilité.....	46
2.2.1. Où mesurer la digestibilité : mesure Iléale vs fécale ?.....	46

2.2.2.	<i>Comment résoudre la problématique des pertes endogènes ?</i>	47
2.2.2.1.	Estimation des pertes endogènes	47
2.2.2.2.	Mesure par marquage des sécrétions digestives	49
2.2.2.3.	Mesure par marquage des protéines	49
Chapitre II – Travaux de thèse		54
1. Justification des travaux de thèse		54
2. Méthodes		54
2.1.	Obtention d'isolats protéiques de tournesol marqués	54
2.2.	Principe de la digestibilité des protéines et acides aminés chez le rat.....	56
2.3.	Principe de la digestibilité iléale et de la méthode double traceur chez l'Homme	57
2.3.1.	<i>Mesure de la digestibilité iléale avec une sonde naso-iléale</i>	57
2.3.2.	<i>Méthode double traceur</i>	58
2.3.3.	<i>Etude du métabolisme postprandial de l'azote alimentaire</i>	59
2.4.	Méthodes analytiques.....	59
2.4.1.	<i>EA-IRMS</i>	59
2.4.2.	<i>GC-C-IRMS</i>	61
2.4.3.	<i>UHPLC</i>	63
3. Articles		66
3.1.	Article 1 : Le marquage intrinsèque au ¹⁵ N et ² H montre que, chez le rat, la digestibilité réelle des protéines et acides aminés d'un isolat de tournesol est presque aussi élevée que celle du lactosérum.....	66
3.2.	Article 2 : Digestibilité réelle des protéines et acides aminés de la spiruline ¹⁵ N dans un modèle de rat.....	94
3.3.	Article 3 : Mise à l'épreuve de l'utilisation de la spiruline ¹³ C comme protéine de référence dans la méthode double traceur afin de déterminer la digestibilité des acides aminés de plusieurs sources protéiques chez le rat.....	114
3.4.	Article 4 : Mesure iléale et méthode double traceur pour déterminer la digestibilité des acides aminés et la qualité protéique de biscuits de tournesol marqués au ¹⁵ N chez des volontaires sains.....	138

Chapitre III – Discussion et conclusion	176
1. Discussion	176
1.1. Qualité protéique du tournesol.....	176
1.2. Méthode double traceur.....	185
1.2.1. <i>Utilisation de la spiruline comme protéine de référence</i>	185
1.2.2. <i>Mise en place de la méthode double traceur chez le rat</i>	188
1.2.3. <i>Utilisation de la méthode double traceur chez l'Homme</i>	191
2. Conclusion	198
Bibliographie	202
Annexe	220

Liste des abréviations

AA : acide aminé

Ala	alanine	Leu	leucine
Arg	arginine	Lys	lysine
Asn	asparagine	Met	méthionine
Asp	aspartate	Phe	phénylalanine
Cys	cystéine	Pro	proline
Gln	glutamine	Ser	sérine
Glu	glutamate	Thr	thréonine
Gly	glycine	Trp	tryptophane
His	histidine	Tyr	tyrosine
Ile	isoleucine	Val	valine

AAA : acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine)

AAD : acide aminé dispensable

AAI : acide aminé indispensable

AAS : acides aminés soufrés (méthionine et cystéine)

AMQ : 6-aminoquinoline

APE : *atom percent excess* – excès d'atome pourcent

AQC : 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate

Asx : aspartate et asparagine

AT% : atome pourcent

CEP : coefficient d'efficacité protéique

DAAO : *direct amino acid oxydation* – oxydation directe des acides aminés

DIA : digestibilité iléale apparente

DIAAS : *digestible indispensable amino acid score* – score d'acide aminé indispensable digestible

DIS : digestibilité iléale standardisée

DIV : digestibilité iléale vraie

EA : *elemental analyzer* - analyseur élémentaire

EHC : *enzyme hydrolyzed casein* – caséine hydrolysée enzymatiquement

FAO : *Food and Agriculture Organization* – Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FTN : *flow through needle* – module d'injection

GC-C : *gas chromatography coupled to a combustion furnace* – chromatographie gazeuse couplée à un four de combustion

Glx : glutamate et glutamine

HA : homoarginine

IAAO : *indicator amino acid oxydation* – oxydation de l'acide aminé indicateur

IRMS : *isotopic ratio mass spectrometer* – spectromètre de masse à ratio isotopique

NHS : N-hydroxysuccinimide

N x : facteur de conversion de l'azote en protéines

PDA : *photodiode array detector* – détecteur à barrettes de diodes

PDCAAS : *protein digestibility corrected amino acid score* – score d'acide amine corrigé par la digestibilité protéique

PEG : polyéthylèneglycol

QSM : *quaternary solvent manager* – module des pompes à solvants

RPN : rétention protéique nette

TCD : thermal conductivity detector – catharomètre

UHPLC : *ultra-high performance liquid chromatography* – chromatographie liquide à ultra haute performance/pression

UNP : utilisation nette des protéines

UPPN : utilisation postprandiale nette des protéines

VB : valeur biologique

VBP : valeur biologique postprandial

Liste des figures

Figure 1. Prévisions d'augmentation de la population mondiale de 2020 à 2100.....	16
Figure 2. Apport en protéines selon les continents entre 1961 et 2017	16
Figure 3. Emissions de gaz à effet de serre de plusieurs produits d'élevage ou de cultures...17	
Figure 4. Surface exploitée et production de graines du tournesol, du colza et du soja en Europe entre 2000 et 2018	18
Figure 5. Principaux transporteurs d'acides aminés de l'intestin grêle.....	22
Figure 6. Métabolisme protéique du microbiote intestinal	23
Figure 7. Schéma du principe des méthodes d'oxydation des acides aminés, DAAO et IAAO...25	
Figure 8. Schéma explicatif simplifié du protocole dit de Minekus pour la digestion <i>in vitro</i> statique.....	39
Figure 9. Schéma simplifié du modèle de digestion <i>in vitro</i> dynamique de l'estomac et de l'intestin grêle.....	40
Figure 10. Schéma explicatif du principe de la méthode double traceur.....	52
Figure 11. Protocole de marquage pour l'étude pilote sous serre	55
Figure 12. Protocole de marquage pour l'étude en plein champs.....	55
Figure 13. Enrichissement en ² H des acides aminés de l'isolat de tournesol produit en serres et enrichissement en ¹⁵ N des acides aminés des deux isolats de tournesol, produits en serres et en plein champ.....	56
Figure 14. Schéma de l'extrémité de la sonde naso-iléale. Photographie d'une sonde naso-iléale entière. Radiographie de la sonde naso-iléale au niveau de l'iléon terminal.	57
Figure 15. Plateaux isotopiques plasmatiques obtenus par Devi <i>et al.</i> . Enrichissement en ¹³ C des acides aminés indispensables provenant de la spiruline. Enrichissement en ² H des acides aminés indispensables provenant de légumes	59
Figure 16. Schéma simplifié du fonctionnement de l'EA-IRMS.....	60
Figure 17. Schéma simplifié du fonctionnement d'un GC-C-IRMS.....	62
Figure 18. Exemple de chromatogramme des acides aminés analysés par GC-C-IRMS en mode carbone.....	62
Figure 19. Principe de la réaction de dérivation des acides aminés.....	64
Figure 20. Schéma de fonctionnement d'un UHPLC	65
Figure 21. Exemple de chromatogramme présentant tous les acides aminés d'un échantillon analysé par UHPLC.....	65
Figure 22. Comparaison des scores d'acides aminés digestibles du tournesol, chez l'Homme, en fonction de trois facteurs de conversion de l'azote et de l'utilisation du poids moléculaire « en chaîne » ou « libre ».....	182
Figure 23. Cinétique d'enrichissement des acides aminés indispensables	195
Figure 24. Indices d'absorption des acides aminés indispensables dans l'iléon calculés en utilisant la méthode double traceur et comparaison avec les valeurs de digestibilité iléale dans le groupe chocolat et compote.....	197

Liste des tableaux

Table 1. Principaux transporteurs d'acides aminés présents dans l'intestin grêle.....	22
Table 2. Estimations des besoins en acides aminés indispensables selon différentes méthodes et recommandations de la FAO en 2007	25
Table 3. Profils de besoins en acides aminés indispensables selon l'âge	26
Table 4. Besoins en protéines et acides aminés des enfants selon leur âge	26
Table 5. Besoins en acides aminés indispensables des femmes enceintes	27
Table 6. Composition en acides aminés de plusieurs sources de protéines animales et végétales	27
Table 7. Valeurs d'utilisations post prandiales nettes et de valeurs biologiques post prandiales obtenues chez l'Homme avec la méthode isotopique.....	33
Table 8. Comparaison des valeurs de DIAAS et PDCAAS de deux modèles animaux pour plusieurs sources protéiques.....	37
Table 9. Comparaison anatomique et fonctionnelle des systèmes digestifs de l'Homme, du rat et du porc	41
Table 10. Comparaison des profils de besoins en acides aminés de l'homme, du rat et du porc	42
Table 11. Comparaison des digestibilités iléales vraies de l'homme, du rat et du porc pour trois sources protéiques différentes.....	43
Table 12. Comparaison des pertes endogènes iléales d'acides aminés chez l'Homme mesurée avec un régime protéoprive.....	48
Table 13. Comparaison des flux iléaux endogènes avec deux méthodes : protéoprive et EHC	48
Table 14. Digestibilité iléale obtenues chez l'Homme en utilisant l'azote ¹⁵ N comme marqueur des protéines alimentaires	51
Table 15. Récapitulatif des résultats de digestibilité des acides aminés indispensables obtenus avec la méthode double traceur.....	53
Table 16. Comparaison de la digestibilité de l'azote et des acides aminés indispensables du tournesol après 3 h et 6 h de digestion.....	177
Table 17. Indices d'absorption plasmatiques calculés avec les aires sous courbes (AUC) et la moyenne du plateau isotopie (Plateau) et digestibilité iléale des acides aminés indispensables	193
Table 18. Aires sous la courbe des acides aminés indispensables ¹⁵ N et ¹³ C dans l'iléon.....	196
Table 19. Indices d'absorption et digestibilité iléale des acides aminés indispensables.....	196
Table 20. Récapitulatif des résultats de qualité protéique du tournesol obtenus	199

Contexte de réalisation de la thèse

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'UMR 914 Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA) affiliée à AgroParisTech, l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), devenu depuis l'INRAE, et l'Université Paris-Saclay, et dirigée par le Pr Daniel Tomé puis par le Pr Claire Gaudichon depuis 2018. Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe « Apport Protéique et Régulation du Métabolisme » (APReM) dirigée par le Pr Dalila Azzout-Marniche depuis 2018.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet ANR intitulé ProDige pour « Optimized process for sustainable production of highly digestible oilseed proteins for humans » qui vise à explorer le potentiel des protéolégumineux en nutrition humaine. Les partenaires de ce projet sont le groupe Avril, Terres Inovia, le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) de Nancy (CNRS, Université de Lorraine) et l'unité PNCA qui coordonne le projet (Claire Gaudichon).

Ma thèse est cofinancée par le Fond d'Action Stratégique des Oléagineux et protéagineux (FASO), sous l'égide de Sofiprotéol et de l'INRA dans le cadre du projet ProDial qui vise à évaluer la digestibilité et le risque allergénique des protéines de graines de protéolégumineux. Ce projet, d'un périmètre élargi par rapport au projet ProDige, regroupe les mêmes partenaires ; auxquels il faut ajouter le Laboratoire d'Immuno-Allergie Alimentaire (LIAA) de Saclay et l'unité Biopolymères Interactions Assemblages (BIA) de Nantes (INRA).

Valorisation scientifique

Articles scientifiques :

- Publiés

- Romain Tessier, Lara Ribeiro-Parenti, Ouafa Bruneau, Nadezda Khodorova, Jean-Baptiste Cavin, André Bado, Dalila Azzout-Marniche, Juliane Calvez, Maude Le Gall, Claire Gaudichon. **Effect of different bariatric surgeries on dietary protein bioavailability in rats.** *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2019. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00142.2019>
- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Romain Kapel, Alain Quinsac, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Protein or amino acid real digestibility of sunflower protein isolate intrinsically labeled with ^{15}N or ^2H is almost as high as goat whey in rats.** *Journal of Nutrition*. 2019. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>

- Rédigés

- Romain Tessier, Juliane Calvez, Nadezda Khodorova, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Real protein and amino acid digestibility of ^{15}N spirulina in rats.** *Journal à définir*.
- Romain Tessier, Juliane Calvez, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Nadezda Khodorova, Claire Gaudichon. **Challenging the use of ^{13}C spirulina as the reference protein in the dual isotope method to assess the amino acid digestibility of different protein sources in rats.** *Journal à définir*
- Romain Tessier, Juliane Calvez, Gheorghe Airinei, Nadezda Khodorova, Romain Kapel, Alain Quinsac, Olivier Galet, Julien Piedcoq, Robert Benamouzig, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Ileal sampling and dual tracer isotope methods for amino acid digestibility and protein quality of ^{15}N sunflower biscuits in healthy humans.** *Journal à définir*.

Communications orales :

- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Etude de la digestibilité des acides aminés de tournesol à l'aide de protéines marquées par des isotopes stables chez le rat.** *Journées Francophones de Nutrition*. Nice (France). 28-30 novembre 2018.
- Romain Tessier, Juliane Calvez, Nadezda Khodorova, Alain Quinsac, Romain Kapel, Olivier Galet, Daniel Tomé, Gheorghe Airinei, Robert Benamouzig, Claire Gaudichon. **Digestibilité iléale réelle des protéines et acides aminés du tournesol chez l'Homme.** *Journées Francophones de Nutrition*. Rennes (France). 27-29 novembre 2019.

Communications affichées :

- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Biodisponibilité des protéines et des acides aminés de spiruline chez le rat.** *Journées Francophones de Nutrition*. Nantes (France). 13-15 décembre 2017.
- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Digestive bioavailability of spirulina protein and amino acids in a rat model.** *Journée des doctorants de l'école doctorale ABIES*. Paris (France). 19-20 avril 2018.
- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Digestive bioavailability of spirulina protein and amino acids in a rat model.** *Nutrition 2018*. Boston (USA). 09-12 juin 2018.
- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Julien Piedcoq, Romain Kapel, Francis Cacerès, Aurélie Dinar, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Digestive bioavailability of spirulina and sunflower proteins and amino acids in a rat model.** *Food Bioactives & Health*. Lisbonne (Portugal). 26-28 septembre 2018.
- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Variability of amino acid digestibility from ¹³C spirulina used as a tracer reference protein in different protein meals in rats.** *6th International Conference on Food Digestion*. Grenade (Espagne). 02-04 avril 2019.
- Romain Tessier, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez, Julien Piedcoq, Daniel Tomé, Claire Gaudichon. **Variability of amino acid digestibility from ¹³C spirulina used as a tracer reference protein in different protein meals in rats.** *Nutrition 2019*. Baltimore (USA). 08-11 juin 2019.
- Romain Tessier, Juliane Calvez, Nadezda Khodorova, Alain Quinsac, Romain Kapel, Daniel Tomé, Gheorghe Airinei, Robert Benamouzig, Claire Gaudichon. **Real ileal digestibility of sunflower protein and amino acids in humans.** *13th European Nutrition Conference*. Dublin (Irlande). 15-18 octobre 2019.
- Romain Tessier, Juliane Calvez, Nadezda Khodorova, Alain Quinsac, Romain Kapel, Olivier Galet, Daniel Tomé, Gheorghe Airinei, Robert Benamouzig, Claire Gaudichon. **Real ileal digestibility of sunflower protein and amino acids in humans.** *Nutrition 2020*. Live online. 01-04 juin 2020.
- Romain Tessier, Juliane Calvez, Nadezda Khodorova, Daniel Tomé, Alain Quinsac, Francis Cacerès, Sylvie Daguet, Olivier Galet, Romain Kapel, Claire Gaudichon. **Protein and amino acid ileal digestibility in human of sunflower isolates labeled with ¹⁵N.** *Virtual 2020 AOCs Annual Meeting and Expo*. Online. 29 juin – 3 juillet 2020.

Introduction générale

Depuis la révolution industrielle au XIX^{ème} siècle, l'augmentation de la population mondiale est d'allure exponentielle. En moins d'un siècle, le nombre d'habitants sur Terre est passé de 2,5 milliards à 7,7 milliards (**Figure 1**) et les Nations Unies prévoient qu'en 2100 la population mondiale atteigne près de 11 milliards avec un intervalle de confiance de 95% allant de 9,4 à 12,7 milliards (1).

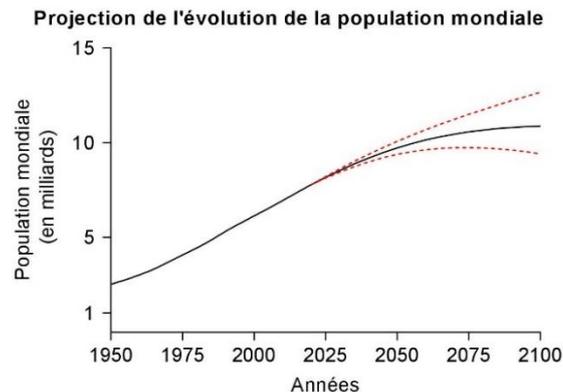


Figure 1. Prévisions d'augmentation de la population mondiale de 2020 à 2100. Les pointillés rouges correspondent à l'intervalle de confiance 95%. D'après (1).

A travers le monde, la consommation de protéines augmente progressivement (**Figure 2**) notamment dans les pays en voie de développement, alors qu'elle tend à stagner en Amérique du Nord et en Europe. Il est prévu que la demande en protéines augmente encore dans les décennies à venir avec le développement notamment de l'Asie et de l'Afrique. Actuellement, dans les pays industrialisés les protéines alimentaires proviennent surtout des produits carnés. Ainsi, en 2013, les protéines animales représentaient, selon l'étude INCA2, 60,5% des apports totaux de protéines en France (2) et 62,7% selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (3). A l'échelle de la planète, ce pourcentage n'était que de 39,6% en 2013 (3).

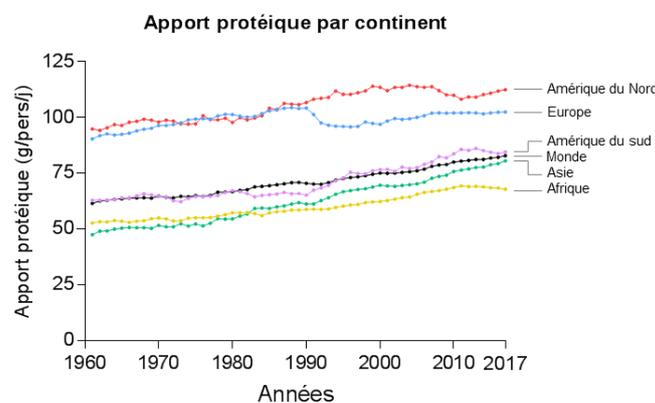


Figure 2. Apport en protéines selon les continents entre 1961 et 2017. Les apports sont exprimés en g de protéine par personne et par jour. D'après (3).

Or, la consommation de produits animaux présente plusieurs inconvénients. D'abord au niveau de la santé, la consommation de viande rouge est associée à une augmentation du risque de cancer colorectal (4,5) et de maladies cardio-vasculaires (6), et la viande transformée a été classée comme cancérigène certain (4). Mais il convient de préciser que tous les produits animaux n'ont pas le même impact sur la santé. Il a aussi été montré que la consommation de poisson était associée à une diminution du risque de cancer colorectal et que la viande de volaille était neutre (4). Il existe aussi une problématique de surfaces disponibles ; en 2011, l'agriculture occupait 38% de la surface terrestre. Sur cette surface, 35% de la masse produite est utilisée pour la nutrition animale contre 62% pour l'alimentation humaine directe (7). De plus, en France la surface agricole utilisée diminue progressivement, principalement en raison de l'urbanisation. Ainsi, entre 1970 et 2010, 9,4% de la surface agricole française a disparu, ce qui représente une perte de 2,8 millions d'hectares (8). Enfin, l'élevage et la production de produits animaux a un fort impact sur le réchauffement climatique ; on estime que 14,5% des émissions de gaz à effet de serre induites par l'Homme proviennent de l'élevage (9). Si certaines cultures sont plus productrices de gaz à effet de serre que certains produits animaux (**Figure 3**), la grande majorité des produits animaux sont plus polluants que les produits végétaux. L'élevage bovin est responsable de la plus grande émission d'équivalent CO₂ par kilogramme de produit (10). Parmi les émissions de l'élevage, 39% proviennent de la fermentation entérique des ruminants sous forme de méthane (9). En France, l'agriculture est la deuxième source de gaz à effet de serre (20%) derrière le transport (29%) et à égalité avec l'industrie (11).

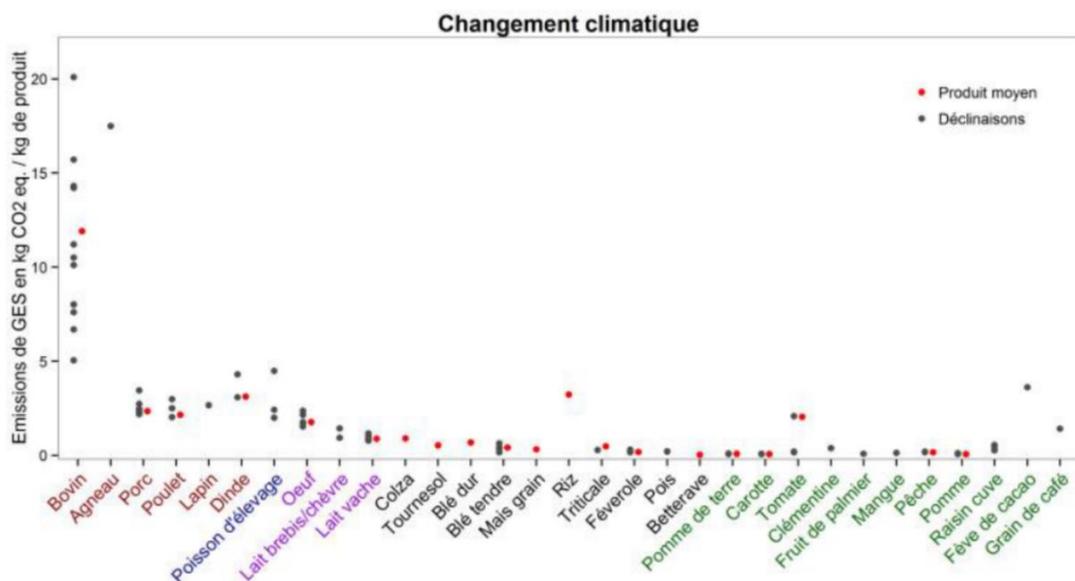


Figure 3. Emissions de gaz à effet de serre de plusieurs produits d'élevage ou de cultures. Les émissions sont exprimées en kg d'équivalent CO₂ par kg de produit. D'après (10).

Dans ce contexte, il est difficilement envisageable que l'augmentation de la demande en protéines soit comblée principalement par une augmentation de la consommation de protéines animales. C'est pourquoi il est nécessaire de développer et de trouver des sources

alternatives de protéines parmi les ressources déjà disponibles et/ou à développer, comme de nouvelles plantes, des insectes, des organismes unicellulaires. Parmi les ressources disponibles mais à développer, nous nous intéresserons aux protéolégumineux. Les oléagineux comprennent les plantes riches en matières grasses dont on extrait l'huile et une partie de ces plantes est aussi riche en protéines. Les plus utilisés dans le monde sont le soja (*Glycine max*), le colza (*Brassica napus*) et le tournesol (*Helianthus annuus*). Le soja est déjà largement utilisé en nutrition animale et humaine dans le monde. Les protéolégumineux sont des plantes intéressantes de par leur contenu en protéines (autour de 20%) (12) et de par leur utilisation qui ne cesse d'augmenter en Europe, que ce soit en terme de surface exploitée (**Figure 4A**) ou de production de graines (**Figure 4B**). Ce travail de thèse s'intéressera spécifiquement au tournesol. Entre 2000 et 2018, la surface dévolue à la culture du tournesol en Europe a été multipliée par 1,7 pour atteindre 18,8 millions d'hectares alors que dans le même temps la production de graines a presque été multipliée par 3 (3). A l'heure actuelle, le tournesol est utilisé essentiellement pour la production d'huile, 500 kT en 2014 en France (13). Le tourteau de tournesol, co-produit de la production d'huile et riche en protéines (environ 30% (14)) est ensuite utilisé en nutrition animale pour nourrir le bétail en raison de sa « richesse » en méthionine.

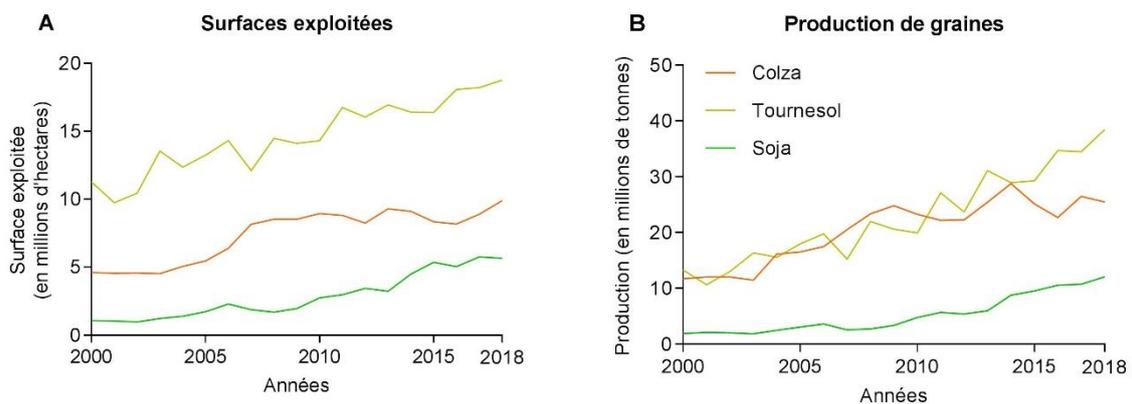


Figure 4. Surface exploitée (A) et production de graines (B) du tournesol, du colza et du soja en Europe entre 2000 et 2018. Les surfaces exploitées sont en millions d'hectare et la production est en millions de tonnes de graines. D'après (3).

Etant donné le contexte d'augmentation de la demande en protéines et les objectifs de réduction de la consommation de protéines animales développés plus haut, la question se pose de l'utilisation de ces produits riches en protéines pour l'alimentation humaine. Pour l'heure les graines de tournesol sont presque uniquement utilisées en nutrition humaine sous forme décortiquée ou torréfiée. Des compléments alimentaires à base de concentré de protéines existent également sur le marché, à destination des sportifs et des végétariens. S'il existe un certain nombre d'études sur la qualité et la digestibilité des protéines de tournesol chez le porc (14–17), il n'existe aucune étude sur la qualité des protéines de tournesol chez l'Homme. Récemment, l'extraction et la purification des protéines de tourteaux de tournesol ont aussi été développées et optimisées (18) afin d'obtenir des isolats protéiques de tournesol de fort degré de pureté. C'est pourquoi un des deux objectifs de ces travaux est de déterminer

la qualité des protéines et acides aminés d'un isolat de tournesol pour l'Homme. Cette détermination se fait par une méthode invasive, et dans ce contexte, le deuxième objectif de ce travail est de mettre en place et de valider une nouvelle méthode d'estimation de la digestibilité. Celle-ci repose sur l'utilisation de traceurs isotopiques et de mesures dans le plasma.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, sera présentée une introduction bibliographique, qui commencera par des rappels de physiologie digestive avant de présenter le besoin en protéines et en acides aminés et les méthodes permettant de les mesurer. La deuxième partie de cette introduction présentera le concept de digestibilité des protéines et des acides aminés, à travers ses modèles d'études, ses facteurs de variations et les méthodes de mesures. Le deuxième chapitre présentera dans un premier temps les méthodes utilisées dans le cadre de mes travaux, avant de présenter les résultats obtenus sous forme de quatre articles scientifiques (publiés ou en préparation de publication dans des journaux scientifiques). Le troisième et dernier chapitre résumera les résultats et les discutera.

Chapitre I

Introduction bibliographique

1. La consommation de protéines : du besoin à la qualité protéique

1.1. Physiologie digestive des protéines

La digestion des aliments commence dès l'ingestion avec la mastication et l'action des enzymes produites par les glandes salivaires (19). Dans cette phase, les protéines sont mises en solution dans la salive. Mais la digestion des protéines commence à proprement parler au niveau de l'estomac *via* l'action des enzymes de l'estomac dont la pepsine (20). L'acide chlorhydrique de l'estomac va à la fois dénaturer les protéines, les précipiter et catalyser l'activation des précurseurs pepsinogènes en pepsine. C'est une endopeptidase qui agit par rupture des liaisons peptidiques non terminales, préférentiellement en C-terminal des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine).

Une fois le pylore passé, la digestion enzymatique continue le long de l'intestin grêle *via* l'action des enzymes pancréatiques et des peptidases de la bordure en brosse épithéliale. Le pancréas, de par sa fonction exocrine, secrète différentes enzymes et précurseurs d'enzymes, comme le trypsinogène ou la chymotrypsinogène qui sont ensuite clivés et activés par les entéropeptidases duodénales, comme l'entérokinase, en trypsine et chymotrypsine, deux endopeptidases (20). La trypsine clive essentiellement les peptides au niveau des lysines ou arginines alors que la chymotrypsine agit surtout au niveau des acides aminés aromatiques. Une autre enzyme importante est la carboxypeptidase A qui clive les liaisons peptidiques C-terminale des acides aminés. La dernière étape de digestion est l'action des peptidases de la membrane de la bordure en brosse. Au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle, les protéines alimentaires sont finalement réduites sous forme de di-, tri-peptides ou d'acides aminés libres.

L'absorption des protéines se fait tout au long de l'intestin grêle mais principalement au niveau proximal. L'absorption des peptides se fait majoritairement par le transporteur secondairement actif PEPT1 (21) alors que l'absorption des acides aminés s'effectue par un grand nombre de transporteurs différents (22) qui ne transportent pas tous les mêmes acides aminés. Ils appartiennent tous à la grande famille des SLC (« solute carrier », pour transporteurs de solutés). Certains sont exprimés au niveau apical des entérocytes, d'autres au niveau de la membrane basolatérale et il existe un large type de systèmes de transports utilisés : des co-transporteurs d'acide aminé (AA) avec un ion (H^+ ou Na^+), des échangeurs d'acides aminés, des uniports ou des symports (**Table 1** et **Figure 5**). Ces systèmes sont à la fois redondants, c'est-à-dire que plusieurs transporteurs vont permettre l'absorption d'un même type d'acide aminé, et à la fois dépendants les uns des autres pour le transport des ions par exemple.

Catégorie	Système	Famille SLC	AA transporté	Type	Situation
AA neutres	B ⁰ AT1	SLC6A19	tous les AA	Co-transport AA/Na ⁺	apical
AA neutres	ASCT2	SLC1A5	AA neutres	Antiport AA/Na ⁺ - co-transport non électrogénique	apical
AA neutres	4F2/LAT2	SLC3A2/ SLC7A8	AA neutres sauf Pro	Echangeur AA/AA	basolatéral
AA neutres et cationiques	rBAT/b ⁰ +AT	SLC3A1/ SLC7A9	AA cationiques et cystéine	Echangeur AA/AA	apical
AA cationiques	4F2/y ⁺ LAT1	SLC3A2/ SLC7A7	AA cationiques	Antiport AA/Na ⁺	basolatéral
AA anioniques	EAAT3	SLC1A1	AA anioniques surtout Glutamate	Co-transport AA/Na ⁺ et K ⁺	apical
Autres	PAT1	SLC36A1	Proline et Glycine	Co-transport AA/H ⁺	apical
Autres	IMINO	SLC6A20	Proline	Co-transport AA/Na ⁺	apical

Table 1. Principaux transporteurs d'acides aminés présents dans l'intestin grêle. D'après (22).

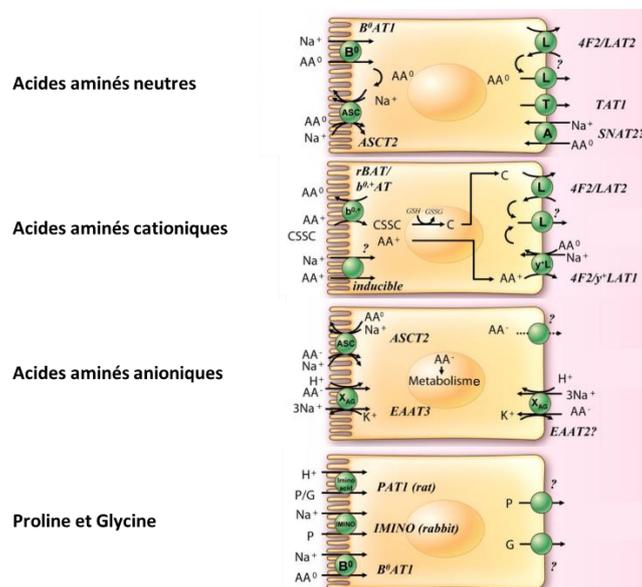


Figure 5. Principaux transporteurs d'acides aminés de l'intestin grêle. D'après (22).

Chez le porc, il a été estimé qu'entre 12% et 18% de l'azote alimentaire entrainé dans le côlon après ingestion de tourteaux de soja ou de colza (23). Chez l'Homme, on estime que cette proportion est plus faible. Les peptides résiduels sont digérés dans le côlon par des enzymes bactériennes ainsi que des enzymes pancréatiques encore actives (24). Une partie sert de substrat azoté à la synthèse protéique du microbiote (25), la synthèse de novo d'acides aminés

par les bactéries du côlon étant faible, d'après la revue Van der Wielen *et al.* (26). Une autre partie des acides aminés résiduels est métabolisée pour former un certain nombre de métabolites bactériens (**Figure 6**). Les acides aminés soufrés participent à la formation de sulfure d'hydrogène (H_2S) alors que les acides aminés aromatiques sont transformés en composés phénoliques ou indoliques. La plupart de ces métabolites peuvent passer la barrière épithéliale du côlon et passer dans la circulation (27).

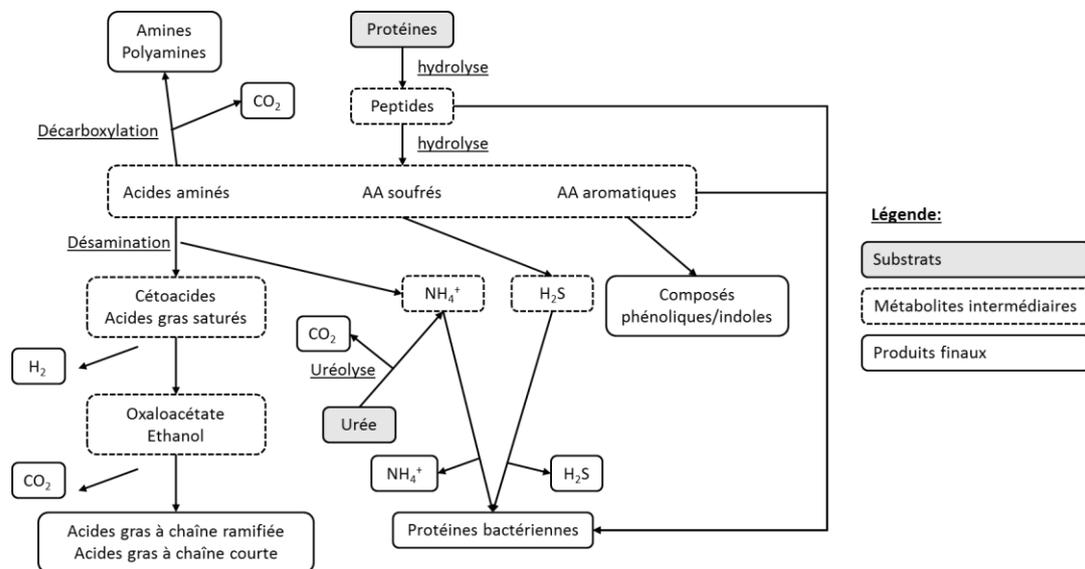


Figure 6. Métabolisme protéique du microbiote intestinal. D'après (27).

Il existerait une absorption des acides aminés bactériens. Mais si Raj *et al.*, ont estimé qu'environ 20% de l'apport en leucine proviendrait du microbiote intestinal (28), ce résultat est à prendre avec prudence, l'étude étant réalisée après une antibiothérapie pouvant affecter le métabolisme. De plus, cette étude ne fait pas la distinction entre bactéries iléales et coliques. Chez l'Homme, la présence de PEPT1 est avérée dans le côlon (29–31). Certaines études, dont les résultats ont été rassemblés dans une revue (26), utilisant des perfusions d'azote marqué dans le côlon ont montré chez le porc et l'Homme qu'il y avait une absorption des acides aminés à travers les colonocytes, mais il reste à prouver que cette absorption se fait dans des proportions suffisantes pour avoir un effet nutritionnel. L'expression de gènes codants pour un certain nombre de transporteurs d'acides aminés a été déterminée sans qu'il n'ait été prouvé qu'ils étaient actifs ou même présents aux membranes apicales ou basolatérales des colonocytes (31).

1.2. Besoins en protéines

1.2.1. Définitions et évaluation du besoin en protéines

La FAO définit le besoin en protéines comme étant : « le plus petit apport de protéines alimentaires qui permet de compenser les pertes corporelles en azote, et ainsi maintenir la masse protéique du corps chez les personnes en équilibre énergétique avec une activité

physique modeste. Chez les enfants et les femmes enceintes ou allaitantes, il est complété par la nécessité de croissance tissulaire ou de sécrétion de lait à des taux compatibles avec une bonne santé. » (32). D'après les données provenant d'une méta-analyse faisant référence et regroupant 19 études et 235 individus (33), chez l'Homme sain, et avec des protéines de bonne qualité, le besoin médian en protéines a été estimé à 0,65 g/kg de masse corporelle/jour (105 mg d'azote/kg/j). Ces résultats ont été obtenus par analyse de plusieurs études utilisant la méthode du bilan azoté et avec différents niveaux d'apports. En tenant compte des variations interindividuelles et en ajoutant deux écarts-types, la recommandation d'apport en protéines est de 0,83 g/kg/jour pour un poids corporel « normal ». Néanmoins, il n'existe pas de recommandation d'apport pour les personnes obèses, mais il a été estimé que leurs besoins en acides aminés étaient supérieurs pour pallier une perte de masse maigre pendant la perte de poids (34).

Si le besoin en protéines a été bien étudié et fait maintenant l'objet d'un consensus, ce n'est pas le cas pour les besoins en acides aminés. Parmi tous les acides aminés existants, 20 sont protéinogènes chez les eucaryotes, c'est-à-dire qu'ils entrent dans la composition des protéines. Parmi ces 20 acides aminés, 9 sont indispensables : l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Ils ne sont pas synthétisables par l'organisme à partir de composants usuellement disponibles et à une vitesse correspondant aux besoins (35), c'est-à-dire qu'ils doivent être apportés par l'alimentation. A l'heure actuelle, il n'existe pas de recommandation d'apport en acides aminés indispensables. En effet, l'estimation des besoins en acides aminés peut se faire avec un certain nombre de méthodes et celles-ci ne donnent pas toujours les mêmes valeurs de besoin en acides aminés, si bien qu'il n'est pas possible de déterminer les variabilités interindividuelles (32) (**Table 2**).

Pendant longtemps, la méthode de référence d'estimation des besoins en acides aminés a été la méthode du bilan azoté. Elle consiste à trouver le point d'équilibre pour chaque acide aminé indispensable entre les pertes azotées et son apport (36). La quantité ingérée de l'acide aminé testé est augmentée progressivement jusqu'à ce que la balance azotée soit nulle. Mais en pratique toutes les pertes azotées ne sont pas mesurables directement (cheveux, sueur...). Ces données de bilan azoté ont été utilisées pour l'estimation des besoins publiés par la FAO en 1985 (37), jusqu'à leur mise à jour en 2007 (32).

D'autres méthodes consistent à utiliser le carbone 13 pour mesurer l'oxydation des acides aminés. Plusieurs approches existent mais elles reposent toutes sur le principe de la mesure de l'oxydation des acides aminés en CO₂. La première méthode, dite d'oxydation directe des acides aminés (DAAO), a pour principe qu'en cas d'excès d'apport d'un acide aminé, le surplus d'acides aminés sera oxydé car il n'existe pas de stockage des acides aminés libres (38). Dans cette méthode, c'est l'acide aminé testé qui est marqué au carbone 13. Au sein d'un repas contenant suffisamment d'acides aminés indispensables sauf celui étudié, une quantité croissante de l'acide aminé testé est apportée, tant que cette quantité est insuffisante pour

couvrir le besoin, l'oxydation de l'acide aminé testé est stable car minimale. Lorsque le besoin est satisfait, l'excédent d'acide aminé va être oxydé, ce qui se traduit par une plus grande production de $^{13}\text{CO}_2$. Le point d'inflexion de la courbe d'oxydation correspond au besoin de cet acide aminé (**Figure 7**). La seconde méthode appelée IAAO, pour « indicator amino acid oxidation » vient du modèle porcin (39,40) et fonctionne selon le principe suivant : quand un acide aminé indispensable est déficient, la synthèse protéique est inhibée et tous les autres acides aminés indispensables sont oxydés (41,42). Dans ce cas-là, contrairement au DAAO, l'acide aminé marqué est un acide aminé dit indicateur, souvent la phénylalanine ^{13}C . De la même façon, l'acide aminé testé est ajouté par doses successives dans un repas équilibré. Tant que ce repas est déficient en acide aminé testé, la synthèse protéique ne sera pas optimale et les autres acides aminés, dont l'acide aminé indicateur, seront oxydés. Le point d'inflexion de la courbe d'oxydation correspond encore au moment où l'apport en acide aminé testé rencontre le besoin (**Figure 7**). Après ce point, il y a suffisamment d'acide aminé testé et l'acide aminé indicateur est moins oxydé.

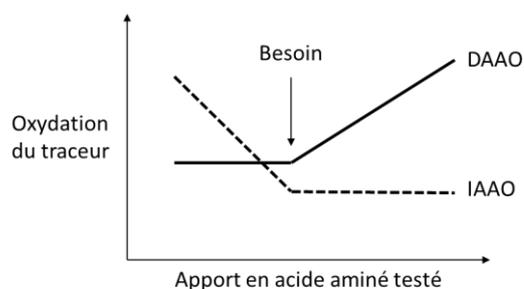


Figure 7. Schéma du principe des méthodes d'oxydation des acides aminés, DAAO et IAAO. DAAO : oxydation directe des AA et IAAO : oxydation de l'AA indicateur. D'après (38,43).

Depuis 2007, les besoins en acides aminés ne sont plus basés sur le bilan azoté et prennent aussi en compte les valeurs obtenues *via* les méthodes isotopiques directes et indirectes (32) (**Table 2**). Cela a eu pour effet d'augmenter les valeurs des besoins pour tous les acides aminés indispensables, jusqu'à 3 fois la valeur proposée en 1985.

Méthode utilisée	Besoins en acides aminés (mg/kg/j)								
	Lys	Leu	Ile	Val	Thr	AAA	Trp	AAS	His
Bilan azoté	12 / 17	14 / 26	10 / 18	10 / 14	7 / 16	14 / 9,1/ 25	3,5 / 3,7	13 / 30	
Oxydation ^{13}C -Leu	29 / 31	37,3 / 39,6 / 40			15			15 / 16	
Oxydation ^{13}C -Lys	entre 20 et 30								
Oxydation ^{13}C -Phe	35 / 37 / 45				19	<39 / >22 / 9,1 / 15	4	13	
Oxydation ^{13}C -Val			>16 / de 17 à 20						
Oxydation ^{13}C -Thr					10 / 20				
Oxydation ^{13}C -Met								entre 6 et 13	
Recommandation	30	39	20	26	15	25	4	15	10

Table 2. Estimations des besoins en acides aminés indispensables selon différentes méthodes et recommandations de la FAO en 2007. Les besoins sont exprimés en mg/kg/j. Les acides aminés aromatiques (AAA) : phénylalanine et tyrosine, et les acides aminés soufrés (AAS) : méthionine et cystéine. D'après (32).

A partir de ces valeurs, une protéine idéale répondant aux besoins a été définie (**Table 3**). Elle varie selon l'âge (section I.1.2.2) et elle est utilisée pour la détermination de score de qualité protéique (44).

Groupe d'âge	His	Ile	Leu	Lys	AAS	AAA	Thr	Trp	Val
Nourrisson (naissance à 6 mois)	21	55	96	69	33	94	44	17	55
Enfant (6 mois à 3 ans)	20	32	66	57	27	52	31	8,5	43
Enfant (après 3 ans), adolescent, adulte	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40

Table 3. Profils de besoins en acides aminés indispensables selon l'âge. Les besoins sont exprimés en mg/g de protéine. D'après (44).

1.2.2. Spécificités du besoin en protéines : importance des conditions physiologiques de l'individu

En dehors des adultes en bonne santé, les besoins en acides aminés peuvent être plus élevés dans certaines situations physiologiques.

Les enfants ayant des besoins d'entretien et de croissance, leurs besoins en protéines et acides aminés sont plus élevés (32). Ainsi, les besoins pour la croissance sont de 0,46 g/kg/jour pour les nourrissons de moins de 6 mois et de 0,20 g/kg/j entre 1 et 2 ans. En ajoutant les besoins d'entretien, le besoin en protéines du nourrisson est de 1,12 g/kg/jour (45). Concernant les acides aminés, les besoins du nourrisson sont calqués sur la composition en acides aminés du lait maternel. Comme pour les protéines, ils diminuent ensuite avec l'âge pour atteindre ceux de l'adulte (**Table 4**).

Age (années)	besoin en protéines (g/kg/j)		besoin en acide aminé (mg/kg/j)								
	Maintenance	Croissance	His	Ile	Leu	Lys	AAS	AAA	Thr	Trp	Val
0,5	0,66	0,46	22	36	73	64	31	59	34	9,5	49
1 - 2	0,66	0,20	15	27	54	45	22	40	23	6,4	36
3 - 10	0,66	0,07	12	23	44	35	18	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	4,5	28

Table 4. Besoins en protéines et acides aminés des enfants selon leur âge. Les besoins en protéines sont exprimés en g/kg/j et les besoins en acides aminés en mg/kg/j. D'après (45).

Chez les femmes enceintes, les besoins en protéines sont fixés à 1,1 g/kg/j soit 1,4 fois le besoin des adultes (36) mais une étude plus récente utilisant la méthode IAAO a estimé que les besoins des femmes enceintes étaient encore plus importants et variaient au cours de la grossesse (46). Ainsi, les besoins seraient de 1,66 g/kg/j pour les femmes enceintes de 16 semaines et de 1,77 g/kg/j pour celles enceintes de 36 semaines. En revanche, il n'existe pas d'estimations calculées des besoins en acides aminés des femmes enceintes. Elango et Ball (46) ont extrapolé les

besoins en acides aminés à partir de l'écart entre le besoin en protéines des femmes enceintes et celui de la population générale (**Table 5**)

	His	Ile	Leu	Lys	AAS	AAA	Thr	Trp	Val
Femme enceinte	18	25	56	51	25	44	26	7	31

Table 5. Besoins en acides aminés indispensables des femmes enceintes. Les besoins sont exprimés en mg/kg/j. D'après (46).

Les femmes allaitantes ont encore des besoins augmentés en protéines. Le besoin supplémentaire en protéines a été estimé à 15,5 g/j pendant les 6 premiers mois puis à 10,0 g/j ensuite (47).

Concernant les personnes âgées, il n'existe pas de consensus sur leur besoin en protéines. On sait que cette population est sujette à une baisse de masse maigre, en lien avec une moindre capacité anabolique (48) mais les avis sur le besoin protéique des personnes âgées divergent. Courtney-Martin *et al.*, ont montré en 2016 avec la méthode IAAO, que les personnes de plus de 65 ans n'avaient pas un besoin en protéines supérieur à ceux des adultes jeunes quel que soit leur sexe (49). Mais une autre étude a montré, au contraire, qu'afin de contrebalancer les pertes de masse musculaire, les personnes âgées devaient, en parallèle d'un maintien d'un effort physique, augmenter leur apport en protéines (entre 1,0 et 1,3 g/kg/j) (50). Aussi, afin de lutter contre la sarcopénie, la recommandation française d'apport en protéines pour les personnes âgées est de 1,0 g/kg/j (51). Concernant les besoins en acides aminés indispensables, il existe encore peu d'études avec parfois des avis contradictoires, et les besoins sont donc pour le moment basés sur ceux de l'adulte (32,45). Il convient d'ajouter, que la présence de pathologies chez les personnes âgées peut amener à des besoins spécifiques en protéines et acides aminés.

1.3. Qualité des protéines : composition et méthodes d'évaluation

1.3.1. *Qualité des protéines sur la base de la composition en acides aminés*

Table 6. Composition en acides aminés de plusieurs sources de protéines animales et végétales. Les compositions sont exprimées en mg/g de protéines. %AAI : proportion d'acides aminés indispensables (AAI), %prot : pourcentage de protéine, AAD : acides aminés dispensables. Les valeurs d'acides aminés indispensables en gras et soulignées sont inférieures aux besoins du profil FAO 2013. Table séparée en deux parties. Adapté de (12,44,52–67).

Partie I		Protéines animales							Céréales						Fruits à coques		
		Profil FAO 2013 (44)	Lait (12)	Œuf (12)	Poulet (12)	Poisson (12)	Viande de bœuf (60)	Mollusques (12)	Blé (52)	Maïs (55)	Riz (59)	Orge (52)	Millet (52)	Avoine (52)	Noix(12)	Arachide (12)	Pistache (12)
AAI	Val	40	65,4	68,3	49,6	51,5	47,4	50,7	48,5	41,6	49,3	44,5	41,3	44,0	49,4	41,9	62,0
	Ile	30	51,8	53,4	52,7	46,1	41,1	47,2	35,0	36,3	36,9	29,1	33,3	38,2	41,0	35,2	45,5
	Leu	61	94,9	86,5	75,0	81,3	66,7	81,8	66,6	113,6	78,7	59,7	104,2	63,8	76,8	64,8	79,6
	Lys	48	83,8	72,6	84,5	91,8	72,0	76,6	26,7	37,9	20,8	31,7	15,7	35,2	27,8	35,9	56,5
	AAS	23	32,4	51,9	40,5	40,3	36,5	40,8	27,7	34,7	30,3	17,8	19,8	23,2	29,2	25,1	32,3
	AAA	41	102,2	93,9	73,5	72,8	63,6	78,9	64,2	81,1	112,3	60,0	61,6	62,4	73,3	94,0	79,4
	Thr	25	42,5	44,3	42,2	43,8	37,0	47,7	30,6	39,6	30,6	29,6	25,8	25,1	39,1	34,2	33,9
	Trp	6,6	12,7	13,3	11,7	11,2	10,0	14,0	/	15,8	11,5	/	/	/	11,2	9,7	12,5
	His	16	30,2	24,6	31,0	29,4	31,7	20,5	21,9	38,1	28,9	17,9	17,6	17,3	25,7	25,3	25,4
AAD	Asp	/	85,7	105,8	88,8	102,4	74,5	109,6	49,6	70,7	89,8	52,3	55,2	78,7	120,1	121,9	93,5
	Ser	/	60,3	77,3	34,6	40,8	35,4	47,0	46,2	44,6	51,5	33,3	48,0	35,5	61,3	49,3	63,6
	Glu	/	224,8	133,2	151,5	149,3	125,0	153,2	266,6	158,0	198,3	206,7	181,0	149,6	184,9	208,9	213,3
	Pro	/	98,7	40,8	41,8	35,4	32,9	34,1	109,0	99,4	44,0	92,6	59,7	32,6	46,4	44,1	46,5
	Gly	/	19,7	34,4	49,0	48,0	33,7	43,6	42,9	41,7	46,7	32,6	20,5	40,8	53,6	60,2	50,0
	Ala	/	34,0	58,5	54,4	60,5	45,4	60,3	36,6	79,2	53,7	37,1	37,6	87,7	45,7	39,7	48,3
	Arg	/	28,6	65,3	60,2	59,8	52,4	82,5	43,2	57,8	87,7	39,2	27,8	50,7	149,6	119,6	105,9
%AAI	/	48,3	49,7	49,0	48,6	50,4	46,3	35,1	44,3	41,1	37,0	42,6	39,4	36,1	36,3	40,7	
%prot	/	26,5	52,7	30,6	23,7	73,4	14,7	13,2 (64)	8,0	7,7	11,1 (58)	15,0 (67)	15,4 (67)	15,9	27,6	21,1	

Partie II		Légumineuses						Oléagineux			Pseudo-céréales			Autres		
		Profil FAO 2013 ¹	Haricots blancs (12)	Fèves (12)	Pois (53)	Lentilles (12)	Pois chiches (12)	Soja (12)	Colza (54)	Tournesol (52)	Amarante (59)	Quinoa (59)	Sarrasin (59)	Spiruline (12)	Insectes (62)	Lentilles d'eau (61)
AAI	Val	40	52,3	44,4	38,9	49,7	42,3	46,6	43,0	48,5	32,8	37,2	44,3	61,1	31,7	46,3
	Ile	30	44,1	40,3	33,3	43,3	43,1	48,3	34,0	42,6	29,6	30,5	32,9	55,8	25,8	35,8
	Leu	61	79,8	75,2	65,8	72,6	71,6	77,1	72,0	63,0	49,9	58,7	64,6	86,1	59,2	73,8
	Lys	48	68,6	64,0	68,4	69,9	67,3	60,5	57,0	31,8	39,3	41,6	45,5	52,6	43,5	48,3
	AAS	23	38,7	20,9	25,8	21,6	26,8	24,7	39,0	42,7	35,4	26,7	47,6	31,5	11,0	26,5
	AAA	41	82,2	73,9	73,5	76,1	78,9	88,8	70,0	71,8	92,9	101,8	120,7	93,3	52,4	76,8
	Thr	25	42,1	35,5	35,9	35,8	37,4	35,7	48,0	34,9	31,2	33,1	39,8	51,7	31,5	42,0
	Trp	6,6	11,9	9,5	9,4	9,0	9,8	12,7	/	/	13,4	11,8	14,7	16,2	/	/
	His	16	27,8	25,4	25,2	28,2	27,7	26,2	28,0	22,1	30,8	36,3	40,6	18,9	18,6	16,2
AAD	Asp	/	120,9	111,6	106,8	110,8	118,3	115,9	69,0	91,7	70,5	79,1	99,9	100,8	/	87,3
	Ser	/	54,4	45,8	47,9	46,2	50,6	52,2	43,0	43,7	56,6	46,0	58,9	57,1	37,3	42,3
	Glu	/	152,4	169,9	169,2	155,2	176,0	198,3	178,0	202,4	157,8	163,4	193,5	145,9	93,7	101,0
	Pro	/	42,4	42,1	37,6	41,8	41,5	56,4	56,0	46,4	36,7	35,6	41,3	45,3	50,1	38,0
	Gly	/	39,0	41,9	43,2	40,7	41,9	40,9	51,0	54,1	69,5	54,8	63,5	53,9	40,9	46,2
	Ala	/	41,9	41,0	42,7	41,8	43,1	40,8	47,0	43,0	31,4	39,1	41,3	78,6	75,2	59,3
	Arg	/	61,9	92,3	68,4	77,4	94,7	75,8	59,0	93,3	88,7	88,8	113,2	72,2	45,3	48,3
%AAI	/	46,6	41,7	42,2	44,2	41,7	42,0	43,7	38,4	41,0	42,7	42,4	46,2	44,4	46,4	
%prot	/	26,3	29,3	25,5 (56)	26,8	22,2	35,1 (65)	18,8 (63)	25,7 (57)	15,0	15,9	15,1	60,3	61,9	26,3	

Les premiers déterminants de la qualité des sources protéiques sont la quantité de protéines qu'elles contiennent et leur composition en acides aminés.

La teneur en protéines est mesurée à partir de teneur en azote dans le produit, le plus souvent en utilisant la méthode de Kjeldhal. Ce taux d'azote est ensuite converti en pourcentage de protéines *via* un facteur de conversion (68). Si le facteur utilisé par défaut est 6,25, tous les acides aminés n'ont pas le même nombre d'atomes d'azote et la composition en acides aminés est importante pour la conversion de l'azote en protéine. Il existe aussi de l'azote non protéique, qui rentre en compte dans ce calcul de teneur en protéines. De plus, certaines protéines ont des groupes prosthétiques dont la prise en compte dans les calculs est discutée (69). Les facteurs de conversion peuvent aussi être calculés en se basant uniquement sur l'aminogramme (51). En conséquence, le facteur de conversion azote/protéine (N x) varie selon les sources protéiques. Le facteur moyen pour le lait et les produits laitiers est par exemple de 5,85 et il est de 5,4 pour les céréales ou les légumineuses (51).

Dans les produits carnés, le pourcentage de protéine n'est pas le même dans tous les morceaux de l'animal. Chez le bœuf par exemple, pour des morceaux crus, le filet contient 40,0% (en matière sèche) de protéines et le paleron 65,1% (70). De la même façon, rapporté au poids sec, le jaune d'œuf contient 34,5% de protéines contre 88,1% dans le blanc (71). Le pourcentage de protéines dans les sources végétales est directement lié aux conditions de culture. Pour une même souche, il peut varier selon le lieu de culture (72,73) ou selon les conditions climatiques. Ainsi il a été montré que le contenu en protéines de soja variait selon les années en fonction de la température et des précipitations (73), allant de 30,1% à 43,4% de matière sèche pour une même variété et un même lieu. De plus, les espèces ou souches n'ont pas toutes les mêmes teneurs en protéines, ainsi le pourcentage de protéines dans des pois peut varier de 24 à 29% de poids sec selon la variété plantée (72). La cuisson ou les processus de stérilisation ont aussi un impact sur la quantité de protéines et acides aminés dans le produit. Ainsi la quantité de protéines (rapportée au poids sec) dans des haricots blancs est de 6,75% après cuisson alors qu'elle était de 19,1% dans les haricots blancs secs (74).

Les produits d'origine animale ont des teneurs en protéines variables, entre 25% de poids secs pour le lait et plus de 60% pour la viande de bœuf, mais ils se caractérisent par une composition en acides aminés indispensables équilibrée et supérieure aux besoins (12,60). C'est le cas pour les produits laitiers, l'œuf, les viandes dites « blanches » et « rouges », ainsi que pour le poisson et les mollusques (**Table 6**). Les protéines végétales consommées par l'Homme appartiennent à plusieurs grandes familles dont les deux principales sont les céréales et les légumineuses. Les céréales (blé, maïs, riz) sont caractérisées par un taux de protéines relativement faible dans leurs graines, entre 8 et 12% de la matière sèche en moyenne (75), ainsi que par une déficience marquée en lysine (**Table 6**) (52). Elles sont en revanche riches en acides aminés soufrés. Les pseudo-céréales (quinoa, amarante, sarrasin) sont plus riches en lysine que les céréales, le sarrasin étant même au-dessus du besoin (59). Les fruits à coques et l'arachide présentent aussi une déficience en lysine (12). Les légumineuses comprennent les fèves, pois, haricots et

lentilles. Leurs graines sont relativement riches en protéines (entre 20 et 25% du poids sec) (75). Il a longtemps été considéré que les légumineuses étaient déficientes en acides aminés soufrés mais avec les dernières estimations des besoins en acides aminés, il s'avère que cette déficience est marginale sauf dans quelques espèces, comme les fèves ou les lentilles (12,76). Les légumineuses sont déficientes en méthionine, mais cela est compensé par la prise en compte de la cystéine dans le total des acides aminés soufrés (77). Elles sont en revanche riches en lysine. Le soja appartient à la fois aux légumineuses et aux protéolégumineux, il fait partie des plantes les plus utilisées, à la fois en nutrition humaine et animale. Son utilisation en nutrition est très ancienne en Asie mais relativement récente en Europe. Il a l'avantage de ne pas présenter de déficience en acides aminés indispensables. Dans la plupart des cultures, les populations végétariennes ou consommant peu de viande, combinent traditionnellement les céréales et les légumineuses ce qui permet de compléter réciproquement les sources en acides aminés indispensables. En règle générale, en plus de leur composition en acides aminés, parfois déséquilibrée, les sources protéiques végétales présentent des facteurs antinutritionnels (78) et des molécules non digestibles comme les fibres. Pour pallier ces problèmes, il est nécessaire parfois d'isoler les protéines ou de les traiter *via* des procédés technologiques tels que des procédés thermiques.

La spiruline est une cyanobactérie essentiellement utilisée en tant que complément alimentaire pour sa teneur importante en protéines (50-60% de la matière sèche) et en micronutriments. Mais sa composition est très variable en fonction des conditions de croissance (79). Si les quantités d'acides aminés indispensables données par l'USDA (12) sont supérieures aux besoins en acides aminés, une revue publiée en 2017 (80), comparant la composition en acides aminés de *Spirulina platensis* de trois études, montrait que la spiruline pouvait être déficiente en lysine, histidine et acides aminés soufrés (dans deux études sur trois). Ces différences peuvent aussi s'expliquer par les différences de milieu et de conditions de culture (81).

La consommation d'insectes est récente dans les pays européens mais existe depuis longtemps sur d'autres continents (82). Il existe une grande variété d'insectes consommés par l'Homme. Les ordres les plus consommés sont les lépidoptères (papillons et mites), les coléoptères (scarabées) et les orthoptères (criquets, sauterelles) (83). Les insectes font partie des aliments riches en protéines puisqu'ils sont composés, rapportés à la matière sèche, en moyenne de 61,9% de protéines, mais il existe une variabilité en fonction des ordres et au sein des espèces d'un même ordre (62). Les coléoptères et les lépidoptères contiennent environ 40% de protéines, quand les orthoptères ont une teneur protéique de 60%. Une autre étude montre que le contenu protéique au sein des lépidoptères varie de 15 à 60% selon les espèces considérées, alors que la variabilité des orthoptères est plus faible (entre 61 et 77%) (84). Les compositions en acides aminés sont variables selon les ordres. Ainsi, les orthoptères, les coléoptères et les lépidoptères ne sont pas déficients en acides aminés indispensables, alors que les blattoptères, les hémiptères ou les isoptères présentent au moins une déficience (62,85). Les compositions en acides aminés données dans la **Table 6** représentent une

moyenne de composition de produits disponibles à la consommation sous forme de poudres ou de farines (62). Dans ce cas-là, les produits étudiés présentent plusieurs déficiences en acides aminés probablement à cause des traitements subis lors de leur production.

Parmi les nouvelles sources de protéines étudiées, il existe une famille de plantes aquatiques, les lentilles d'eau (*Lemnaceae*) présentes dans le monde entier et utilisées en nutrition en Europe et en nutrition humaine en Asie du Sud-Est. Ces plantes sont composées, une fois séchées, d'environ 30% de protéines (61,86). La composition moyenne de ces plantes contient suffisamment de tous les acides aminés indispensables (**Table 6**) ce qui en fait un aliment protéique intéressant pour l'alimentation humaine.

1.3.2. Qualité des protéines à travers différents indices

Mesurer la qualité d'une protéine par sa composition en acides aminés indispensables n'est pas suffisant car une partie de ces acides aminés sont perdus lors de la digestion et les procédés d'extraction ou de préparation peuvent à la fois modifier sa composition et sa digestibilité (87).

1.3.2.1. Coefficient d'efficacité protéique

Le coefficient d'efficacité protéique (CEP, PER en anglais) est un indice de qualité protéique utilisé depuis 1919 (88). Il mesure l'efficacité d'une protéine testée en termes de croissance du rat *via* son gain de poids. Il est essentiellement utilisé chez le rat et possède un protocole standardisé (89). Les animaux en croissance consomment *ad libitum* des régimes contenant la protéine testée, en condition limitante (10%), pendant 28 jours. La consommation de protéines et le gain de poids sont mesurés quotidiennement (90). Le CEP est calculé à la fin de ces deux semaines selon la formule suivante :

$$\text{CEP} = \frac{\text{gain de poids du rat}}{\text{quantité de protéine ingérée}}$$

Un groupe contrôle avec une protéine de référence, la caséine (CEP = 2,5), permet de normaliser éventuellement le CEP obtenu pour les protéines à tester. Plus le score est élevé, plus la protéine étudiée est capable de soutenir la croissance de l'animal. Les rats en croissance ont des besoins en acides aminés soufrés supérieurs à ceux de l'Homme pour assurer notamment la pousse du pelage (91). Cela a pour conséquence de surestimer le besoin humain et donc de diminuer la qualité de certaines protéines, végétales notamment mais aussi la caséine. Le CEP peut être affiné par l'utilisation de la perte de poids d'un groupe nourri avec un repas protéoprive. C'est la rétention protéique nette (RPN, NPR en anglais) (92) :

$$\text{RPN} = \frac{\text{gain de poids du rat} + \text{perte de poids moyenne de rats protéoprive}}{\text{quantité de protéine ingérée}}$$

1.3.2.2. Utilisation nette des protéines

L'utilisation nette des protéines (UNP, NPU en anglais) représente la proportion de protéine ingérée qui est retenue dans le corps selon la formule suivante (87) :

$$UNP = \frac{(0,16 \times \text{protéine ingérée sur 24h}) - (N \text{ urée urinaire sur 24h} + 2) - (0,1 \times \text{poids corporel idéal})}{(0,16 \times \text{protéine ingérée sur 24h})}$$

Le facteur 0,16 est le facteur de conversion des protéines en azote (l'inverse de 6,25, facteur de conversion de l'azote en protéines). Le poids corporel (en kg) est le poids optimal pour un sexe et un âge donné (93). La quantité d'azote dans le pool d'urée urinaire et la quantité de protéine ingérée sont mesurées sur 24 h.

Plus récemment a été développée l'utilisation postprandiale nette (UPPN, NPPU « net post-prandial utilization » en anglais) en utilisant le marquage de l'azote des protéines testées avec un isotope stable, le ^{15}N . Cet indice correspond à l'azote ingéré moins les pertes digestives et métaboliques (42) sur une période suivant le repas de 8 h. Les pertes métaboliques sont le plus souvent représentées par l'azote transféré dans les pools uréiques, c'est-à-dire dans l'urée urinaire et plasmatique. Pour l'urée urinaire cela représente la somme de l'azote transféré pendant les 8 heures alors que pour le pool plasmatique cela correspond à l'urée résiduelle après ces 8 heures. L'UPPN représente l'azote qui va être disponible pour la synthèse protéique, l'azote utilisé dans les voies non protéiques, l'azote des acides aminés libres et celui transféré après transaminations (54).

$$UPPN = \frac{{}^{15}\text{N}_{\text{ingéré}} - ({}^{15}\text{N}_{\text{iléal}} + {}^{15}\text{N}_{\text{urée urinaire}} + {}^{15}\text{N}_{\text{urée plasmatique}})}{{}^{15}\text{N}_{\text{ingéré}}} \times 100$$

Avec UPPN en % de l'azote ingéré, ${}^{15}\text{N}_{\text{ingéré}}$ l'azote alimentaire ingéré, ${}^{15}\text{N}_{\text{iléal}}$ l'azote alimentaire cumulé récupéré dans l'iléon, ${}^{15}\text{N}_{\text{urée urinaire}}$ l'azote alimentaire cumulé retrouvé sous forme d'urée dans les urines, ${}^{15}\text{N}_{\text{urée plasmatique}}$ l'azote alimentaire retrouvé sous forme d'urée dans le plasma à la fin de l'étude.

Protéine étudiée	UPPN (%)	VBP (%)
Isolat de colza (54)	70,5	84,0
Viande crue (94)	71,9	/
Viande cuite (94)	70,2	/
Lait (95)	79,7	/
Globuline de pois (96)	72,0	76,5
Albumine de pois (96)	70,9	78,7
Blé (97)	66,1	72,9
Isolat de soja (98)	78,0	85,7
Lupin (99)	74,0	81,5

Table 7. Valeurs d'utilisations post prandiales nettes et de valeurs biologiques post prandiales obtenues chez l'Homme avec la méthode isotopique. D'après (54,94–99).

Comme pour les autres indices de qualité, l'UPPN est élevé pour l'isolat de soja ou le lait alors qu'il est faible pour le blé (**Table 7**).

1.3.2.3. Valeur biologique

La valeur biologique est un indice qui représente l'efficacité de l'utilisation de l'azote alimentaire par le corps (100). Il correspond au ratio entre l'azote absorbé et l'azote retenu. L'azote absorbé correspond à la différence entre l'ingéré et l'azote excrété dans les fèces. Autrement dit, il correspond à l'azote absorbé qui est retenu dans le corps pour la maintenance et la croissance (88). La valeur biologique (VB) est calculée selon la formule suivante (87) :

$$VB = \frac{(N_i - N_{e(f)}) - N_{e(u)}}{N_i - N_{e(f)}} \times 100$$

Avec VB (en %), N_i l'azote ingéré *via* la protéine testée et N_e l'azote excrété dans l'urine (u) ou les fèces (f). Il est aussi possible, comme pour le NPU de tenir compte des pertes endogènes, pour cela les pertes en azote, fécales et urinaires, d'un groupe protéoprive sont retranchées à celles du groupe test. Mais cet indice de qualité se heurte à plusieurs limites, il a été prouvé que pour un même aliment, la valeur biologique dépend de la quantité ingérée et que pour deux aliments différents, les différences étaient elles aussi dépendantes, de façon non linéaire, de la quantité de protéine ingérée (101).

De la même façon que pour l'utilisation protéique nette, cet indice a été adapté à l'utilisation de protéines marquées avec de l'azote 15 :

$$VBP = \frac{{}^{15}N_{\text{ingéré}} - ({}^{15}N_{\text{iléal}} + {}^{15}N_{\text{urée urinaire}} + {}^{15}N_{\text{urée plasmatique}})}{{}^{15}N_{\text{ingéré}} - {}^{15}N_{\text{iléal}}} \times 100$$

La valeur biologique postprandiale (VBP) (**Table 7**), représente la quantité d'azote alimentaire qui n'est pas désaminée pendant la période postprandiale (97) souvent sur une durée de 8 h après l'ingestion du repas. Cela correspond aussi à la division de l'utilisation postprandiale nette par la digestibilité iléale réelle.

1.3.2.4. Digestibilité

La digestibilité est une des composantes de la biodisponibilité des protéines et acides aminés. Elle correspond à la quantité d'acide aminé ingéré qui est absorbé par l'intestin. L'absorption peut s'estimer directement par mesure de l'apparition des acides aminés dans la veine porte. Cela a déjà été fait chez le porc mais cela est très invasif (102). Elle peut aussi indirectement s'estimer par mesure des pertes iléales digestives. Cette mesure s'exprime sous forme de différents indices, selon que l'on prend en compte ou non les pertes endogènes, notamment utilisés chez les modèles animaux comme le porc (103).

Le premier indice est la digestibilité iléale apparente (DIA, AID en anglais) dont la formule est la suivante :

$$\text{DIA} = \frac{\text{AA ingéré} - \text{pertes iléales AA}}{\text{AA ingéré}} \times 100$$

Dans cette formule, les pertes iléales en acides aminés correspondent aux pertes azotées totales, c'est-à-dire endogènes et alimentaires. La digestibilité apparente rend donc compte de l'ensemble des pertes azotées intestinales. Il a été montré que sa valeur dépendait directement de la quantité de protéine ingérée dans le repas donné (104). Ainsi la digestibilité apparente de protéines de soja était de 56,7% pour un repas contenant 5% de protéines et de 83,4% pour un repas en contenant 24%. La relation entre les deux était sous la forme d'une équation du second degré avec un plateau à partir de 15-16% de protéine.

Les deux indices de digestibilité suivants tiennent compte des pertes endogènes. Il convient de différencier les pertes basales, qui sont indépendantes du repas donné et les pertes spécifiques qui sont induites par le repas (105). Les pertes spécifiques du repas peuvent varier selon plusieurs paramètres, comme la présence de facteurs antinutritionnels (103). Les pertes spécifiques sont difficilement mesurables directement mais sont le plus souvent estimées par soustraction des pertes basales aux pertes totales. Par exemple, l'ajout dans le repas de composés riches en tanins a pour effet de diminuer la digestibilité en augmentant la sécrétion de protéines endogènes chez le porc (106). La quantité de nutriments et de fibres dans le repas a un effet sur la quantité de protéines endogènes (107). Ainsi, le flux iléal protéique augmentait proportionnellement à la quantité de fibres présentes dans le repas chez le porc (108).

La digestibilité iléale standardisée (DIS, SID en anglais) tient compte des pertes endogènes basales. C'est l'indice le plus utilisé dans les études de formulation avec le modèle porc (109).

$$\text{DIS} = \frac{\text{AA ingéré} - (\text{pertes iléales AA} - \text{pertes endogènes AA basales})}{\text{AA ingéré}} \times 100$$

La digestibilité iléale vraie (DIV, TID en anglais), prend en compte les pertes endogènes totales (109), c'est-à-dire à la fois les pertes basales et celles spécifiques du repas. On l'appelle aussi parfois digestibilité réelle quand la mesure de digestibilité se fait à l'aide de traceurs (section 2.2.2.3). Cela a pour conséquence de donner une digestibilité plus élevée que la digestibilité standardisée.

$$\text{DIV} = \frac{\text{AA ingéré} - (\text{pertes iléales AA} - \text{pertes endogènes AA totales})}{\text{AA ingéré}} \times 100$$

1.3.2.5. PDCAAS

Le score chimique corrigé de la digestibilité (PDCAAS pour « protein digestibility corrected amino acid score en anglais ») est un score de qualité protéique recommandé par la FAO depuis 1991 (88). Il consiste à pondérer le score chimique de la protéine par la digestibilité fécale vraie de la protéine. Le PDCAAS est celui de l'acide aminé indispensable le plus limitant présent dans la protéine alimentaire. La protéine de référence est une protéine fictive basée sur les besoins en acides aminés indispensables. Les besoins choisis étant ceux des enfants préscolaires proposés alors en 1985 (37).

$$\text{PDCAAS} = \frac{\text{mg de l'AA limitant dans 1g de protéine alimentaire}}{\text{mg de ce même AA dans 1g de protéine de référence}} \times \text{digestibilité fécale vraie de la protéine} \times 100$$

Le PDCAAS a été créé pour la mesure de protéines simples ou complexes, c'est-à-dire contenant une seule protéine ou plusieurs (110). Pour les acides aminés excédentaires au besoin, le score est limité à 100%. Les besoins en acides aminés indispensables ayant évolué entre 1985 et aujourd'hui, le PDCAAS peut changer pour une même protéine selon le « scoring pattern » utilisé. Ainsi, le PDCAAS du concentrat de protéine de pois est passé de 75 pour le tryptophane avec les besoins de 1991 à 71 pour les acides aminés soufrés en utilisant les besoins de 2013 (64). Le principal biais du PDCAAS est l'utilisation de la digestibilité fécale dans son calcul (110) (section 2.2.1).

1.3.2.6. DIAAS

Le PDCAAS a été récemment supplanté par le DIAAS (« digestible indispensable amino acid score ») dont l'utilisation a été recommandée par la FAO depuis 2013 (44). Il propose d'utiliser une valeur plus fine de la digestibilité, à savoir la digestibilité des acides aminés individuels et non pas de la protéine. Il a en effet été prouvé que la digestibilité pouvait varier d'un acide aminé à l'autre (111,112). A la différence de la digestibilité protéique, la digestibilité des acides aminés doit être évaluée au niveau iléal, ce qui comporte des contraintes méthodologiques (section 2.2.1). Contrairement au PDCAAS, le DIAAS n'est pas tronqué à 100% si l'acide aminé le plus limitant reste en quantité supérieure au besoin. Les profils de besoins utilisables pour la mesure des qualités des protéines alimentaires sont au nombre de trois : celui pour les nourrissons de moins de 6 mois, celui des enfants entre 6 mois et 3 ans et celui à partir de 3 ans regroupant enfants, adolescents et adultes (44). Pour les questions réglementaires, il est conseillé d'utiliser deux profils : la composition en acides aminés du lait humain pour les nourrissons et le profil des enfants entre 6 mois et 3 ans pour les autres aliments et les autres populations. Ainsi, il peut y avoir plusieurs interprétations du profil de référence à prendre.

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

Le DIAAS permet d'estimer la qualité de protéines seules ou de mélanges de protéines. Si cet indice a été pensé pour mesurer la qualité de protéines chez l'Homme, le DIAAS a aussi été calculé à partir de données obtenues chez le rat (112) ou le porc (64). Ces deux études ont comparé pour plusieurs sources de protéines le PDCAAS et le DIAAS (**Table 8**). Pour cela les auteurs ont utilisé le profil des enfants de 6 mois à 3 ans et le PDCAAS non tronqué.

En moyenne, le PDCAAS donnait un score supérieur de 3% au DIAAS pour les deux espèces. Le PDCAAS surestimait la qualité protéique comparé au DIAAS, sauf pour l'isolat de lactosérum chez le porc et le riz cuit chez le rat. Dans tous les cas présentés dans ces articles, l'acide aminé le plus limitant était le même pour les deux indices. Il n'y a qu'un seul cas où l'acide aminé devenait limitant en changeant de score, l'isolat de lactosérum était insuffisant en histidine si l'on se fie au PDCAAS, mais ne l'était pas si l'on se fie au DIAAS.

Il faut rappeler que tout comme pour le PDCAAS, le DIAAS repose en premier lieu sur le score chimique, c'est-à-dire sur la composition en acides aminés de la protéine et sur le profil des besoins en acides aminés. Ainsi, comme cela a été évoqué précédemment (section 1.2), d'une part, le calcul des besoins en acides aminés et d'autre part, la détermination de la composition en acides aminés de la protéine étudiée sont primordiaux et peuvent amener à fausser le calcul du DIAAS (113).

	Rat (112)			Porc (64)		
	AA limitant	PDCAAS	DIAAS	AA limitant	PDCAAS	DIAAS
Concentrat de protéine de lait	AAS	125	118	AAS	121	120
Isolat de lactosérum	His	112	109	His	97	100
Concentrat de lactosérum	His	99	97,3	His	107	107
Isolat de soja	AAS	97,4	90,6	AAS	86	84
Concentrat de pois	AAS	86	82,2	AAS	71	62
Pois cuits	AAS	57,5	57,9	/	/	/
Riz cuit	Lys	56,2	59,5	/	/	/
Son de blé	Lys	47,9	41,1	/	/	/
Concentrat de colza	Lys	38,2	37,1	/	/	/
Poudre de lait écrémé	/	/	/	AAS	112	105
Blé	/	/	/	Lys	51	45
Farine de soja	/	/	/	AAS	93	89

Table 8. Comparaison des valeurs de DIAAS et PDCAAS de deux modèles animaux pour plusieurs sources protéiques. D'après (64,112).

2. La digestibilité des protéines et acides aminés

2.1. Facteurs de variation de la digestibilité

2.1.1. Les modèles d'études

Le premier facteur de variabilité de la digestibilité est le modèle d'étude choisi. Il existe une large gamme de modèles possibles pour étudier ce paramètre. Les deux grandes catégories sont les modèles *in vitro* et *in vivo*, mais au sein même de ces catégories il existe un grand nombre de modèles.

Pour la digestion *in vitro*, on peut distinguer deux grandes familles, les modèles statiques et dynamiques. Les modèles statiques sont composés de trois phases représentant trois étapes de la digestion *in vivo* : la phase orale, la phase gastrique et la phase intestinale (114). Le repas est mis en contact d'enzymes digestives à un pH donné et pendant un temps donné dans les trois flasques successivement. Les modèles dynamiques sont plus complexes et mettent en jeu différents compartiments reliés entre eux pour reproduire au mieux une digestion *in vivo*. Des forces mécaniques sont mises en jeu pour reproduire le péristaltisme et les contractions de l'estomac et de l'intestin (114).

Jusque récemment, il existait un grand nombre de modèles de digestion *in vitro* statiques utilisant différentes enzymes digestives, forces ioniques, pH, temps de digestion, etc... Les résultats inter-études étaient donc souvent peu comparables. Il a été décidé de mettre au point un protocole de référence. Cette mise au point s'est faite au sein du COST (European Cooperation in Science & Technology) Infogest et a abouti à l'adoption d'une méthode standardisée de digestion *in vitro* appelée méthode de Minekus d'après le nom de l'auteur la développant (115). Ce protocole permet de standardiser les conditions expérimentales en termes d'enzymes, de concentration, de pH et de temps d'incubation (**Figure 8**). Les digestions statiques sont rapides, simples, peu chères et répliquables. En revanche, elles ne peuvent reproduire tous les paramètres d'une digestion *in vivo*, notamment les forces mécaniques (114).

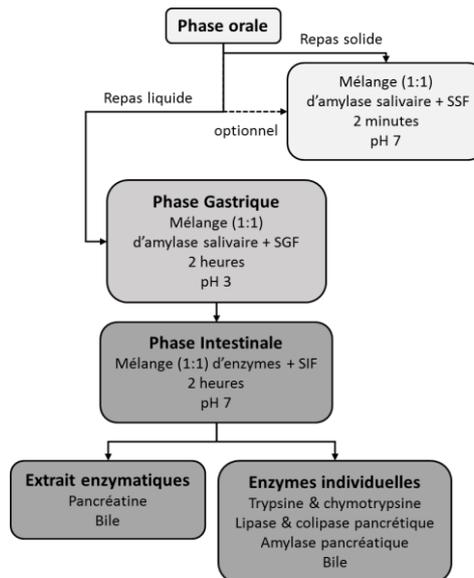


Figure 8. Schéma explicatif simplifié du protocole dit de Minekus pour la digestion *in vitro* statique. D'après (115).

Il existe un certain nombre de méthodes dynamiques plus ou moins complexes. Les plus simples ne comprennent qu'un seul compartiment, comme le Dynamic Gastric Model ou le Human Gastric Simulator, qui comme leur nom l'indique ne modélisent que la digestion dans l'estomac. D'autres sont plus complexes et modélisent l'ensemble du système digestif, c'est le cas du système TIM (116,117) (**Figure 9**). Les digestions dynamiques permettent de mieux imiter les conditions physiologiques digestives, permettant une meilleure comparaison avec les données *in vivo* (114) mais elles sont plus difficiles à mettre en place, car elles reposent sur des équipements très spécifiques, et donc non accessibles à tous.

Les digestions *in vitro* statiques et dynamiques ont été comparées à la digestion *in vivo* chez le porc par Egger *et al.* en 2017 et 2019 (118,119). Si ces études ne s'intéressent pas à la digestibilité en tant que telle, elles comparent la digestion des protéines en acides aminés entre les modèles. La première a montré que la digestion de poudre de lait écrémé étudiée avec le protocole de Minekus était semblable à celle chez le porc. Ainsi la quantité d'acides aminés libres retrouvés dans l'intestin du porc était identique à celle des acides aminés libres de la phase intestinale *in vitro* (118). La seconde étude s'intéressait aux mêmes paramètres mais en les comparant aussi à une digestion dynamique. Il a aussi été montré une bonne corrélation entre la digestibilité vraie obtenue *in vivo* et la digestibilité de l'azote obtenue *in vitro* ($r^2 = 0,88$) (120). Cho et Kim (121) ont aussi étudié la corrélation entre la digestibilité *in vitro* et *in vivo*. La méthode *in vitro* choisie consistait en deux étapes, la phase gastrique et la phase intestinale, et la digestibilité iléale apparente était étudiée chez le porc. Les résultats donnaient pour les protéines une différence de digestibilité de 6,6% entre les deux, la mesure *in vitro* étant supérieure à la mesure *in vivo*. Pour les acides aminés, les différences allaient de 8 à 15%. Mais si la corrélation entre les deux mesures pour les protéines était importante ($r^2 = 0,76$), la disparité était grande selon les acides aminés (entre 0,24 et 0,89).

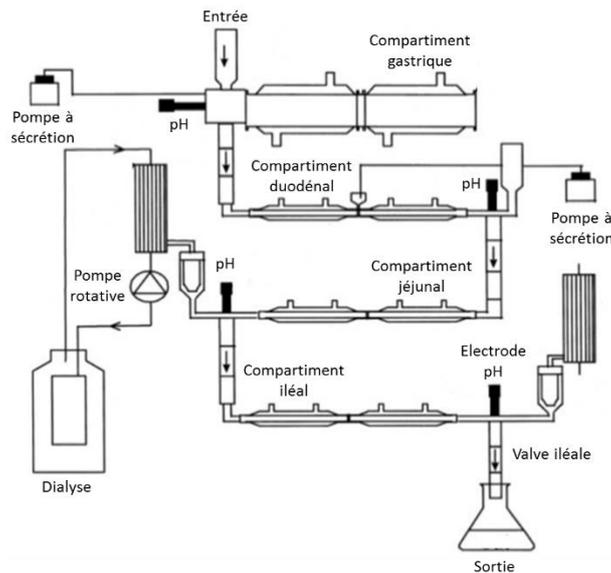


Figure 9. Schéma simplifié du modèle de digestion *in vitro* dynamique de l'estomac et de l'intestin grêle (TIM). D'après (116).

En résumé, les méthodes *in vitro* permettent d'obtenir de bonnes informations sur les processus de digestion des protéines et sur leur transformation en peptides et acides aminés (122). Mais elles ne permettent pas de retranscrire toute la complexité des processus de la digestion *in vivo* (123).

Parmi les modèles *in vivo*, trois ressortent : l'Homme, le porc et le rat.

L'Homme est le « modèle » idéal mais l'accès à son contenu intestinal est compliqué. Les mesures peuvent être faites au niveau fécal (124) avec les imprécisions que cela comporte (section 2.2.1), ou au niveau iléal *via* une sonde (125,126). Ces sondes sont insérées au niveau du nez des volontaires et vont migrer par elles-mêmes par le pylore dans l'intestin jusqu'à l'iléon terminal, permettant ainsi de récupérer les contenus digestifs après la zone d'absorption. Cette méthode a été utilisée dans un certain nombre d'études de digestibilité (*i.e.* (94,98,126)) mais elle comporte plusieurs biais, parmi lesquels, l'influence de la sonde sur l'intestin et le transit ou le fait de rester allongé pendant des heures. Une autre solution est le recours aux patients iléostomisés qui permettent un accès direct au contenu iléal. Parmi les études utilisant ce modèle, on peut citer l'étude de Moughan *et al.* en 2005 (127). Cette étude portant sur des iléostomisés donnait, pour un isolat de soja, une digestibilité de 99,5%, à comparer avec les 90,9% obtenus chez l'Homme sain mais avec une autre méthode utilisant le marquage à l'azote ^{15}N (98). Étant donné que les iléostomies sont pratiquées suite à des pathologies digestives graves comme le cancer du côlon ou la maladie de Crohn (128), la question se pose de la validité de ce modèle comparés à l'homme sain. Ainsi l'azote retrouvé dans les fèces de patients iléostomisés était supérieur à celui de sujets avec des côlons intacts (129,130) ce qui est contradictoire avec ce qui a été montré précédemment. Après ingestion chronique de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$,

il a été montré que l'enrichissement des acides aminés plasmatiques en ^{15}N était plus faible chez des iléostomisés que chez des adultes sains (131). Ces différences pourraient être dues à des modifications morphologiques et microbiennes de l'iléon terminal des patients iléostomisés, qui tendent à se rapprocher des caractéristiques coliques (132).

Le modèle porcin a plusieurs avantages par rapport au modèle rat, son régime alimentaire est plus proche de celui de l'Homme et il ne pratique pas la coprophagie (124). De plus, de par sa physiologie et son anatomie, il se rapproche plus de l'Homme que le rat (133) (**Table 9**). Il permet aussi de collecter une plus grande quantité d'effluents intestinaux que le modèle rongeur. Mais en revanche, il demande plus d'espace et est plus coûteux que le rat qui peut lui être hébergé en grand nombre (134).

	Homme	Rat	Porc
Estomac	4 régions: cardia, fundus, corps et pylore pH 1,5 à 3,5	3 régions: pré-estomac, corps et pylore pH 3,0 à 4,0	4 régions: oesophage cardia, fundus, et pylore pH 1,5 à 2,5
Intestin grêle	5,5-6,4 m de longueur pH 6,4 à 7,3	1,5 m de longueur pH 5,0 à 6,1	1,2-2,1 m de longueur pH 6,1 à 6,7
Caecum	plus petit que le côlon pas de fermentation pH 5,7	plus large que le côlon beaucoup de fermentation pH 5,9 à 6,6	plus petit que le côlon peu de fermentation pH 6,0 à 6,4
Côlon	3 segments beaucoup de fermentation muqueuse épaisse pH 6,7	non divisé pas de fermentation muqueuse fine pH 5,5 à 6,2	3 segments beaucoup de fermentation muqueuse épaisse pH 6,1 à 6,6

Table 9. Comparaison anatomique et fonctionnelle des systèmes digestifs de l'Homme, du rat et du porc. D'après (135).

Le rapport FAO sur l'évaluation de la qualité des protéines alimentaires publié en 2013, validait l'utilisation du modèle rat mais indiquait que la mesure de digestibilité devait être déterminée préférentiellement chez l'Homme et que si cela n'était pas possible, cela devait être fait chez le porc et le rat, et dans cet ordre-là (44). Au niveau anatomique, le rat se distingue de l'homme essentiellement par la présence d'un caecum développé entre l'intestin grêle et le côlon (136). En revanche, les besoins en acides aminés indispensables du rat sont supérieures à celles du porc et de l'Homme (134) (**Table 10**). Ainsi, en moyenne ils sont 1,7 fois supérieurs à celles de l'Homme alors que les recommandations du porc ne sont que 1,2 fois supérieures. Cette différence est surtout importante pour les acides aminés soufrés où il existe un facteur 3 entre le rat et l'Homme.

	Homme adulte (44)	Rat (134)	Porc (134)
Thr	23	41	34
Val	39	49	36
Ile	30	41	28
Leu	61	71	50
AAA	41	68	48
Lys	48	61	52
AAS	23	65	30
Trp	6,6	13	10

Table 10. Comparaison des profils de besoins en acides aminés de l'homme, du rat et du porc. Les besoins sont exprimés en mg/kg/j. D'après (44,134).

Il existe un certain nombre d'études comparant les différents modèles entre eux et il est aussi possible de comparer les valeurs provenant d'études différentes mais portant sur la même protéine.

Les résultats obtenus sur modèle porc ont été comparés aux résultats obtenus chez l'Homme dans plusieurs études. La première en 1994 s'est intéressée à la digestibilité des acides aminés après un repas complet dans ces deux modèles (124). Les porcs et les sujets humains étaient iléostomisés. La digestibilité iléale vraie était supérieure chez l'Homme pour tous les acides aminés excepté la sérine et la leucine, mais ces différences n'étaient pas significatives entre les deux modèles sauf pour la thréonine, la phénylalanine et les acides aminés soufrés. L'écart moyen était de 1,9% et les différences allaient de 0,1% pour la sérine à 8,1% pour la cystéine. Mais une autre étude a montré que la digestibilité du modèle porc était supérieure à celle de l'Homme pour l'azote et pour tous les acides aminés (137) (**Table 11**). La différence était d'environ 3% pour l'azote et variait entre 0,2 et 6% pour les acides aminés mais les auteurs considéraient que cette différence était minime. De plus, la corrélation entre la digestibilité iléale vraie des deux modèles était très bonne pour l'azote ($r^2 = 0,97$) et bonne pour les acides aminés ($r^2 = 0,76$). Dans cette étude, les porcs étaient canulés alors que les volontaires humains avaient une sonde naso-iléale, ces deux solutions étant considérées comme les plus adaptées à ces modèles. En revanche, il a été montré dans une troisième étude que la digestibilité iléale apparente de l'azote du modèle porc était en moyenne inférieure de 7,3% à celle de l'Homme (29) mais il est plus juste d'utiliser la digestibilité iléale vraie car elle prend vraiment en compte le devenir des acides aminés alimentaires (137).

Le rat est réputé comme étant un meilleur « digesteur » que l'homme ou le porc. Il en résulte que les digestibilités obtenues avec ce modèle sont supérieures (**Table 11**). C'est le cas pour des isolats de protéines de lait et de soja où la digestibilité iléale vraie des acides aminés chez le rat était en moyenne supérieure respectivement de 1,1% et 2,1% à celle de l'Homme (138,139). Pour la caséine, les résultats sont contradictoires avec des valeurs chez le rat parfois inférieures à celles de l'Homme et parfois supérieures. Ainsi, dans l'article de Deglaire et Moughan (134), la digestibilité iléale de la caséine chez le rat était inférieure à celle de l'Homme de 3,4% pour les acides aminés et de 1,3% pour l'azote alors que Lacroix et *al.* (140), donnait

une valeur de digestibilité de la caséine chez le rat (95,6%) similaire ou supérieure à celles de l'Homme (94% (134,137)). D'après Deglaire et Moughan (134), la corrélation de la digestibilité fécale vraie entre les deux modèles est élevée ($r^2 = 0,92$). La différence de digestibilité fécale pourrait être due à la différence anatomique au niveau du gros intestin. Il a aussi été remarqué que des protéines peu digestibles par l'homme pouvaient être bien digérées par le rat. Ainsi, la digestibilité iléale d'un isolat de colza était de 84% chez l'Homme (54) alors qu'elle était de 95,1% chez le rat (141).

La comparaison des deux modèles animaux que sont le rat et le porc a fait l'objet d'une étude en 2003 portant sur plusieurs sources de protéines (139). Dans cette étude, la digestibilité des acides aminés était en moyenne similaire entre les deux modèles (96,0% pour le porc et 96,1% pour le rat) mais ce résultat cachait de grandes disparités. Ainsi, 9 acides aminés sur 16 testés étaient supérieurs chez le porc et cette différence allait de 0,1% pour la thréonine à 3,5% pour l'histidine. Les autres acides aminés avaient une digestibilité iléale vraie supérieure chez le rat avec des écarts allant de 0,2% pour l'alanine à 10,6% pour la cystéine. Il y avait un effet significatif de l'espèce sur 7 des 16 acides aminés.

	Caséine			Lait			Isolat de soja		
	Homme (134)	Porc (137)	Rat (134)	Homme (138)	Porc (139)	Rat (139)	Homme (138)	Porc (139)	Rat (139)
Acides aminés indispensables									
His	94,7	99	96,8	94,9	99	96	91,7	95	93
Ile	94,1	97,2	83,8	95,4	98	95	93,5	97	97
Leu	97,2	98,9	96,2	95,1	99	99	93,3	96	95
Lys	97,4	99,3	97,9	94,9	99	99	95	97	98
Phe	96,3	99,2	96,9	95,6	98	100	95,5	96	97
Thr	93,3	94,5	91,6	93,4	95	94	89	91	92
Tyr	97,2	99,4	98	99,3	99	100	96,8	97	99
Val	93,7	96,6	88,5	95,9	98	97	92,5	96	96
Met	/	/	/	/	100	98	/	97	98
Cys	/	/	/	/	89	99	/	85	95
Acides aminés dispensables									
Ala	95,1	96,2	87,7	95,9	96	97	92,3	96	95
Gly	/	/	/	91,6	90	86	90,1	90	87
Asp	91,6	97,3	89,6	94,3	98	96	93,2	97	95
Gln	94	97,5	87,9	95,3	98	93	96,6	100	98
Pro	96,2	97,9	95,8	96,1	/	/	92,8	/	/
Ser	87	93,1	71,9	92	97	90	93,2	97	98
Arg	/	/	/	/	98	98	/	98	99
Moyenne AA	94,4	97,4	91,0	95,0	96,9	96,1	93,3	95,0	95,4
Digestibilité N	94,3	97,6	93	95,3	/	/	91,7	/	/

Table 11. Comparaison des digestibilités iléales vraies de l'homme, du rat et du porc pour trois sources protéiques différentes. D'après (134,137–139).

2.1.2. Environnement des protéines dans le repas

Un des grands facteurs de variation de la digestibilité est la composition et la structure de l'aliment testé. En premier lieu, la pureté en protéines de l'ingrédient protéique est importante. Plus la fraction protéique est pure, plus la digestibilité des protéines et acides aminés est élevée. Une étude comparant la digestibilité iléale standardisée de plusieurs oléagineux chez le porc a montré que la digestibilité du colza était améliorée de 5,6% quand le repas était composé de tourteau (17% de protéines) au lieu de graines (10,5% de protéines) (15). Cette augmentation de digestibilité était en moyenne de 8,7% pour les acides aminés indispensables et de 4,1% pour les dispensables. La digestibilité iléale était plus importante pour le tourteau pour tous les acides aminés à l'exception de la glycine et de la proline. En revanche, cette étude ne montrait pas de différence entre des graines et du tourteau de tournesol. Une autre étude a montré que la digestibilité fécale vraie du soja augmentait avec la pureté en protéines chez l'Homme (142). Elle était de 78% pour les graines de soja entières, de 86% pour la farine et de 95% pour l'isolat de soja. La différence était moins importante (3,2%) si l'on comparait deux études différentes sur modèle porcin, portant sur la digestibilité d'un isolat de colza (137) à celle du tourteau (16). Cela peut s'expliquer par la plus grande accessibilité des protéines aux enzymes digestives pour un ingrédient protéique que pour une matrice avec des interactions moléculaires complexes. Les parois végétales notamment rendent les protéines et les autres nutriments plus résistants à la digestion et donc moins digestibles. La différence de digestibilité n'est pas forcément liée au taux protéique mais peut être une conséquence des traitements effectués pendant l'extraction des protéines.

La cuisson des aliments ou les traitements thermiques ont aussi un impact sur la digestibilité des protéines. Ainsi, il a été montré chez le rat qu'une cuisson longue et à haute température de viande de bœuf pouvait diminuer la digestibilité des protéines (143). La digestibilité de la viande crue (97,5%) était diminuée de 3% par une cuisson dans de l'eau bouillante pendant 3 h et dans une moindre mesure, diminuée de 0,6% par une cuisson au four à 180°C pendant 40 min. Alors qu'au contraire, des cuissons rapides comme le barbecue ou le grill n'avaient aucun effet sur la digestibilité. Une forte ou longue cuisson dénaturerait les protéines de viandes les rendant moins accessibles aux enzymes digestives et donc moins digestibles (144,145). Les mêmes résultats ont été observés chez l'Homme (94), avec une diminution de digestibilité iléale de 4% entre une cuisson saignante et une viande entièrement cuite. Mais, dans le modèle porc, il n'a pas été montré d'effet, sur la digestibilité iléale vraie, de la température de cuisson (145,146). Il a par contre été montré, chez le porc, que l'autoclavage avait un effet sur la digestibilité iléale standardisée de tourteaux de tournesol à partir de 40 minutes à 130°C (17). Une heure d'autoclavage diminuait la digestibilité de 12,1%. Cette étude s'intéressait aussi à la digestibilité des acides aminés, pour les acides aminés non indispensables la différence moyenne était aussi de 12% mais elle était plus limitée quand on s'intéresse à la digestibilité des acides aminés indispensables avec une moyenne de 4,8%. La chaleur provoque des réactions de Maillard avec les acides aminés formant des complexes diminuant la digestibilité

des protéines et acides aminés. De la même façon, la digestibilité du lait chez le rat était affectée par un traitement de type atomisation à 250°C alors que des traitements courts à haute température ne diminuaient pas la digestibilité (140). Il a aussi été montré que le traitement thermique de poudre de lait écrémé avait pour effet de diminuer la digestibilité de 14% chez des rats jeunes et de 22% chez des rats plus âgés (147).

Enfin, certains facteurs antinutritionnels naturellement présents dans les aliments peuvent avoir un effet sur la digestibilité en interagissant avec les protéines. Parmi ces facteurs on peut citer les inhibiteurs de trypsine, les phytates ou les polyphénols. Les inhibiteurs de trypsine sont des molécules qui, comme leur nom l'indique, inhibent l'activité de la trypsine, affectant ainsi la digestion des protéines et acides aminés (78). On en trouve dans un grand nombre d'aliments végétaux mais surtout en grande quantité dans les graines de soja, entre 20,3 et 122,6 mg/g de protéine (148,149). Une dose de 623 mg d'inhibiteur de trypsine dans un repas diminuait la digestibilité des protéines de 11,5% chez le rat (150). Ces inhibiteurs peuvent être désactivés par un traitement thermique (78,148). L'acide phytique est une molécule que l'on trouve principalement dans un certain nombre de végétaux (céréales, légumineuses, fruits à coque, oléagineux) (151). Le tourteau de tournesol en contient par exemple 27 g/kg (152). L'acide phytique a pour rôle de stocker des micronutriments par chélation comme le potassium, le magnésium ou le sodium (151). Une fois lié à un cation, le complexe formé prend le nom de phytate. Ces derniers peuvent altérer la biodisponibilité des protéines en diminuant l'activité d'enzymes digestives, par chélation de cofacteur, ou par interaction directe ou indirecte avec les protéines alimentaires. Les phytates sont relativement résistants à la température mais peuvent être neutralisés par des phytases ou par trempage prolongé (142). Une revue a montré, chez le porc, que la digestibilité iléale apparente de l'azote et des acides aminés d'un régime complexe augmentait avec l'ajout de phytase dans le repas (153). Cette augmentation était entre 1,6% et 12% pour l'azote, selon les études, et suivant un effet dose linéaire. Les polyphénols sont des constituants que l'on trouve dans un grand nombre de produits d'origine végétale (154,155). Il existe un grand nombre de classes de polyphénols, dont les flavonoïdes ou les tannins et ils ont des effets antioxydants importants (156). Ils peuvent se lier aux enzymes digestives et aux substrats protéiques (157). Il a été montré que le taux de tannins était corrélé à la digestibilité iléale apparente des protéines et acides aminés de caséine chez le rat (158). En moyenne la digestibilité des acides aminés était de 91% en absence de tannins provenant d'extrait de *Vicia faba*, en présence de 2% de tannin elle n'était plus que de 60% en moyenne avec des disparités en fonction des acides aminés.

2.2. Méthodes de mesure de la digestibilité

2.2.1. Où mesurer la digestibilité : mesure iléale vs fécale ?

Un des moyens les plus faciles de mesurer la digestibilité est la mesure fécale. Les pertes azotées alimentaires, c'est-à-dire les peptides et acides aminés qui n'ont pas été absorbés dans l'intestin grêle, sont mesurées dans les fèces. Cette fraction non absorbée est soumise à des modifications par le microbiote du côlon (27,159). Comme vu précédemment (section 1.1), les bactéries intestinales peuvent transformer les acides aminés en métabolites contenant de l'azote, dont une partie peut être absorbée comme les polyamines, les indoles ou l'ammoniaque (27). Ces modifications ont pour conséquence de surestimer la digestibilité fécale. Cette surestimation va, selon les modèles d'études, de 2% chez l'Homme sain à 15% chez le porc en croissance (160). Elle est considérée comme tolérable pour la digestibilité des protéines mais est plus problématique pour la digestibilité des acides aminés individuels.

La mesure la plus précise de la digestibilité des protéines et des acides aminés se fait au niveau iléal, c'est-à-dire en fin de zone d'absorption des peptides et acides aminés afin d'éviter de trop importantes modifications bactériennes des peptides et acides aminés non absorbés. Même s'il existe une activité bactérienne dans l'intestin grêle (26), celle-ci peut être considérée minime comparée à l'activité colique. La collecte des effluents iléaux est faisable chez le modèle porc, à l'aide de canules intestinales (130,161,162) et chez l'Homme à l'aide de sondes naso-iléales posées à des volontaires sains (54,94,95,163) ou directement par vidange de leur poche chez des patients iléostomisés (164). Mais la pose de canules chez le porc ou de sondes chez l'Homme reste coûteuse et difficile à mettre en place. Par ailleurs, les patients iléostomisés sont de plus en plus rares. Chez le rat, la mesure de la digestibilité iléale est difficile. En effet il n'est pas possible de poser de canules intestinales et le volume de digesta prélevé à l'euthanasie est relativement faible. Afin de surmonter ces problèmes, des méthodes ont été proposées, comme nous le verrons plus loin (section 2.2.2).

Les différences entre digestibilité iléale et fécale ont été mesurées dans plusieurs études. Si l'on ne s'intéresse qu'aux modèles classiques de digestibilité, l'écart pour les rats était entre 5,0 et 9,0% ; entre 8,3 et 15% pour le porc et entre 2,0 et 5,9% chez l'Homme (29,160). L'écart entre digestibilité iléale et fécale dépend aussi de la protéine étudiée. Rutherford *et al.* ont évalué la digestibilité iléale et fécale de nombreuses sources de protéines chez le rat et ont montré que la différence entre ces deux mesures était d'autant plus grande que la digestibilité était faible (112). Ainsi la digestibilité fécale vraie était surestimée de 15 points, comparée à une digestibilité iléale vraie de 67%, pour un petit-déjeuner à base de céréales chez des rats en croissance. Alors que cette différence n'était que de 3% pour un isolat de lactosérum ayant une digestibilité iléale de 99%. L'écart entre digestibilité iléale et fécale vraie était toujours significatif dans cette étude, sauf pour les légumineuses (pois, haricots rouges et concentrat de pois). Les digestibilités iléale et fécale ne sont pas bien corrélées pour les modèles porc ($r^2 = 0,67$) et rat ($r^2 = 0,27$) (29). L'utilisation d'un facteur de correction entre ces deux mesures est donc difficile à mettre en place.

La différence entre mesure fécale et iléale pour les acides aminés n'a été étudiée chez l'Homme que dans une seule étude (124). Dans cette étude, la mesure fécale surestimait la mesure iléale pour tous les acides aminés sauf la lysine, l'alanine, l'isoleucine et la méthionine. Pour ce dernier acide aminé la digestibilité fécale était 9,8% plus faible que la digestibilité iléale. La surestimation variait selon les acides aminés de 0,9% pour la leucine à 15% pour la glycine. Les différences n'étaient pas toujours significatives mais en moyenne la surestimation était de 2,4%. Même si l'écart entre les deux n'était pas significatif pour l'azote total dans cette étude, on peut voir que la mesure fécale de la digestibilité peut donner lieu à de grandes différences.

2.2.2. Comment résoudre la problématique des pertes endogènes ?

2.2.2.1. Estimation des pertes endogènes

La première façon de résoudre le problème posé par les pertes endogènes est de les mesurer et de les soustraire ensuite aux pertes totales. Cela peut se faire par administration d'un repas sans protéines chez les mêmes individus, ou *via* l'utilisation d'un groupe protéoprive.

Les pertes endogènes peuvent être mesurées à l'aide d'un repas sans protéine (« protein free diet »). Les protéines récupérées dans le tube digestif après ingestion de ce repas proviennent donc des pertes endogènes. Cette méthode a été utilisée plusieurs fois chez l'Homme (**Table 12**) (165–167) avec des résultats semblables mais une variabilité assez élevée (écart-type moyen 40,5 mg/jour). Cette méthode est aussi souvent utilisée en nutrition animale pour les mesures de digestibilité chez le porc notamment (109,168). En revanche, il s'agit d'une technique qui n'est pas physiologique (169) et qui tend à sous-estimer les pertes endogènes (170). Ainsi il est possible d'obtenir des digestibilités fécales supérieures à 100% en utilisant ce groupe sans protéine (112).

Pour se mettre dans une condition plus physiologique, il est possible de mesurer les flux d'acides aminés endogènes en donnant dans le repas une protéine hydrolysée par des enzymes, le plus souvent de la caséine (enzyme hydrolysed casein, EHC). Les contenus intestinaux récupérés sont filtrés, les plus hauts poids moléculaires (supérieur à 10 kDa) contiennent essentiellement les protéines endogènes, alors que les petits poids moléculaires élués contiennent les restes de peptides et acides aminés libres non absorbés de caséine (171). Cette méthode permet de mesurer les flux endogènes iléaux après une adaptation à un régime. Ainsi, après avoir été habitués pendant une semaine à consommer de la gélatine, de la viande de bœuf, de la caséine, de l'albumine de lait ou un isolat de colza, les rats n'avaient pas le même flux endogène basal d'acides aminés (172).

	Rowan et al., 1993 (165)	Fuller et al., 1994 (166)	Moughan et al., 2005 (167)	Moyenne
mg d'acide aminé/jour				
Lys	194,4	281,5	213,3	229,7
His	102,9	135,5	211,5	150,0
Arg	171,6	244,0	186,4	200,7
Asp	377,4	339,0	465,3	393,9
Thr	336,9	284,5	374,7	332,0
Ser	269,7	218,5	290,1	259,4
Glu	442,2	359,0	421,9	407,7
Pro	320,7	262,5	292,5	291,9
Gly	267,6	/	324,8	296,2
Ala	194,1	150,0	227,2	190,4
Val	250,8	206,0	329,6	262,1
Ile	148,2	124,5	162,1	144,9
Leu	282,6	227,5	313,6	274,6
Tyr	162,0	139,0	170,7	157,2
Phe	188,1	134,0	174,7	165,6
Cys	227,1	87,0	162,9	159,0
Met	57,0	36,0	40,5	44,5
Trp	96,6	/	/	96,6

Table 12. Comparaison des pertes endogènes iléales d'acides aminés chez l'Homme mesurée avec un régime protéoprive. Les pertes sont exprimées en mg d'acide aminé par jour. D'après (165–167).

	Repas protéoprive	Repas EHC	p value
Asp	174,5	392,0	<0,001
Arg	69,9	103,5	<0,05
Ala	85,2	140,3	<0,01
Glu	158,2	735,9	<0,01
Gly	121,8	147,1	NS
Pro	109,7	313,7	<0,001
Ser	108,8	22,5	<0,001
Ile	60,8	123,1	<0,001
Leu	117,6	174,5	<0,05
Val	123,6	213,7	<0,01
Lys	80,0	133,8	<0,01
Phe	65,5	94,0	NS
Tyr	64,0	92,6	NS
His	79,3	119,9	<0,05
Thr	140,5	188,5	<0,05
Cys	61,1	85,0	NS
Met	15,2	60,5	<0,001

Table 13. Comparaison des flux iléaux endogènes avec deux méthodes : protéoprive et EHC. Les flux sont exprimés en mg/9h. D'après (167).

Si l'on compare la méthode EHC et celle des repas protéoprive (**Table 13**), on peut voir que cette dernière donne des flux d'acides aminés endogènes inférieurs à ceux avec la méthode

EHC et les différences entre ces deux méthodes varient selon les acides aminés jusqu'à un facteur 4,7 pour l'acide glutamique. Les différences entre les deux méthodes sont significatives pour tous les acides aminés sauf quatre (cystéine, phénylalanine, tyrosine et glycine). Contrairement à la méthode sans protéine, la méthode EHC tend à surestimer les pertes endogènes, car une partie des petits peptides endogènes vont être élués au moment de l'ultrafiltration (171).

2.2.2.2. Mesure par marquage des sécrétions digestives

Il est possible de mesurer directement les flux endogènes d'acides aminés en utilisant un marquage isotopique. Cette méthode, appelée dilution ou infusion isotopique, a été utilisée chez l'Homme (173,174) et le porc (175,176). Le principe est d'infuser en continu de la leucine marquée, le plus souvent de la ^{15}N ou ^{13}C leucine, *via* un cathéter chez le porc et une perfusion chez l'Homme. Après un certain temps, l'enrichissement en ^{15}N dans les acides aminés libres plasmatiques atteint un plateau. La mesure de l'enrichissement de la leucine dans le plasma et dans les effluents intestinaux va permettre d'estimer les pertes endogènes totales selon la formule suivante :

$$\text{Leucine}_{\text{endo}} = \text{Leucine}_{\text{digesta}} \times \frac{(^{15}\text{N}_{\text{digesta}} - ^{15}\text{N}_{\text{repas}})}{(^{15}\text{N}_{\text{plasma}} - ^{15}\text{N}_{\text{repas}})}$$

Avec $\text{Leucine}_{\text{endo/digesta}}$, les quantités de leucine endogènes et dans les effluents respectivement, et ^{15}N l'enrichissement en azote 15 dans le repas, le plasma et les effluents intestinaux (177). Il a été décrit chez le porc que l'enrichissement des acides aminés libres au niveau de la veine porte était le meilleur reflet de l'enrichissement des acides aminés endogènes dans l'intestin (175). Elle permet aussi de mesurer la digestibilité vraie des protéines et acides aminés notamment chez le porc. Ainsi, en utilisant cette méthode chez le porc, il a été estimé que la digestibilité iléale vraie du tourteau de colza était 73,5% (177), valeur proche de celle obtenue par estimation des protéines endogènes avec un groupe protéoprive (73,7%) (15). Néanmoins cette méthode ne permet pas l'étude de tous les acides aminés indispensables.

2.2.2.3. Mesure par marquage des protéines

Une autre méthode pour mesurer les flux endogènes d'acides aminés repose sur la guanidinylation de la lysine en homoarginine (HA) (178). Ainsi dans le repas, la lysine est remplacée par l'homoarginine. Cette dernière est obtenue par ajout préalable de O-méthyl-iso-urée (179). On considère que l'homoarginine est naturellement absente du repas test et que sa sécrétion intestinale est faible voire inexistante. Par conséquent, la digestibilité apparente (section [1.3.2.4](#)) de l'homoarginine correspond à la digestibilité vraie de la lysine (voir formule suivante).

$$DIV_{\text{lysine}} = \frac{\text{HA dans le repas} - \text{HA dans les effluents}}{\text{HA dans le repas}} \times 100$$

Il est possible aussi de calculer les pertes endogènes en lysine, en g/kg de matière sèche ingérée, selon la formule suivante (161):

$$\text{Perte endogène}_{\text{lysine}} = \frac{\text{Lysine dans le repas} \times (DIV_{\text{lysine}} - DIA_{\text{lysine}})}{100}$$

A partir des données de la lysine, il est ensuite possible de déterminer les pertes endogènes et la digestibilité vraie des autres acides aminés à partir du ratio homoarginine/autres acides aminés dans le repas quadinylé et dans les contenus iléaux (178). Il a ainsi été montré, dans un modèle porcin, que la quadinylation n'avait pas d'effet sur la composition du repas en nutriments et que la digestibilité apparente d'un mélange de colza et d'orge était similaire avec ou sans la quadinylation (179).

Une manière de mesurer la digestibilité est de marquer les protéines et acides aminés alimentaires avec des isotopes stables. Les isotopes stables sont non radioactifs et comme leur nom l'indique stables dans le temps. Ils existent à l'état naturel mais en très faible quantité. Le principe de cette méthode est d'enrichir les protéines étudiées en l'isotope choisi. Cela permet ensuite de pouvoir différencier les acides aminés alimentaires marqués des acides aminés endogènes non marqués.

L'isotope le plus utilisé pour les études de digestibilité est l'azote ^{15}N . Son abondance naturelle est de 0,364%. Le marquage à l'azote ^{15}N peut se faire aisément dans les plantes par apports d'engrais azotés enrichis comme le nitrate d'ammonium ($^{15}\text{NH}_3^{15}\text{NO}_3$) (54,96,163) ou le nitrate de potassium (K^{15}NO_3) (98,180). Les apports sont la plupart du temps répétés pour assurer une bonne incorporation de l'azote enrichi dans la plante. Il est aussi possible de marquer des protéines animales, notamment de ruminants car les bactéries contenues dans le rumen sont capables de convertir l'azote inorganique en protéines (181), permettant ainsi l'incorporation d'azote enrichi dans les protéines de l'animal. Cette méthode a déjà été utilisée pour marquer de la viande bovine (94) et du lait de vache (95,182) par apport de sulfate d'ammonium ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) par voie orale ou directement dans le rumen. Des protéines animales ne provenant pas de ruminants ont aussi été marquées à l'azote 15 comme les protéines de blanc d'œuf (164,183). Dans l'étude de Evenepoel *et al.*, les poules pondeuses avaient accès à de la leucine ^{15}N dans leur repas et par transaminations les autres acides aminés étaient ensuite enrichis en ^{15}N , mais le marquage était surtout concentré sur la leucine. Fromentin *et al.*, ont réussi à marquer la totalité des acides aminés d'œufs de poules en donnant des mélanges d'acides aminés marqués au ^{15}N . Mais ces méthodes sont complexes et coûteuses, et hormis pour les ruminants, il reste peu fréquent de marquer des protéines d'origine animale au ^{15}N .

Le marquage à l'azote ^{15}N a permis d'obtenir un certain nombre de résultats de digestibilité protéique chez l'Homme (**Table 14**). La plupart utilisent des sondes naso-iléales qui permettent de collecter les effluents intestinaux. Ces études utilisant le ^{15}N donnent une digestibilité allant

de 51,3% pour le blanc d'œuf cru de poule (164) à 95,5% pour le lait de vache (184). Mais la quasi-totalité des digestibilités se situent entre 84 et 95%. On remarque aussi que la digestibilité des protéines d'origine animale est supérieure à celle des protéines végétales. Le marquage à l'azote 15 a aussi été utilisé avec des modèles animaux comme le porc (137,145) ou le rat (141,143).

Protéine étudiée	Méthode	N =	Digestibilité iléale (%)
Lait (184)	sonde	5	95,5 ± 0,4
lait (protéine totale) (95)	sonde	7	94,8 ± 1,0
viande bœuf (94)	sonde	8	94,1 ± 0,7
viande bœuf à point (94)	sonde	8	90,1 ± 2,1
lait (caséine) (137)	sonde	6	94,1 ± 1,4
pois (globuline) (96)	sonde	9	94,0 ± 2,5
lait (caséine hydrolysée) (137)	sonde	5	92,3 ± 1,3
soja (isolat) (98)	sonde	10	91,5 ± 2,0
lupin (farine) (99)	sonde	7	91,0 ± 3,0
blanc d'œuf cuit (164)	iléostomisés	5	90,9 ± 1,8
blanc d'œuf cru (164)	iléostomisés	5	51,3 ± 21,9
Blé (97)	sonde	9	90,3 ± 4,3
pois (protéine totale) (96)	sonde	7	89,9 ± 4,0
pois (farine) (163)	sonde	7	89,4 ± 1,1
colza (isolat) (54)	sonde	7	84,0 ± 8,8

Table 14. Digestibilité iléale obtenues chez l'Homme en utilisant l'azote ¹⁵N comme marqueur des protéines alimentaires. D'après (54,94–99,137,163,164,184).

Récemment, la FAO a recommandé, pour le développement d'une nouvelle méthode non invasive (voir plus bas), d'utiliser le deutérium comme marqueur stable (42). L'application ou l'ingestion d'eau deutérée permet de marquer des protéines végétales et animales. Les animaux peuvent recevoir de l'eau deutérée dans l'eau de boisson et les plantes peuvent être arrosées à l'eau deutérée. De plus, le deutérium est moins sujet aux échanges par transaminations qui peuvent avoir lieu dans le gros intestin ainsi que dans le foie (185). Mais il n'existe pour le moment pas de données sur la digestibilité intestinale des protéines et acides aminés en utilisant un marquage au deutérium et ces études ne comparent pas ce marquage au ¹⁵N.

Un autre isotope stable utilisé dans les études de nutrition est le carbone 13 (¹³C). Il est notamment utilisé pour étudier l'oxydation des acides aminés alimentaires en mesurant le ¹³CO₂ dans l'air expiré (*i.e.* (164)). Le marquage au ¹³C est compliqué à mettre en place et est le plus souvent utilisé pour marquer des organismes photosynthétiques comme les plantes ou certains organismes unicellulaires comme les micro-algues. Ces organismes sont cultivés dans une atmosphère enrichie en ¹³CO₂ ce qui va enrichir les organismes uniformément, mais cette méthode est extrêmement coûteuse et le prix souvent prohibitif. Il a aussi été possible de marquer des protéines de lait de vache, en infusant un acide aminé individuel intrinsèquement marqué au ¹³C (phénylalanine ou leucine) (186,187). Il existe peu de mesure de digestibilité,

iléale ou fécale, des protéines ou acides aminés utilisant le ^{13}C (176). Mais il est recommandé d'utiliser ce marquage pour la protéine de référence dans la méthode non invasive.

Devant la difficulté à accéder au contenu iléal, en 2014 la FAO a préconisé le développement d'une nouvelle méthode de mesure iléale de la digestibilité des acides aminés : la méthode « double traceur » (42). Celle-ci est moins invasive que la méthode utilisant des sondes car elle se base uniquement sur des prélèvements sanguins. Cette méthode repose sur l'utilisation de plusieurs protéines marquées intrinsèquement avec différents isotopes stables. La protéine étudiée est marquée au deutérium (^2H) et une protéine de référence, à la digestibilité préalablement connue, est marquée au carbone 13 (^{13}C). Le principe (**Figure 10**) est de comparer, pour chaque acide aminé indispensable, le ratio entre ces deux marquages dans le repas donné aux volontaires et dans le plasma. Etant donné que la digestibilité de la protéine de référence est connue, en comparant ces ratios il est possible d'estimer la digestibilité de la protéine d'intérêt. Par exemple, si le ratio $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ dans le plasma est plus faible que celui dans le repas, cela veut dire que l'acide aminé de la protéine d'intérêt a une digestibilité plus faible que celle de la protéine de référence.

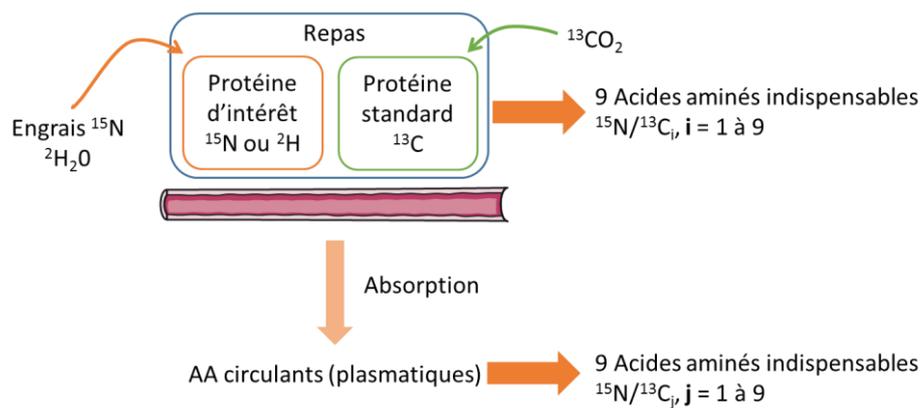


Figure 10. Schéma explicatif du principe de la méthode double traceur.

La protéine de référence choisie doit, d'après la FAO (42), remplir plusieurs critères : pouvoir être facilement enrichi en ^{13}C , être hautement digestible et acceptable culturellement dans le monde entier. Etant disponible commercialement, le choix s'est porté sur l'utilisation de micro-algues comme la spiruline.

La première étude utilisant ce principe a été publiée en 2014 (188). Engelen *et al.*, ont utilisé de la spiruline ^{15}N et de la phénylalanine ^2H pour estimer la digestibilité dans un contexte pathologique. Plus récemment une équipe indienne a utilisé cette méthode en étudiant cette fois la digestibilité de tous les acides aminés indispensables de différentes protéines chez l'adulte et chez l'enfant (185,189–193). La première étape a été de déterminer la digestibilité de la spiruline, aucune donnée n'existant chez l'Homme. Dans ces travaux, la digestibilité de la spiruline est déterminée grâce au prélèvement plasmatique en utilisant la méthode double traceur, et la spiruline ^{13}C était comparée à un mix d'acides aminés libres marqués au ^2H . Une première étude donnait une digestibilité moyenne des acides aminés indispensables de

spiruline de 85,2% (185) avec une digestibilité allant de 77,5% pour la lysine à 95,3% pour la phénylalanine. Ces valeurs ont été utilisées par la suite comme valeurs de digestibilité de référence pour l'étude des protéines à tester. Une seconde étude a ré-estimé la digestibilité de la spiruline ¹³C (192) et a trouvé une digestibilité moyenne de 87,9%. Les valeurs étaient similaires pour tous les acides aminés indispensables, sauf pour la lysine pour laquelle la digestibilité était 11,7% supérieure à celle de la première étude.

Les premières études utilisant cette méthode se sont intéressées aux légumineuses et aux protéines animales. Dans toutes ces études, le repas était composé de l'aliment testé marqué au ²H, accompagné de riz et d'un curry de tomates. Parmi les protéines testées, certaines l'ont été dans plusieurs études (**Table 15**). C'est le cas du haricot mungo et de l'œuf. La différence moyenne entre deux mesures allait de 2,9% pour l'œuf entier à 9,7% pour le haricot mungo décortiqué, et les écarts n'allaient pas toujours dans le même sens. Ces résultats restent similaires à ceux obtenus avec d'autres modèles par des mesures digestives directes pour les protéines animales. Ainsi la valeur de 89,4% trouvée pour l'œuf avec la méthode double traceur (190) était proche des 91% de digestibilité iléale vraie trouvée chez l'Homme (164), même si la cuisson était différente. En revanche, pour les protéines végétales, les valeurs déterminées avec la méthode double traceur étaient inférieures aux valeurs de digestibilité chez l'Homme et dans des modèles animaux. La comparaison donnée dans l'article de Kashyap *et al.* montrait que la différence était d'environ 11% pour le pois chiche, 18% pour le pois jaune et de 21% pour le haricot mungo (191), même si les modèles et les méthodes de mesures ne sont pas identiques.

Digestibilité avec la méthode double traceur (%)								
	Met	Phe	Thr	Lys	Leu	Ile	Val	Moyenne
Œuf entier cuit (192)	87,3	93,3	95,8	102,2	88,5	87,2	92,1	92,3
Œuf entier cuit (190)	85,9	95,6	96,2	88,9	87,6	85,4	86,6	89,4
Protéines de blanc d'œuf (190)	79,8	93	88,7	88,8	87,9	83,5	82,1	86,3
Viande de poulet cuite (190)	92,7	94,4	93,7	95,5	89,1	88,8	89,6	92
Spiruline (192)	86,2	93,1	82,3	89,2	86,7	85,4	92,4	87,9
Spiruline (185)	84,1	95,3	82,5	77,5	86	84,2	87,1	85,2
Pois chiche (191)	71,8	80,9	72,5	60	79,5	81,4	75,9	74,4
Pois chiche (185)	59,8	60,5	53,8	44,4	68,5	68,8	64,1	60
Pois jaunes (191)	56,1	80,6	66,8	62,1	79	79,5	77,4	71,6
Haricots mungo décortiqués (191)	64,3	75,1	54,5	63,4	76,3	82,9	80	70,9
Haricots mungo décortiqués (185)	60,6	65,2	43,6	56,5	62,3	76	64,5	61,2
Haricots mungo (185)	66	69,4	47,2	56,7	72,3	80,3	78,7	67,2
Haricots mungo (191)	52,2	73,4	42,5	63	67,5	75,8	67,8	63,2

Table 15. Récapitulatif des résultats de digestibilité des acides aminés indispensables obtenus avec la méthode double traceur. D'après (185,190–192).

Chapitre II

Travaux de thèse

1. Justification des travaux de thèse

Dans le contexte de la quête de nouvelles sources de protéines, cette thèse s'intéresse particulièrement à un protéoléagineux, le tournesol. Les seules données de qualité protéique et de digestibilité rapportées sur cette plante proviennent des études de nutrition animale portant sur la digestibilité de graines ou de tourteaux de tournesol (14–17). Ces études montrent une digestibilité des protéines de tourteau allant de 72,6% à 82,7%. Ainsi le premier objectif de ce travail est de caractériser la qualité protéique d'isolats de tournesol marqués avec des isotopes stables dans deux modèles : 1) dans un modèle de rat, par mesure de la digestibilité caecale et fécale des protéines et acides aminés et 2) dans une étude clinique sur Homme sain par mesure de la digestibilité iléale et de l'utilisation postprandiale nette des protéines et acides aminés. Le second objectif de ce travail de thèse est de développer et étudier la faisabilité et la pertinence de la méthode double traceur. Dans un premier temps, il fallait caractériser la qualité protéique de la spiruline qui a été proposée comme protéine de référence pour cette nouvelle méthode et pour laquelle il existait peu de données de qualité protéique. Cette caractérisation se fera chez le rat, en utilisant de la spiruline marquée à l'azote 15 ou au carbone 13. Dans un second temps, la digestibilité estimée avec la méthode double traceur sera comparée avec celle obtenue par la méthode iléale chez l'Homme afin de valider ou invalider cette nouvelle méthode.

2. Méthodes

2.1. Obtention d'isolats protéiques de tournesol marqués

Le double marquage des protéines et acides aminés de tournesol (^{15}N et ^2H) a été effectué lors de deux essais, l'un pour les études chez l'animal et l'autre pour l'étude clinique. Les deux cultures et marquages ont été effectués par Terres Inovia, à Thiverval-Grignon pour les plantes en serre et à Surgères pour les plantes en plein champs.

Pour l'étude pilote, 30 plants de tournesol ont été semés dans des pots, à raison d'un plant par pot, et sous serre. La température dans la serre était maintenue à 22°C le jour et 18°C la nuit avec une photopériode de 12 h. L'enrichissement en azote 15 s'est fait par deux apports d'engrais enrichi à 99% (nitrate d'ammonium $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_2$) (**Figure 11**). Le nitrate d'ammonium marqué représentait 6,25% du nitrate d'ammonium. Le premier a eu lieu au début de la phase végétative (stade B2/B4) et l'autre au début de la phase bouton floral (stade E1/E2) (194). Un troisième apport d'azote non enrichi a eu lieu au début de la floraison (stade F1). L'enrichissement en deutérium s'est fait en 5 apports rapprochés à partir de la floraison par arrosage des pieds avec de l'eau lourde ($^2\text{H}_2\text{O}$) enrichie à 99%. Le premier apport était dilué à 20%, les suivants étaient dilués à 10%. Après ce protocole, 970 g de graines de tournesol ont été récoltés.

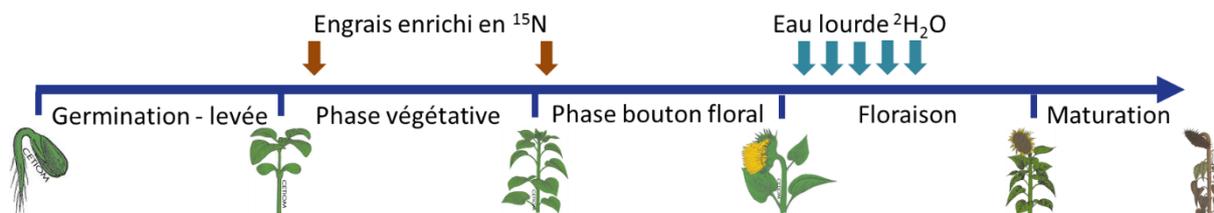


Figure 11. Protocole de marquage pour l'étude pilote sous serre.

Le marquage pour l'étude clinique a été effectué en plein champ sur une surface de 100m². L'apport d'azote enrichi a été fait en deux fois par apport de nitrate d'ammonium par pulvérisation (**Figure 12**) : une première fois en début de phase végétative (stade B2) et une seconde fois en début de phase bouton floral (stade E2). Le premier apport représentait 1/3 de l'azote marqué et le second représentait 2/3. L'apport d'eau deutérée a consisté en deux arrosages manuels de chaque pied de tournesol au début de la floraison (stade F1) réalisés à quatre jours d'intervalle. Il a été constaté que l'enrichissement en ²H des graines de tournesol était insuffisant pour un suivi *in vivo* des acides aminés marqués, par conséquent le ²H n'a pas été étudié pendant l'étude clinique. Les apports d'eau deutérée ayant eu lieu pendant des journées chaudes, une partie de l'eau deutérée s'était probablement évaporée dans les heures suivant l'arrosage. Ce protocole a permis de récolter 30 kg de graines de tournesol marquées à l'azote 15.

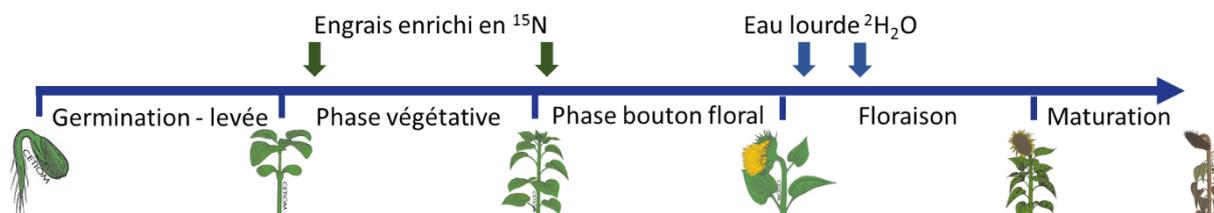


Figure 12. Protocole de marquage pour l'étude en plein champs.

Les graines récoltées ont ensuite été nettoyées *via* un tamis, décortiquées, pressées, et l'huile en a été extraite par Olead à Pessac. Le décorticage s'est fait par deux passages sur un impacteur (5000 rpm). Les amandes ont été pressées sur une presse à vis avant extraction de l'huile par lavages successifs à l'hexane (4 lavages de 10 min à 47-53°C). Ces étapes ont permis d'obtenir 390 g de tourteaux de tournesol pour la 1^{ère} étude et une dizaine de kg pour la seconde.

L'extraction des protéines de tournesol du tourteau a été réalisée au LRGP (CNRS, Université de Lorraine) à Nancy selon des conditions d'extraction préalablement optimisées (18). Le tourteau était placé dans une cuve de mélange de 5 L à 600 rpm, pendant 60 min, à pH 7 et à température ambiante. Le pH était ajusté avec du NaOH 1M et le ratio solide/liquide était de 1/9. Le mélange était ensuite centrifugé à 15000 g pendant 30 minutes. Le surnageant était d'abord microfiltré sur une membrane de 0,22 µm avant d'être diafiltré à travers une membrane de cellulose (3 kDa), avec 6 diavolumes de NaCl 0,5M puis 4 diavolumes d'eau déminéralisée. Entre les diavolumes de NaCl et d'eau, le pH avait été ajusté à 9 avec du NaOH 1M. Les protéines obtenues ont ensuite été lyophilisées. Après ces étapes, il a été obtenu environ 100 g d'isolat pour les études animales et environ 500 g pour l'étude clinique.

L'enrichissement global en ^2H de l'isolat 1 est 0,12 atome pourcent (AT%) soit 8 fois l'enrichissement naturel et celui en ^{15}N est 1,06 AT% soit 2,9 fois l'enrichissement naturel. L'enrichissement des acides aminés en ^2H (**Figure 13A**) est hétérogène et varie de 2,3 à 6,9 fois l'enrichissement naturel alors que celui en ^{15}N (**Figure 13B**) est homogène. L'enrichissement global de l'isolat 2 en ^{15}N est 0,81 AT% soit 2,2 fois l'enrichissement naturel. L'enrichissement de ces acides aminés est aussi homogène, mais 1,6 fois plus faible que dans la première culture. Mais tous ces enrichissements sont suffisants pour étudier *in vivo* le devenir des protéines alimentaires

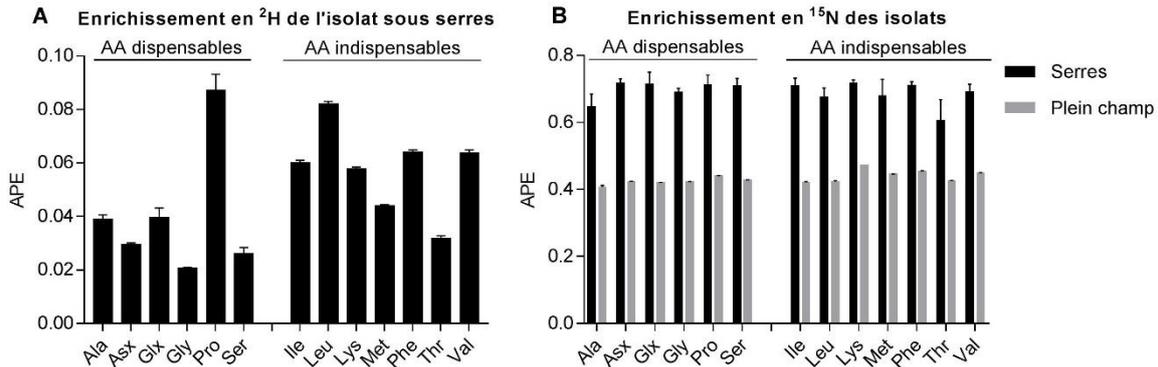


Figure 13. (A) Enrichissement en ^2H des acides aminés de l'isolat de tournesol produit en serres. (B) Enrichissement en ^{15}N des acides aminés des deux isolats de tournesol, produits en serres et en plein champ. Les enrichissements sont exprimés en excès d'atome pourcent (APE).

A partir de l'isolat produit en plein champ, FoodInnov (Rennes) a formulé des biscuits hyperprotéinés. Ces biscuits contiennent l'isolat (17,2%) comme source principale de protéine afin que la dose complète de biscuits donnée aux volontaires corresponde à 20,7 g de protéine de tournesol. Ils contiennent aussi du gluten provenant de la farine de blé (31,4%) nécessaire à la formulation.

2.2. Principe de la digestibilité des protéines et acides aminés chez le rat

Chez le rat, la digestibilité des protéines peut être mesurée au niveau fécal ou caecal (Chapitre I - section 2.2.1) et la digestibilité des acides aminés peut être mesurée au niveau caecal, à défaut d'avoir suffisamment de contenu iléal et une méthode standardisée. Pendant une semaine les animaux sont habitués à consommer un petit repas de 4 g afin qu'ils ingèrent rapidement le repas contenant les protéines marquées le jour de l'euthanasie. Le principe est de récupérer les contenus digestifs luminaux, six heures après l'ingestion de ce repas test. Les contenus de l'estomac, de l'intestin grêle, de l'iléon, du caecum et du côlon sont récupérés intégralement. On considère l'iléon comme étant les dix derniers centimètres de l'intestin grêle malgré le fait que l'iléon soit probablement plus petit chez le rat (195). Les fèces sont récupérées pendant les six heures suivant l'ingestion du repas testé et poolées avec le contenu colique. Pour la digestibilité des protéines, les contenus digestifs sont analysés pour déterminer leur enrichissement isotopique et leur pourcentage d'azote. Cela permet de quantifier l'azote

provenant des protéines alimentaires non absorbées et donc de déterminer la quantité qui a été absorbée. Pour la digestibilité caecale des acides aminés, selon le même principe que pour les protéines, il faut quantifier dans le caecum la quantité de chaque acide aminé individuel ainsi que leurs enrichissements isotopiques. Ces mesures sont précédées d'étapes d'hydrolyse acide, pour séparer les protéines en acides aminés, et d'isolation des acides aminés sur résine chargée pour la mesure de l'enrichissement isotopique (**Articles 1, 2, 3**).

2.3. Principe de la digestibilité iléale et de la méthode double traceur chez l'Homme

2.3.1. Mesure de la digestibilité iléale avec une sonde naso-iléale

Le principe de la mesure iléale de la digestibilité avec une sonde naso-iléale est de récupérer la fraction de protéines et acides aminés non absorbée dans l'iléon terminal pour en déduire la fraction absorbée. Le protocole a déjà été utilisé pour de nombreuses études depuis 30 ans dans l'unité (54,94,95,97,98,126,196). Les sondes sont composées de plusieurs tubulures en PVC (**Figure 14A**). La tubulure 1 comporte dans sa partie terminale un manchon percé qui permet le recueil des effluents, qui peuvent s'écouler spontanément ou être aspirés par une seringue. La tubulure 2 arrive 20 cm en amont de la zone de recueil et sert à la perfusion d'un marqueur non absorbable (voir plus loin). La tubulure 3 permet de gonfler ou dégonfler le ballonnet contenant le lest. Ce ballonnet est composé de deux enveloppes de latex dont une contient du mercure métallique comme lest. Les sondes mesurent 3,1 m (**Figure 14B**) et en moyenne la longueur d'intubation était de 1,9 m.

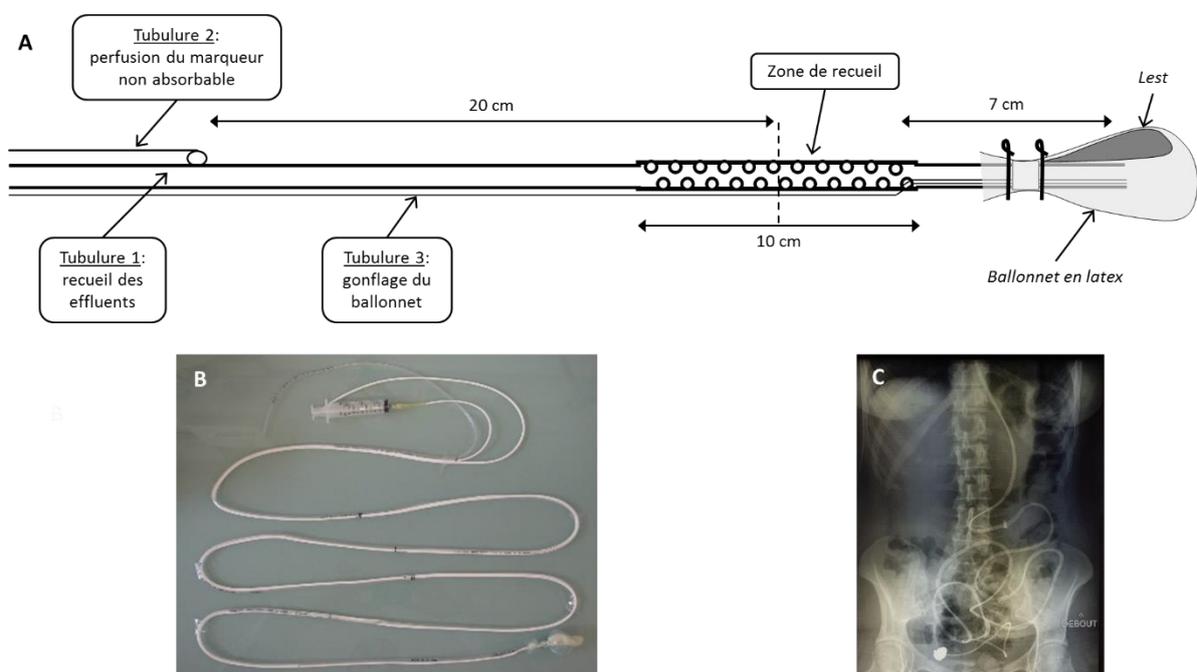


Figure 14. (A) Schéma de l'extrémité de la sonde naso-iléale. (B) Photographie d'une sonde naso-iléale entière. (C) Radiographie de la sonde naso-iléale au niveau de l'iléon terminal.

La sonde est introduite la veille de l'expérimentation et va migrer à travers l'estomac et l'intestin grêle jusque l'iléon terminal, par péristaltisme et grâce au ballonnet gonflable. La position de la sonde est vérifiée par radiographie le matin de l'expérimentation (**Figure 14C**).

Les flux digestifs sont déterminés par mesure d'un marqueur non absorbable, le polyéthylène glycol 4000 (PEG), dans l'iléon. Celui-ci est perfusé à un débit constant dans l'intestin, 20 cm en amont de la zone de recueil, et récupéré plus bas. Le débit iléal peut être estimé par dilution du marqueur dans les effluents après mesure par turbidimétrie (197). La digestibilité iléale réelle des protéines est calculée à partir du débit iléal, du pourcentage d'azote et de l'enrichissement en ^{15}N dans les contenus digestifs (**Article 4**). Comme pour les protéines, la digestibilité iléale des acides aminés est déterminée à partir des débits iléaux, de la quantification des acides aminés dans la protéine et dans les effluents et de l'enrichissement des acides aminés individuels en ^{15}N dans l'iléon et dans la protéine.

2.3.2.Méthode double traceur

Le principe de la méthode double traceur a été développé dans la section 2.2.2.3 (Chapitre I). Dans le cadre de notre étude clinique, nous avons choisi comme traceur de référence un mélange d'acides aminés libre d'origine algale et marqués au ^{13}C . Ce choix a été fait après réflexion sur la pertinence d'utiliser la spiruline, qui présente a priori une digestibilité modeste alors qu'un mélange d'acides aminés libres est en théorie 100% digestible. Une partie de mes travaux a consisté à évaluer l'utilisation de la spiruline comme protéine de référence. Par ailleurs, les lots de spiruline pouvant avoir une composition variable et une teneur élevée en endotoxines (données du fabricant), nous avons préféré utiliser un traceur de référence plus compatible avec les exigences de l'étude clinique. Enfin, une de nos réserves par rapport à la méthode utilisant la spiruline est que la digestibilité de la spiruline, qui sert de référence, est au départ évaluée par rapport à un mélange d'acides aminés libres, dans un groupe de sujets indépendants. Les valeurs obtenues dans ce groupe servent de référence pour toutes les études. Il s'agit à notre avis d'une étape intermédiaire qui rajoute de l'incertitude. Le choix des acides aminés libres pose cependant des problèmes méthodologiques. Notamment, l'ajout d'acides aminés libres était incompatible avec la cuisson des biscuits, ce mélange a été incorporé dans des chocolats donnés en parallèle des biscuits. Le chocolat apportant beaucoup d'énergie ainsi que des polyphénols, nous avons aussi testé un autre vecteur, qui est de la compote de pommes. Pour éviter un déphasage entre les deux aliments et afin d'obtenir un plateau isotopique, les repas ont été divisés et espacés d'une demi-heure. Ils s'étalaient ainsi sur 4 h sur les 8 h que dure l'expérimentation. Le sang a été prélevé toutes les demi-heures pendant 4 h puis toutes les heures. L'enrichissement des acides aminés dans le plasma est mesuré pour le ^{15}N et le ^{13}C à tous les points de la cinétique. Les acides aminés plasmatiques sont isolés par contact avec une résine échangeuse d'ions et élution au NH_4OH . Après séchage, ils sont dérivés chimiquement à l'éthylchloroformate (198). Il existe deux façons d'analyser les cinétiques isotopiques : prendre une moyenne des enrichissements sur les plateaux des deux courbes (185), à condition d'obtenir des plateaux isotopiques concomitants (**Figure 15**), ou utiliser l'aire sous la courbe de la cinétique entière (42).

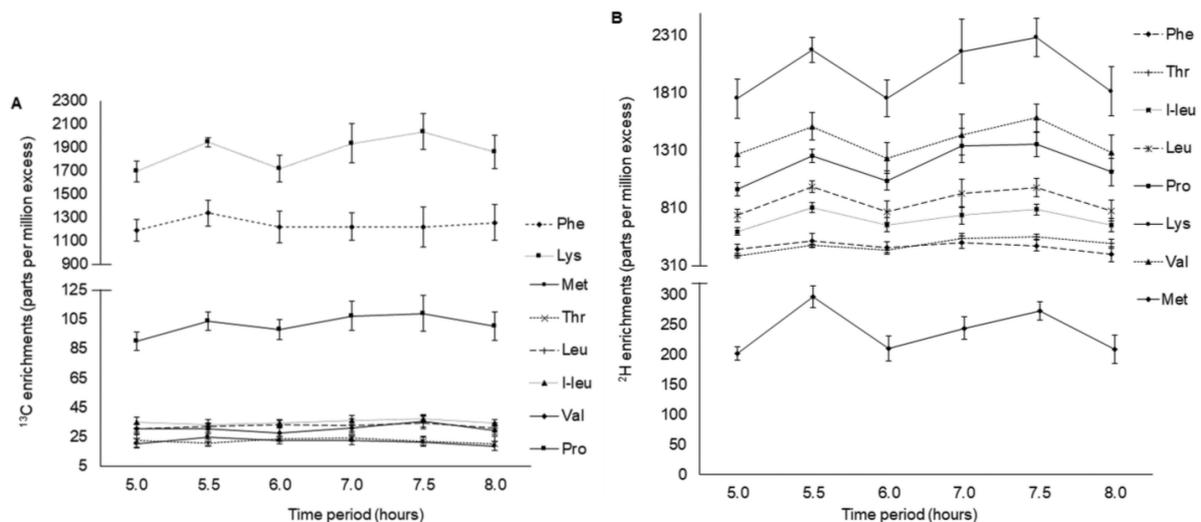


Figure 15. Plateaux isotopiques plasmatiques obtenus par Devi *et al.* (A) Enrichissement en ¹³C des acides aminés indispensables provenant de la spiruline. (B) Enrichissement en ²H des acides aminés indispensables provenant de légumes. Les enrichissements sont exprimés en excès de part par millions. D'après (185).

2.3.3. Etude du métabolisme postprandial de l'azote alimentaire

Une fois l'azote alimentaire absorbé par l'intestin, il est possible de suivre le devenir de l'azote dans les différents pools azotés. Ainsi l'azote ¹⁵N peut être mesuré dans le plasma, dans les pools d'acides aminés libres, de protéines plasmatiques, et d'urée plasmatique, et dans l'urée urinaire. L'urée plasmatique et l'urée urinaire correspondent aux pools de désamination issus de la dégradation des protéines alimentaires. Pour doser le ¹⁵N dans ces différents pools, du sang et de l'urine sont prélevés au cours du protocole. Ces données permettent de mesurer l'utilisation post prandiale nette des protéines (chapitre I - section [1.3.2.2](#)).

2.4. Méthodes analytiques

2.4.1. EA-IRMS

La mesure des pourcentages d'azote et de carbone des échantillons se fait par un analyseur élémentaire (EA pour « elemental analyzer » en anglais). Couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS pour « isotope-ratio mass spectrometry » en anglais), il permet aussi de mesurer l'enrichissement en ¹⁵N et ¹³C dans l'échantillon. Cet appareil a été utilisé pour les mesures dans les effluents iléaux, dans les fractions plasmatiques (urée, acides aminés libres, protéines) et dans l'urée urinaire. Les échantillons sont placés dans des capsules en étain fermées. Les échantillons solides, préalablement lyophilisés, doivent être précisément pesés sur une balance de précision alors que les échantillons liquides n'ont pas besoin de l'être. La capsule subit une combustion à 950°C en présence d'un catalyseur chimique (l'oxyde de cuivre), ce qui libère des oxydes d'azote (NO, NO₂, NO₃), du CO₂ et du H₂O (**Figure 16**). Le tube de combustion fixe les autres éléments non utiles. Les oxydes d'azote sont ensuite réduits en azote élémentaire en passant au travers d'un tube de réduction contenant du cuivre métallique et chauffé à 650°C. L'eau restante va ensuite être piégée dans un tube contenant du Sicapent,

un déshydratant (pentoxyde de phosphore). Il est aussi possible de mesurer uniquement le pourcentage d'azote et l'enrichissement en ^{15}N en rajoutant un piège à CO_2 avant le piège à H_2O . Ce piège contient de l'ascarite, qui est de l'hydroxyde de sodium recouverte de silice. Les gaz restants sont ensuite quantifiés sur un catharomètre (TCD pour « thermal conductivity detector ») et comparés aux gaz de référence (N_2 et le CO_2). Les valeurs données par l'appareil sont ensuite recalculées à partir de l'atropine, un standard élémentaire externe dont les pourcentages d'azote et de carbone sont connus.

Le gaz est ensuite amené à l'IRMS qui va permettre la mesure des rapports $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Le N_2 et le CO_2 sont ionisés par impact électronique ($\text{M} + \text{e}^- \rightarrow \text{M}^+ + 2\text{e}^-$) dans la source d'ionisation pour former des ions à m/z 28, 29 et 30 pour N_2 et m/z 44, 45 et 46 pour le CO_2 . Les ions formés vont être accélérés et séparés par un champ magnétique en fonction de leur masse et charge pour frapper des détecteurs correspondant à chaque ion. L'intensité du signal correspond au nombre d'ions ayant atteint chaque détecteur. Les rapports $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sont calculés à partir des rapports d'intensité et la valeur de $\delta^{15}\text{N}$ et $\delta^{13}\text{C}$ sera calculée par le logiciel intégré. Les deltas pour mille (δ) correspondent respectivement à :

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{\left(\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{échantillon} - \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{référence} \right)}{\frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \text{référence}} \times 1000$$

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{échantillon} - \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{référence} \right)}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{référence}} \times 1000$$

Les valeurs de référence sont celles des gaz de référence : N_2 et CO_2 . Les résultats sont ensuite recalculés par rapport aux valeurs de l'acide glutamique, un standard isotopique externe.

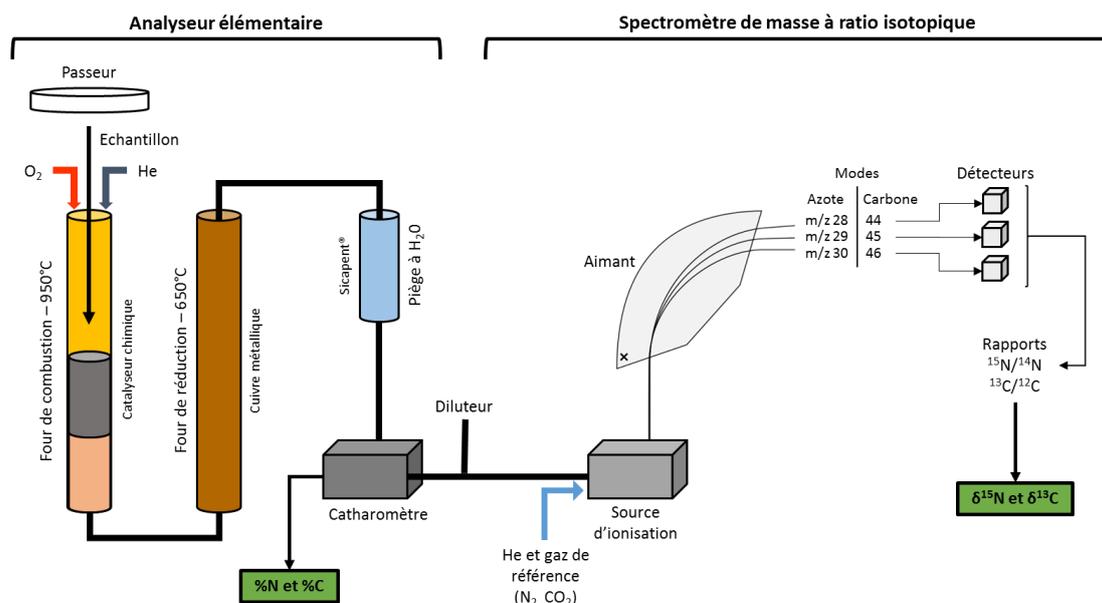


Figure 16. Schéma simplifié du fonctionnement de l'EA-IRMS.

Les résultats sont finalement exprimés en atome pourcent (AT%) qui représente dans l'échantillon le pourcentage de l'isotope stable sur l'ensemble des atomes. Par exemple, le pourcentage de ^{15}N d'un échantillon sur l'ensemble des atomes de N de cet échantillon. La formule permettant cette transformation est la suivante :

$$\text{Enrichissement (AT\%)} = \delta_{\text{référence}} \times \frac{\left(1 + \frac{\delta_{\text{échantillon}}}{1000}\right)}{1 + \left(\delta_{\text{référence}} \times \left(1 + \frac{\delta_{\text{échantillon}}}{1000}\right)\right)} \times 100$$

Avec $\delta_{\text{référence}}$, le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans l'atmosphère et la norme $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la Pee Dee Belemnite (PDB).

2.4.2. GC-C-IRMS

Pour l'analyse des enrichissements des acides aminés, l'IRMS est couplé en amont à une chromatographie à phase gazeuse (GC pour « gas chromatography ») et à une interface contenant le four à combustion (**Figure 17**). Avant cela les effluents iléaux et les échantillons plasmatiques ont subi différentes étapes de préparation. Pour les effluents, les protéines ont été soumises à une hydrolyse acide à l'HCl 6M à 110°C pendant 24 h et avec ajout de N_2 pour éviter l'oxydation des acides aminés par l' O_2 de l'air. Ensuite les acides aminés de tous les échantillons ont été isolés sur résine échangeuse d'ion conditionnée sous forme H^+ avant d'être dérivés pour être rendus volatils. Contrairement à l'EA-IRMS, le GC-C-IRMS ne pouvant pas procéder aux analyses de l'azote et du carbone en même temps, il est nécessaire de passer les échantillons dans les deux modes dont les conditions analytiques diffèrent. En fonction de la concentration en acides aminés des échantillons, l'injection peut se faire avec une dilution, en mode « split », qui permettra de moduler l'intensité des pics. Plus la dilution est importante meilleure sera la résolution. Au contraire, en mode « splitless », sans division, les pics sont de plus haute intensité mais plus larges, ce qui favorise les co-élutions et conduit à une déformation des pics. Après injection, la séparation se fait sur une colonne capillaire ayant une phase stationnaire moyennement polaire (Restek RXi 17, longueur 30 m, diamètre intérieur 0,25 μm , épaisseur du film 0,5 μm). La colonne est soumise au programme de température suivant : la température de départ est de 150°C, elle va augmenter de 4°C/min pour atteindre 200°C puis de 25°C/min pour atteindre 270°C. La température est maintenue à 270°C pendant 10 minutes. Le passage dans la colonne va permettre de séparer les acides aminés dérivés selon leur affinité pour la phase stationnaire. Les composés sont ensuite dirigés vers le four de combustion qui va permettre leur conversion totale en gaz analysables. Ce passage entre la colonne et le four de combustion se fait *via* l'interface chauffée à 350°C. A la suite, se trouve le four de combustion chauffé à 950°C pour l'analyse de l'azote et 850°C pour l'analyse du carbone. Le four de combustion, contenant un catalyseur chimique, permet comme pour l'EA-IRMS de transformer les composants en CO_2 , NO_x et H_2O et de les réduire ensuite. L'élimination de l'eau se fait par le passage de la membrane Nafion. En mode azote, le piège cryogénique (azote liquide) permet d'éliminer les polluants résiduels, notamment le CO_2 et le NO. Les

échantillons passent ensuite dans l'IRMS dont le principe a déjà été détaillé plus haut (section II.2.4.1).

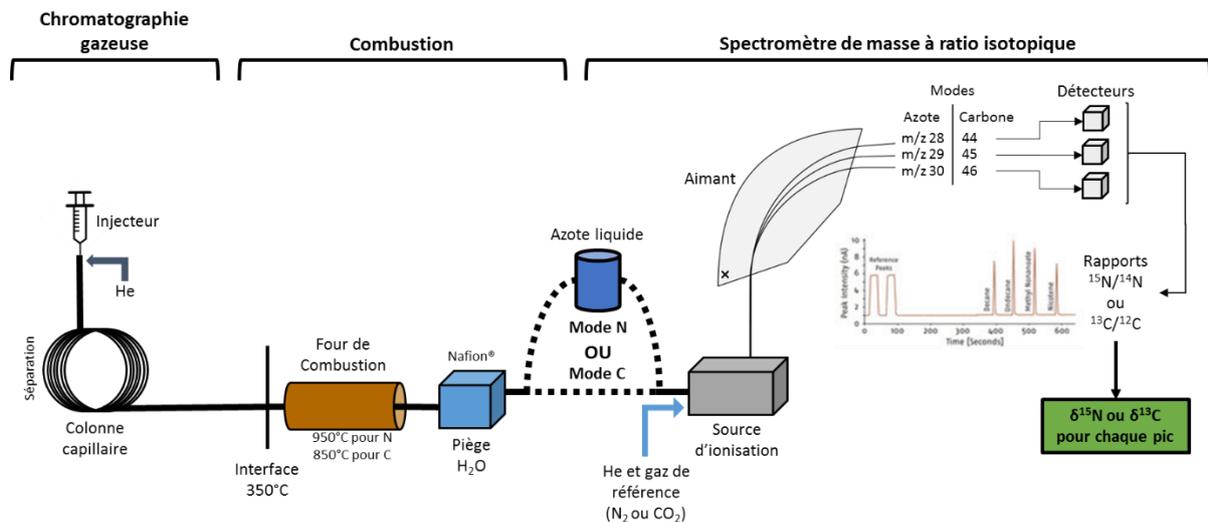


Figure 17. Schéma simplifié du fonctionnement d'un GC-C-IRMS.

Le résultat produit est un chromatogramme du courant ionique (**Figure 18**) où chaque acide aminé est détecté sous la forme d'un pic. L'identification des acides aminés a été faite en se basant sur les temps de rétention de chaque acide aminé injecté individuellement. Mais le temps de rétention peut varier légèrement en fonction du mode, ou de l'installation de la colonne et du four. Avec cette méthode, 18 acides aminés sont détectables, mais certains sont dégradés suite à l'hydrolyse acide, notamment la cystéine et le tryptophane (199). De plus, l'asparagine et la glutamine sont désaminés et transformés en acide aspartique et acide glutamique pendant l'hydrolyse, ainsi les pics correspondant sont la somme des deux. L'histidine est trop peu concentrée dans les protéines et n'est pas détectable. Un standard isotopique, de la caféine, est injecté en début et en fin d'analyse afin de vérifier la précision analytique de l'instrument et la répétabilité des mesures.

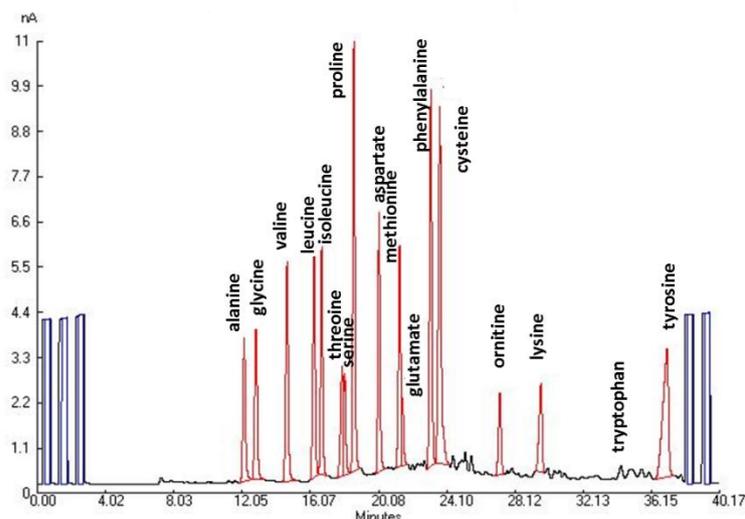


Figure 18. Exemple de chromatogramme des acides aminés analysés par GC-C-IRMS en mode carbone. L'intensité du signal est en nA.

L'intensité des pics est proportionnelle au nombre d'atomes présents dans la molécule. Ainsi, en mode C, les pics sont plus intenses et cela est dû au nombre important d'atomes de carbone présents dans la molécule. Par contre, les acides aminés contiennent seulement 1 (ou 2) atomes d'azote, par conséquent, le signal observé est plus faible. Afin de compenser, il est nécessaire d'injecter l'échantillon 10 fois plus concentré que pour le mode C (et en mode splitless). Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la colonne ayant la phase stationnaire plus épaisse (0,5 µm), ce qui permet d'augmenter la capacité de rétention de la colonne et d'injecter des échantillons plus concentrés. Dans les échantillons plasmatiques, plusieurs pics non-identifiés sont présents en plus des pics d'intérêt, ce qui rend l'interprétation des chromatogrammes plus délicate. Les échantillons des effluents, ayant subi l'hydrolyse, contiennent seulement les pics d'intérêt et sont plus simples à interpréter. Il convient de noter que les méthodes d'analyse d'enrichissement des acides aminés dans les trois isotopes, ^{13}C , ^{15}N et ^2H , ont fait l'objet d'un développement et de nombreux tests en amont de ce travail de thèse (extraction des acides aminés à partir de l'échantillon, choix de la dérivation, choix de la phase stationnaire de la colonne). Plusieurs techniques de préparation d'échantillons et de dérivations ont notamment été testées.

2.4.3. UHPLC

La quantification des acides aminés se fait par chromatographie liquide à ultra haute pression/performance (UHPLC pour « ultra high pressure liquid chromatography »). Cet appareil reprend le principe de l'HPLC, mais en améliorant la vitesse d'analyse, la sensibilité et la résolution des pics.

Le dosage des acides aminés des protéines requiert une étape d'hydrolyse acide dans les mêmes conditions que pour le GC-C-IRMS mais avec des quantités précises d'échantillons. L'hydrolysate est séché puis re-suspendu dans l'eau avant de pouvoir être dérivé. Les échantillons de plasma sont précipités à l'acide sulfosalicylique 10% et centrifugés, et la fraction de surnageant contenant les acides aminés libres est récupérée. En parallèle, une gamme standard de trois points est préparée, elle est composée d'un mélange d'acides aminés de concentration connue (Waters) auquel on ajoute la norvaline qui servira de standard interne. Dans le cas des échantillons de plasma, l'asparagine, la glutamine et le tryptophane sont ajoutés dans les standards, ces acides aminés étant dégradés lors d'une hydrolyse acide. Enfin les échantillons sont dérivés en utilisant un kit fourni par le constructeur de l'appareil (kit AccQ Tag Ultra Waters) contenant un réactif et un tampon. Le réactif est du 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) qui permet d'obtenir un dérivé fluorescent de l'acide aminé et donc sa détection (**Figure 19**). Il est ajouté en excès, et une fois tous les acides aminés dérivés, il va former à partir de l'eau résiduelle un composé non-interfèrent la 6-aminoquinoline (AMQ) qui sera présent en début de chromatogramme. La réaction de dérivation produit aussi du CO_2 et un autre composé N-hydroxysuccinimide (NHS) qui n'interfèrent pas avec l'analyse.

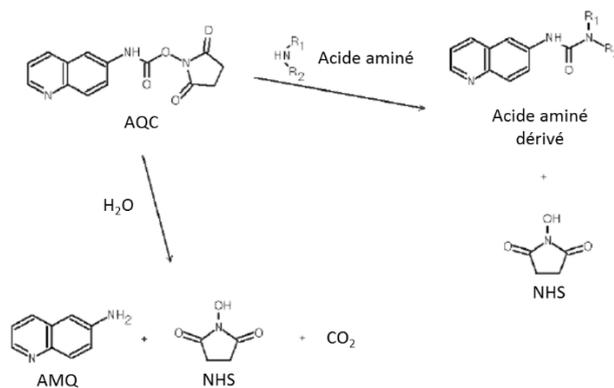


Figure 19. Principe de la réaction de dérivation des acides aminés. AMQ : 6-aminoquinoline. AQC : 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. NHS : N-hydroxysuccinimide. D'après (200).

De plus, un standard interne de concentration connue est ajouté au moment de l'hydrolyse pour les échantillons secs et de la précipitation pour le plasma. Ce standard interne servira à corriger les quantités d'acides aminés après analyse. La norvaline a été choisie car c'est un acide aminé non protéinogène et qui ne coélué avec aucun des autres acides aminés. Un standard externe est aussi utilisé pour déterminer le rendement de l'hydrolyse, l'albumine de sérum bovin dont la composition en acides aminés est connue. Ce standard est préparé en double dans des tubes séparés pour chaque hydrolyse et il subit les mêmes étapes que les échantillons secs.

L'appareil d'UHPLC est composé de plusieurs modules (**Figure 20**). Le premier est le module FTN (pour "flow through needle") qui contient l'aiguille, le passeur d'échantillons et le système d'injection maintenu à 20°C. Le second module contient les pompes (QSM pour « quaternary solvent manager ») qui vont programmer les pressions dans la colonne ainsi que les gradients de solvants parcourant le système. Le troisième élément est la colonne (AcQ-Tag amino acid C18 column, Waters) chauffée à 43°C. Le dernier module est le détecteur à barrette de diodes (PDA pour « photodiode array detector ») qui va permettre la détection des acides aminés. L'appareil utilise trois solutions pour les gradients, un éluant A (Waters), un mélange d'acétonitrile (98%) et d'acide formique (2%) et de l'eau ultra pure. A cela s'ajoute de l'acétonitrile qui va permettre le nettoyage et le conditionnement du système, un solvant qui va permettre l'injection de l'échantillon et le nettoyage des têtes de pompes (10% acétonitrile et 90% eau ultra pure) et un solvant qui va nettoyer l'aiguille après injection (90% acétonitrile et 10% eau ultra pure). Ces voies sont activées par le QSM et vont rejoindre l'échantillon injecté. L'échantillon va traverser la colonne et les acides aminés dérivés dans la phase mobile vont être séparés selon leur affinité à la phase stationnaire. Enfin, l'échantillon va traverser le détecteur à ultraviolet, et les acides aminés vont être détectés à une longueur d'onde de 260 nm. L'analyse d'un échantillon prend 12 minutes.

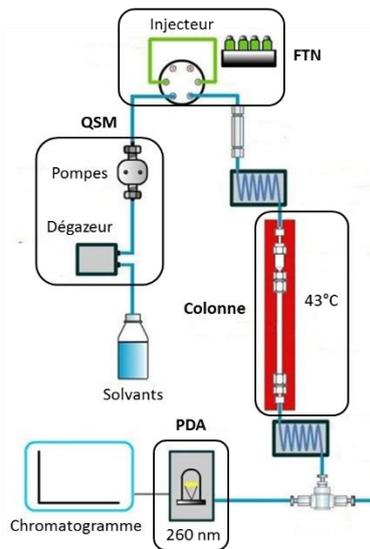


Figure 20. Schéma de fonctionnement d'un UHPLC. QSM : module des pompes, FTN : module de l'injecteur et du passeur d'échantillon, PDA : détecteur à barrettes de diodes. Adapté de CHROMacademy (www.chromacademy.com)

Un chromatogramme est obtenu (**Figure 21**). A partir des aires sous courbes des pics de la gamme standard, la concentration de chaque acide aminé va être déterminée. La concentration dans l'échantillon « original » va ensuite être calculée à partir des dilutions effectuées pendant les étapes de préparation des échantillons et de la concentration de la norvaline dans l'échantillon. Enfin, une correction va être appliquée à chaque acide aminé pour tenir compte du rendement d'hydrolyse obtenu à partir de l'analyse des albumines de sérum bovin.

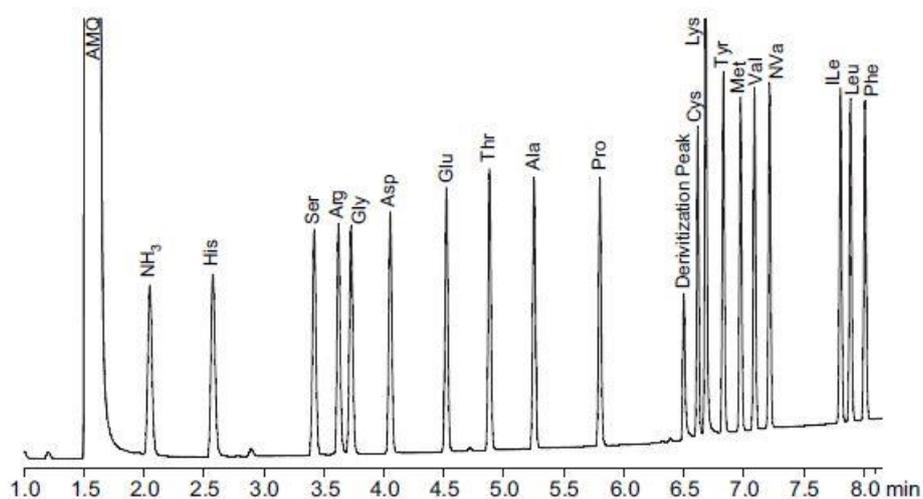


Figure 21. Exemple de chromatogramme présentant tous les acides aminés d'un échantillon analysé par UHPLC. D'après Waters.

3. Articles

- 3.1. Article 1 : Le marquage intrinsèque au ^{15}N et ^2H montre que, chez le rat, la digestibilité réelle des protéines et acides aminés d'un isolat de tournesol est presque aussi élevée que celle du lactosérum

Article publié dans « Journal of Nutrition » le 11 décembre 2019. (201)

Résumé

Introduction :

La production d'isolat de tournesol est récente et il n'existe aucune étude sur la qualité protéique d'un tel produit. De plus l'utilisation du deutérium est recommandée par la FAO pour le marquage des protéines étudiées avec la méthode double traceur. Afin de valider ce marqueur, nous avons doublement marqué un isolat de tournesol et du lactosérum de chèvre au ^{15}N et au ^2H . Le double marquage de protéines animales et végétales étant encore inédit. L'objectif de cette première étude pilote était de comparer la digestibilité réelle d'un isolat de tournesol à celle du lactosérum de chèvre dans un modèle de rat. Nous avons aussi étudié l'efficacité des marquages intrinsèques au ^{15}N et ^2H dans cette évaluation.

Méthodes :

Les graines de tournesol ont été marquées en serre à l'azote ^{15}N et au deutérium par apport d'ammonionitrate ^{15}N et arrosage à l'eau deutérée. Après extraction de l'huile et décorticage les protéines ont été purifiées pour obtenir un isolat protéique. Le lait de chèvre a été marqué par administration orale d'eau deutérée et de sulfate d'ammonium ^{15}N . Les protéines de lactosérum ont été purifiées par ultrafiltration. Des rats mâles Wistar, âgés de 10 semaines, ont été nourris avec un repas contenant 12% d'isolat de tournesol (n = 8) ou de lactosérum de chèvre (n = 8). Six heures après l'ingestion du repas, les digestibilités des protéines et acides aminés ont été déterminés par mesure de l'azote et de l'hydrogène par EA, des acides aminés dans les contenus digestifs par UHPLC, ainsi que par la mesure des enrichissements globaux et des acides aminés par EA-IRMS et GC-C-IRMS. Le DIAAS a été déterminé pour les deux protéines et les deux marquages. Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes associées à l'erreur standard. Les différences entre groupes et isotopes étaient testées respectivement avec des t-test non-appariés et appariés.

Résultats :

La pureté de l'isolat était de 87% pour le lactosérum et 94% pour le tournesol. Les enrichissements en ^2H et ^{15}N étaient respectivement de 0,12 atom % (AT%) et 1,06 AT% pour l'isolat de tournesol, et 0,18 AT% et 0,95 AT% pour le lactosérum. L'enrichissement était suffisant pour le suivi *in vivo* des protéines et acides aminés marqués. La digestibilité fécale ^{15}N des protéines était de $97,2 \pm 0,2\%$ pour le lactosérum et de $95,1 \pm 0,5\%$ pour l'isolat de tournesol. La digestibilité était plus faible pour le ^2H comparé au ^{15}N pour le lactosérum ($96,9 \pm 0,2\%$, $P < 0,05$) et l'isolat de tournesol ($94,2 \pm 0,5\%$, $P < 0,01$). Pour les deux isotopes, la digestibilité était supérieure d'environ 2% pour le lactosérum comparé à l'isolat de tournesol. La digestibilité moyenne des acides aminés avec le ^{15}N était de $97,5 \pm 0,2\%$ pour le lactosérum et $96,3 \pm 0,2\%$ pour l'isolat de tournesol. Les valeurs obtenues avec le ^{15}N et le ^2H étaient statistiquement différentes avec des écarts allant de - 0,1% à 3,5%. Le DIAAS était supérieur à 1,0 pour le lactosérum et égal à 0,84 pour l'isolat de tournesol (lysine).

Conclusions :

Les digestibilités des protéines et acides aminés de l'isolat de tournesol étaient presque aussi élevées que celles du lactosérum de chèvre, mais son DIAAS montrait un déséquilibre en lysine. Malgré de légères différences avec le ^{15}N , le ^2H produit des résultats comparables, le rendant utilisable pour des études de digestion *in vivo*.

Protein or amino acid real digestibility of sunflower protein isolate intrinsically labeled with ¹⁵N or ²H is almost as high as goat whey in rats

Romain Tessier¹, Nadezda Khodorova¹, Juliane Calvez¹, Romain Kapel², Alain Quinsac³, Julien Piedcoq¹, Daniel Tomé¹, Claire Gaudichon¹

¹ PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, Paris

² LRGP, UMR CNRS 7274, Université de Lorraine, Plateforme SVS, Vandoeuvre-les-Nancy

³ Terres Inovia, 1 avenue Lucien Brétignières, Thiverval-Grignon, France

Corresponding author:

Claire Gaudichon, Ph.D.

Mailing address: INRA-AgroParisTech UMR914 PNCA, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Email: claire.gaudichon@agroparistech.fr

Phone: 33 1 44 08 18 29

Fax: 33 1 44 08 18 56

Sources of support: French research Agency, Faso (Fund for oleaginous and protein crops).

Word count: 3829 words

Conflict of interest and funding disclosure: The authors declare no conflict of interest

Daniel Tomé is an editor on the Journal of Nutrition and played no role in the journal's evaluation of the manuscript.

Number of figures: 2

Number of tables: 3

Supplementary data: 1 figure, 1 table

Running title: Sunflower and milk protein digestibility in rats

Abbreviations: AA: amino acids; Asx: aspartate and asparagine; AP: atom percent, DIAAS: digestible indispensable amino acid score; DM: dry matter; GC: gas chromatography; Glx: glutamate and glutamine; IAA: indispensable amino acids; IRMS: isotope-ratio mass spectrometry; UPLC: Ultra performance liquid chromatography

1 **Abstract**

2 **Background:**

3 In the context of developing plant protein sources for humans, sunflower is a good candidate
4 in its form as an oilseed coproduct.

5 **Objective:**

6 We aimed to compare the real digestibility of a sunflower isolate to goat whey protein in rats.
7 We also studied the efficiency of ¹⁵N and ²H intrinsic labelling in this assessment.

8 **Methods:**

9 Sunflower seeds and goat milk were labelled with ¹⁵N and ²H. Male Wistar rats (10 wk old)
10 were fed a meal containing 12 % of either sunflower isolate (n=8) or whey (n=8). Six hours
11 after meal ingestion, protein and amino acid digestibility were assessed by measuring nitrogen,
12 hydrogen and amino acids in the digesta, as well as isotope enrichments in the bulk and
13 individual amino acids. The differences between groups and isotopes were respectively tested
14 with an unpaired and a paired t-test.

15 **Results:**

16 Protein isolate purity was 87% for whey and 94% for sunflower. ²H and ¹⁵N enrichments were,
17 respectively, 0.12 atom percent (AP) and 1.06AP in sunflower isolate and 0.18AP and 0.95AP
18 in whey. Fecal ¹⁵N protein digestibility was 97.2±0.2% for whey and 95.1±0.5% for sunflower
19 isolate. The use of ²H resulted in a lower digestibility estimate than ¹⁵N for whey (96.9±0.2%,
20 P<0.05) and sunflower (94.2±0.5%, P<0.01). For both isotopes, protein digestibility was about
21 2% higher for whey than for sunflower isolate. Mean ¹⁵N amino acid caecal digestibility was
22 97.5±0.2% for whey and 96.3±0.2% for sunflower isolate. The values obtained with ¹⁵N and ²H
23 resulted in significant differences ranging from -0.1% to 3.5%. The DIAAS was higher than 1.0
24 for whey and 0.84 for sunflower (lysine).

25 **Conclusion:**

26 The protein and amino acid digestibility of sunflower isolate was high but its DIAAS reflected
27 the moderate lysine imbalance. Despite slight differences with ¹⁵N, deuterium produced
28 comparable results, making it suitable for *in vivo* digestion studies.

29 **Keywords:** Protein quality – DIAAS – Stable Isotopes - Oilseeds

30 **Introduction**

31 The increasing global population has led to an increase in protein demand that animal protein
32 sources alone cannot satisfy due to health and environmental concerns. In the evaluation of
33 alternative plant protein sources, sunflower seeds, which are relatively little-consumed in the
34 human diet, could be a promising candidate as they contain about 20% protein (1). Moreover,
35 sunflower cultivation for oil production represented 26.5 Mha in the world in 2017 (2), and
36 oilcakes, which are the coproducts of oil extraction, are rich in proteins. However, the extraction
37 and purification of these proteins is challenging. There are currently no affordable sunflower
38 protein isolates on the market for human consumption.

39 Protein quality can be defined as the capacity to satisfy indispensable amino acid
40 requirements, which mainly depends on the amino acid composition as well as their
41 bioavailability (3). Sunflower seeds show a relatively well-balanced amino acid profile despite
42 a slightly limiting lysine content (4–6). After oil extraction, sunflower oil cakes are typically fed
43 to livestock. Bioavailability studies performed in pigs with sunflower oil cake or seeds (6–10)
44 reported standardized ileal protein digestibility ranging from 72.6% (6) to 82.7% (9). In contrast,
45 there are no studies yet on sunflower protein isolate digestibility for use in human diets.

46 The ^{15}N labelling of dietary protein allows precise measurement of *in vivo* digestibility (11–13).
47 A low invasive method, the dual isotope tracer method, has recently been developed to
48 measure amino acid digestibility (14–16). It involves labelling the test protein with ^2H , which is
49 less lost through deamination than ^{15}N . However, there is no data on the performance of ^2H
50 compared to ^{15}N regarding measurement of amino acid digestibility from digesta.

51 This study aims to quantify protein and amino acid digestibility of sunflower protein isolate,
52 comparing it to whey protein as a standard. Another objective is to develop and validate the
53 use of deuterium labelling in dietary protein digestibility studies. For this purpose, sunflower
54 seeds and goat milk were labelled with ^{15}N and ^2H stable isotopes. The proteins were extracted
55 and purified and were then used in rats to determine their real caecal digestibility.

56 **Materials and methods**

57 **Protein labelling and extraction**

58 Stable isotopes were purchased from Eurisotop (Saint-Aubin, France). Sunflower labelling was
59 performed in a greenhouse, in pots, by Terres Inovia (Thiverval-Grignon, France), under
60 12h/12h light/dark conditions. ^{15}N labelling was performed using ammonium nitrite containing
61 $1/16^{\text{th}}$ of ^{15}N -ammonium nitrite 99% ($^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_2$), once at the beginning of the leaf
62 development stage (14 on BBCH-scale (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und
63 CHemische Industrie)) and once at the inflorescence emergence stage (51 on BBCH-scale).
64 Five discontinuous doses of deuterium oxide ($^2\text{H}_2\text{O}$ 99%, Eurisotop, St Aubin, France) were
65 delivered after the flowering stage had begun (61 on BBCH-scale). The first dose was diluted
66 at 20% in water, and the others were diluted at 10%. Goat milk was labelled in the INRA
67 experimental unit of Thiverval-Grignon. A single goat received an oral dose of 5 g of ^{15}N
68 ammonium sulfate ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 99%) for 4 consecutive days and a dose of 160 mL of $^2\text{H}_2\text{O}$
69 (99% for 3 consecutive days), given in the drinking water. The milk of the fifth day, in which the
70 isotopic enrichment reached a maximum, was used for the metabolic study.

71 Sunflower protein extractions from the meal were obtained in a 1 L stirred tank (400 rpm). The
72 process lasted 30 min and was performed at pH 7 and room temperature. The pH of the slurry
73 was adjusted and kept constant by using NaOH 1M. The solid/liquid ratio applied was 1/9
74 (w/w). Then, the slurry was centrifuged at 15.000 g (Thermoscientific Lynx 6000 centrifuge).
75 The clarified liquid phase was then diafiltered through a regenerated cellulosis membrane with
76 a 3 kDa cut-off (Pellicon® 2 mini, P2PLBCV01) using a laboratory pilot scale apparatus (Akta
77 flux 6, GE Healthcare Life Science). The diafiltration procedure started with 7 diavolumes (DV)
78 of 0.5 M NaCl and was followed by 3 DV of deionized water at pH 10. The transmembrane
79 pressure was set at 1.75 bar. The goat whey proteins were also purified by diafiltration. The
80 membrane used was 5 kDa regenerated cellulosis membrane (Pellicon® 3 Cassette Ultracel®,
81 P3C005C00) and the transmembrane pressure was 2.5 bar. The first step was concentration
82 up to a reducing factor comprise between 1.7 and 2.3. The second step was diafiltration with

83 6 diavolumes of deionized water. After purification, sunflower and goat whey proteins were
84 freeze-dried (Shanghai Pharmaceutical Machinery Co., LTD type GZL-0.5).

85 **Rats and diets**

86 This study complies with ARRIVE guidelines (17). It was conducted in compliance with the EU
87 directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the Ethics committee in animal
88 experiments at INRA (N°17-20, Jouy-en-Josas, France) and the French Ministry of Higher
89 Education and Research (APAFIS#11921-2017091818236657). Male Wistar rats (Envigo,
90 Huntingdon, United Kingdom) (n = 16) weighing 250-275 g were housed individually with a
91 reversed 12h/12h light/dark cycle and under standard conditions (temperature 21-22°C, tap
92 water and food *ad libitum*). They were fed a standard diet, proteins providing 14% of energy
93 (**Supplemental Table 1**). Food intake and body weight were measured daily throughout the
94 experiment. On day 8, rats were sorted into two groups according to the protein isolate
95 received, either goat milk whey (n = 8) or sunflower protein isolate (n = 8). From day 6 to 15,
96 rats followed an alimentary protocol to accustom them to consume a single meal in the
97 morning, during the dark phase. The protocol consisted of two meals: a morning meal of 4 g
98 of standard diet available for 30 min (from 8:30 a.m. to 9:00 a.m.) and an *ad libitum* meal
99 available for 6 hours (from 12:00 p.m. to 6:00 p.m.). Between these two meals, rats had free
100 access to water. On day 9, rats received a 4 g meal containing the studied proteins during their
101 morning meal in order to prevent neophobia (**Supplemental Fig.1**). On day 15, they were fed
102 a 4 g meal with a composition similar to that of the standard diet, but containing either ¹⁵N or
103 ²H labelled isolates, from either goat milk or sunflower (**Supplemental Table 1**). Six hours
104 after the meal, rats were intraperitoneally given a lethal dose of pentobarbital sodium (100
105 mg/g) and exsanguinated. Gastro-intestinal segments were identified as stomach, small
106 intestine, ileum (defined as the last 10 cm before the caecum), caecum and colon. Luminal
107 contents of these segments were rinsed with NaCl solution (9‰), collected entirely, weighed
108 and stored at -20°C. Feces were collected during the 6 h following the test meal and were
109 added to colonic contents.

110 **Analytical methods**

111 Protein digestibility was measured by following ^{15}N and ^2H recovery in digestive contents.
112 Nitrogen percentage and ^{15}N enrichment in protein isolates, digestive samples and meals were
113 determined by an elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France) coupled
114 with isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK).
115 Atropine (Thermo Electron, Milano, Italy) and L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-
116 Louis, USA) were used as elemental and isotopic standards, respectively. Hydrogen
117 percentage and ^2H enrichment in meal and caecum samples were performed at the Institut
118 des Sciences Analytiques (CNRS, Villeurbanne, France), using a high temperature conversion
119 elemental analyser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) coupled to IRMS (Delta V Plus,
120 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). To measure isotopic enrichments in individual AA,
121 proteins were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C . Amino acids were isolated using a
122 hydrogen form resin (Dowex® 50WX8 hydrogen form 100-200 mesh, Sigma-Aldrich, Saint-
123 Louis, USA) and derivatized with ethyl chloroformate (18). ^{15}N amino acid enrichments in
124 protein isolate, digestive luminal contents and meals were analyzed by gas chromatography
125 (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to an Isoprime isotope ratio mass
126 spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) via the GC5 Isoprime interface. For
127 ^{15}N analysis, the temperatures in the interface and combustion oven were regulated at 350°C
128 and 930°C , respectively. For ^2H analysis, the pyrolysis reactor was maintained at 1400°C . The
129 reactor in the pyrolysis conversion device was conditioned daily by the injection of hexane to
130 provide sufficient pyrolysis efficiency. A 30-m Rxi-17 capillary column (Restek, Evry, France;
131 0.25 mm i.d. and 0.5 μm film thickness) was used. The inlet temperature was set at 270°C .
132 Samples (2 μl) were injected in splitless mode for ^{15}N analysis and in split mode (3:1) for ^2H
133 analysis. The temperature program started at 150°C , rose to 200°C at $4^\circ\text{C}/\text{min}$ and then to
134 270°C at $25^\circ\text{C}/\text{min}$. The temperature was maintained for 20 min at 270°C .

135 To obtain amino acid quantification, 2 mg of digestive contents were hydrolyzed for 24 h with
136 HCl 6N at 110°C. Norvaline was used as an internal standard, added before hydrolysis.
137 Calibration standards were composed of an amino acid mixture (Waters, Milford, USA) to
138 which norvaline was added. Amino acids and standards were derivatized using the AccQ-Tag
139 Ultra Derivatization Kit (Waters, Milford, USA) according to manufacturer's protocol. The amino
140 acid analysis was performed on an Acquity H-class UPLC system with a PDA detector (Waters
141 Corporation, Milford, USA). The amino acids were separated using AccQ-Tag amino acid C18
142 column (2.1 × 100 mm; 1.7 µm bead size; Waters Corporation, Milford, USA). Column
143 temperature was 43°C and the eluents were: AccQ-Tag Ultra Eluent A (Waters Corporation,
144 Milford, USA), 2% formic acid in acetonitrile, and MilliQ water. The solvent gradients were run
145 at 0.7 ml/min and injection volume was 1 µl.

146 **Calculations**

147 Exogenous nitrogen (N_{exo} in mmol) in digestive contents was calculated as follows:

$$148 \quad N_{\text{exo}} = N_{\text{tot}} \times \frac{APE_s}{APE_m}$$

149 where N_{tot} (mmol) is the amount of nitrogen in the sample. The exogenous hydrogen in the
150 digestive tract was also calculated as follows:

$$151 \quad H_{\text{exo}} = H_{\text{tot}} \times \frac{APE_s}{APE_m}$$

152 where APE is the enrichment excess of ^{15}N or ^2H in the sample (s) or the test meal (m). APE
153 is defined as the enrichment of the sample in atom percent minus the natural enrichment
154 ($APE_{s/m} = AP_{s/m} - \text{natural enrichment}$). Natural enrichment values have been determined in
155 previous studies for digesta (19) and tissues (20) in rats after adaptation to a milk protein diet.
156 These values range from 0.369 to 0.370% depending on the type of sample.

157 As amino acids and peptides are absorbed mostly in the duodenum and jejunum, dietary N
158 losses were determined from the N recovery in distal parts of the intestine (ileum and large

159 intestine, including feces). Since digestion was almost complete after 6 hours, the losses due
 160 to residual N in the stomach and intestine were considered negligible. Accordingly, oro-fecal
 161 digestibility (in percentage of nitrogen ingested) was determined according to the following
 162 formula:

$$163 \quad \text{Oro – fecal digestibility}_N = \frac{N_{\text{ing}} - (N_{\text{exo ileum}} + N_{\text{exo caecum}} + N_{\text{exo fecal}})}{N_{\text{ing}}} \times 100$$

164 where N_{ing} is the amount of nitrogen ingested by rats (mmol).

165 Oro-fecal digestibility using deuterium-labelling was calculated as follows:

$$166 \quad \text{Oro – fecal digestibility}_H = \frac{H_{\text{ing}} - (H_{\text{exo caecum}} + H_{\text{exo fecal}})}{H_{\text{ing}}} \times 100$$

167 where H_{ing} is the amount of hydrogen ingested by the rats (mmol). The enrichment of ^2H in the
 168 ileum was not assessed due to an insufficient amount of samples. Oro-caecal protein
 169 digestibility was determined following the same formulas above for both isotopes by omitting
 170 the fecal amounts of dietary N or H.

171 Oro-caecal amino acid digestibility was determined using ^{15}N and ^2H enrichments in caecum
 172 amino acids by GC-C-IRMS and amino acid quantification by UPLC:

$$173 \quad \text{Oro – caecal amino acid digestibility}_N = \left(1 - \frac{\text{caecal AA}_i \text{ mass} \times \frac{^{15}\text{N AA}_i \text{ caecum}}{^{15}\text{N AA}_i \text{ meal}}}{\text{ingested AA}_i \text{ mass}}\right) \times 100$$

$$174 \quad \text{Oro – caecal amino acid digestibility}_H = \left(1 - \frac{\text{caecal AA}_i \text{ mass} \times \frac{^2\text{H AA}_i \text{ caecum}}{^2\text{H AA}_i \text{ meal}}}{\text{ingested AA}_i \text{ mass}}\right) \times 100$$

175 Mean amino acid digestibility was weighted by the amino acid composition of the isolates.

176 The digestible indispensable amino acid score (DIAAS) was measured using the caecal
 177 digestibility of amino acids:

$$178 \quad \text{DIAAS} = \frac{\text{mg digestible dietary IAA in 1 g of the dietary protein}}{\text{mg of the same dietary IAA in 1 g of the reference protein}} \times 100$$

179 The reference profile taken for DIAAS calculations was the recommended amino acid scoring
180 pattern for older children, adolescents and adults (21).

181 **Statistical analysis**

182 Results are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). Differences between
183 the two groups were tested by an unpaired Student's t-test. Differences between ^{15}N and ^2H
184 labelling were tested with a paired t-test using SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and R
185 3.5.1 (R project). Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

186 **Results**

187 **Amino acid composition and isotopic enrichments in protein isolates**

188 According to protein extraction and purification processes, protein recovery was 9.4 g of
189 protein per 100 g of seeds for sunflower and 4.7 g of protein per L of milk. We obtained 100 g
190 of sunflower isolate (94% protein) and 11 g of whey protein (87% protein). Based on the amino
191 acids that were measured after acid hydrolysis (**Table 1**), sunflower isolate contained less
192 indispensable amino acids (36.5 g/100 g of isolate) than goat whey protein (47.0 g/100 g of
193 isolate) but contained more of the other amino acids. Sunflower had a low lysine level, but was
194 especially rich in arginine, Glx and glycine compared to whey. Protein and amino acid
195 enrichments were determined in both isolates (**Figure 1**). In sunflower isolate, overall isotopic
196 enrichments were 0.12 atom percent (AP) for ^2H and 1.06 AP for ^{15}N , which corresponded to
197 8 and 3 times the natural abundance of these isotopes, respectively. ^{15}N amino acid
198 enrichment was homogenous, varying from 0.99 ± 0.01 AP for threonine to 1.10 ± 0.01 AP for
199 Asx. In contrast, ^2H amino acid enrichment was heterogeneous, ranging from 2.0 (Asx) to 5.5
200 (proline) times the natural abundance. For whey protein, overall isotopic enrichment was 0.95
201 AP for ^{15}N and 0.18 AP for ^2H , respectively 2.6 and 12 times the natural abundance for these
202 two elements. The amino acid ^{15}N labelling was less homogenous than for sunflower, varying
203 from 0.80 ± 0.19 AP for alanine (2.2 times natural abundance) to 1.08 ± 0.08 AP for tyrosine (2.9
204 times natural abundance). Goat whey amino acid enrichment was heterogeneous for ^2H
205 labelling, but had a different profile than for sunflower. Indeed, threonine was the least labelled
206 amino acid (1.7 times the natural abundance), and proline was the most labelled (4.9 times the
207 natural abundance in deuterium).

208

209 **Protein digestibility**

210 Dietary protein digestibility was assessed using ^{15}N and ^2H labelling. After six hours of
211 digestion, most of the dietary nitrogen was found in the caecum and colon in both groups

212 **(Table 2)**. Compared to the goat whey group, the sunflower group had more dietary nitrogen
213 in the caecum and colon. Consequently, oro-fecal digestibility was greater by 2% in whey
214 compared to sunflower. As ileal losses were minimal with ^{15}N , hydrogen content and ^2H
215 enrichment were determined only in the caecum and colon. There was more dietary hydrogen
216 in the caecum and colon of sunflower rats than in goat whey rats ($P<0.001$ and $P=0.01$,
217 respectively). Consequently, ^2H protein digestibility was higher ($P<0.001$) for the goat whey
218 group ($96.9\pm 0.2\%$) than for the sunflower group ($94.2\pm 0.5\%$).

219

220 **Amino acid digestibility**

221 Amino acid digestibility was determined in the caecum for both isotopic labellings (**Table 3**).
222 For the sunflower isolate, mean ^{15}N amino acid caecal digestibility was $96.3\pm 0.2\%$, and values
223 ranged from $95.5\pm 0.2\%$ for serine to $97.1\pm 0.2\%$ for methionine. For goat whey protein, the
224 mean was $97.5\pm 0.2\%$, and values ranged from $95.1\pm 0.6\%$ for serine to $98.8\pm 0.1\%$ for lysine
225 and proline. According to the ^{15}N labelling, goat whey amino acids were more digestible than
226 sunflower, except for threonine, alanine, Glx and serine. When the digestibility of all amino
227 acids was averaged, the difference between sunflower and goat whey was statistically
228 significant ($P<0.01$). Using ^2H labelling, mean AA digestibility was $97.8\pm 0.3\%$ for sunflower.
229 The minimum digestibility was $96.0\pm 0.5\%$ for phenylalanine and the maximum was $99.0\pm 0.3\%$
230 for serine. For goat whey, the mean was $98.7 \pm 0.2\%$, and values ranged from $94.8\pm 0.6\%$ for
231 serine to $100.0\pm 0.0\%$ for glycine for which we found no excess of enrichment. Mean amino
232 acid caecal digestibility was similar to caecal protein digestibility concerning ^{15}N but was slightly
233 higher ($P<0.01$) with ^2H , irrespective of the isolate.

234 **DIAAS**

235 Considering the slight difference between ^{15}N and ^2H amino acid digestibility, DIAAS difference
236 between the two isotopic labellings was statistically significant but numerically negligible
237 **(Figure 2)**. For goat whey, all the amino acids measured had a score superior to 1.0, which
238 means that there were no limiting amino acids. For sunflower, all amino acids had a score
239 superior to 1.0 except lysine (0.84 with ^{15}N and 0.86 with ^2H labelling), meaning that the
240 sunflower protein was limited in this amino acid.

241 **Discussion**

242 The objective of this study was to evaluate protein and amino acid digestibility of sunflower
243 protein isolate compared to whey protein in a rat model. For this purpose, both proteins were
244 doubly labelled with tracers, comparing ^2H to ^{15}N . The results revealed that the digestibility of
245 sunflower protein isolate was almost as high as whey protein. Furthermore, despite small
246 differences, ^2H labelling resulted in digestibility values close to those obtained with ^{15}N
247 labelling.

248 In this study, digestibility was measured in rats at the caecal and fecal levels for nitrogen and
249 at the caecal level for amino acids. Nevertheless, amino acids are absorbed in the small
250 intestine. Those that reach the caecum and colon are metabolized by colonic bacteria, leading
251 to the production of metabolites such as ammonia and indole, which can be absorbed in the
252 colon (22,23). This results in a systematic overestimation of protein nitrogen digestibility (24–
253 26). This error is acceptable, especially in the case of highly digestible protein, for which the
254 differences between ileal and fecal digestibility have been shown to be negligible (25).

255 However, amino acid digestibility may be impacted differently among amino acids. There are
256 no within subject comparisons in the literature between ileal and caecal/fecal digestibility.
257 However, it was reported that in ileostomates versus healthy subjects, differences between
258 apparent ileal and fecal digestibility varied between 0.3% for isoleucine and 15% for glycine
259 (27). Amino acid digestibility must be preferentially assessed at the ileal level. In humans, a
260 naso-ileal tube, although invasive, can be used to collect ileal contents (11,13). In pigs, ileal
261 samples can be collected through a cannula (7,10). There is no well-referenced method for
262 ileal collection in rats. A method using small, repeated meals and subsequent ileal sampling
263 at a single time has been used (28,29), but the results obtained from a unique sample time are
264 questionable. In this study, we used a method that was previously developed (30–32). It
265 consists of collecting all gastro-intestinal contents at once (6 hours), allowing a compromise
266 between complete digestion and minimal duration of fermentation. However, we cannot
267 exclude the possibility that the values of caecal amino acid digestibility have been over- or

268 underestimated. Moreover we did not determine fecal losses as the probability of errors due
269 to fermentation are likely to be higher than at the level of the caecum, but 0.5 to 1.5% of dietary
270 N has reached the colon. A digestion time of 4 or 5 h may have been a better compromise to
271 determine amino acid digestibility more precisely, but it would have required a different
272 calculation to take into account the fate of protein remaining in the stomach and small intestine.
273 Further cumbersome studies would be necessary to address this methodological issue in rats.

274 This study aimed to compare ^2H and ^{15}N labelling to measure real protein digestibility.
275 Transamination takes place in many tissues, particularly the liver, but also in colonic bacterial
276 cells, leading to the exchange or loss of ^{15}N . ^2H is less affected by transamination but losses
277 occur at the level of the second carbon (14). Comparing caecal digestibility of protein to amino
278 acids, we observed a very good accordance between both values when using ^{15}N . This
279 suggests that most of the ^{15}N compounds present in the caecum are in the form of amino acids.
280 Even if some ^{15}N were transferred to other bacterial metabolites (mainly ammonia and indole),
281 they could have been absorbed by the epithelial cells in the large intestine (22,23). For ^2H ,
282 caecal amino acid digestibility was higher than caecal protein digestibility for sunflower and
283 whey, which could indicate that some ^2H compounds were not in amino acid form. Among the
284 bacterial metabolites produced from amino acids, short-chain and branched-chain fatty acids
285 could be involved in this discrepancy. These differences, although significant, are nevertheless
286 very modest. They result in comparable digestibility and DIAAS values, making deuterium a
287 reliable tracer for digestive studies.

288 In this study's rat model using purified protein labelled with ^2H and ^{15}N isotopes, sunflower
289 isolate showed a high protein and amino acid real digestibility of approximately, or even above,
290 95%. This high value of digestibility can be attributed to the use of purified proteins as well as
291 to the rat model, but the specific effect of each factor is difficult to distinguish. Rats digest
292 protein more efficiently than pigs, as seen in interstudy comparisons of milk protein (30,33),
293 beef meat (31,34) or rapeseed isolate (35,36). As our study is the first using a sunflower isolate,
294 there is no direct comparison with external values. The high digestibility of approximately 95%

295 we found is above the standardized protein digestibility obtained in pigs, which varied between
296 72% to 83% depending on the sunflower source (seeds or meals) (6–9). For rapeseed protein,
297 digestibility in pigs was higher when using an isolate (91.4%) (35) compared to a cake
298 (between 73% and 81.7%) (8,37,38). For soybean protein, the digestibility was 91% when
299 given as an isolate in humans (39) and 85 to 88% when given as grains in pigs (7,8), illustrating
300 inter-study variability due to the model and protein form in the meal.

301 Under the conditions of sunflower isolate's high protein digestibility, there were small variations
302 in the digestibility of individual amino acids, seen in values that range from 95.5% for serine to
303 97.1% for methionine. We also observed small variations of amino acid digestibility in whey
304 protein, ranging from 95.1% for serine to 98.8% for proline and lysine, these variations being
305 comparable to those we have previously reported at the ileal level in humans (40). These
306 variations are related to the high digestibility of both of these isolates. In contrast, when protein
307 digestibility is lower, as has been reported in some studies for sunflower proteins in meals or
308 seeds, higher variations between amino acids were observed. The lowest value was obtained
309 for lysine (around 75%) and the highest value for methionine (around 90%) (6–8). In addition,
310 despite a high lysine digestibility ($96.4 \pm 0.2\%$) in this study, the relatively low content of lysine
311 in sunflower resulted in a DIAAS of 0.84, whereas, as expected, no amino acids were limiting
312 in whey. We could have expected that the lysine imbalance of sunflower could affect the
313 postprandial dietary N retention, as reported for wheat in which the lysine deficiency is more
314 important (12), but this was not measured in our study. The DIAAS of sunflower is, however,
315 higher than that of other plants determined in rat models (25,41). In those studies, lysine was
316 the main limiting indispensable amino acid for rice (0.40), rapeseed concentrate (0.37) and
317 wheat (0.20), while cooked beans (0.59) and peas (0.58) were limiting in sulfur amino acid.

318 In conclusion, this study provides the first data on sunflower protein isolate digestibility and
319 quality in a rat model. This experiment is also pioneering in the production of double labelled
320 milk and sunflower protein isolates and in comparing the performance of ^2H and ^{15}N to
321 determine their digestibility.

322 **Acknowledgements**

323 We thank Joseph Tessier from the experimental unit on goats in Thiverval-Grignon for the
324 labelling of milk. We thank Aurélie Dinard and Francis Cacérés from TerresInovia for their
325 participation in the labelling of sunflower seeds.

326

327 **Statement of authors' contributions to manuscript:**

328 CG and DT designed the research; RT, JC, NK and JP conducted the research; RK and AQ
329 provided essential materials; RT and CG analyzed data; RT and CG wrote the paper; RT and
330 CG had primary responsibility for final content.

331 All authors have read and approved the final manuscript.

References

1. USDA National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release. Basic Report: 12036, Seeds, sunflower seed kernels, dried [Internet]. USDA; [cited 2019 Mar 5]. Available from: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/12036?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=sunflower+seeds&ds=SR&qt=&qp=&qd=&qn=&q=&ing=>
2. FAO. FAOSTAT Crops - Sunflower [Internet]. FAO; [cited 2019 Mar 5]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>
3. Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, Weltgesundheitsorganisation, FAO, United Nations University, editors. Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation ; [Geneva, 9 - 16 April 2002]. Geneva: WHO; 2007. 265 p.
4. Robinson RG. Amino Acid and Elemental Composition of Sunflower and Pumpkin Seeds1. *Agron J*. 1975;67:541.
5. Chung KH, Shin KO, Hwang HJ, Choi K-S. Chemical composition of nuts and seeds sold in Korea. *Nutr Res Pract*. 2013;7:82.
6. Liu JD, Li QY, Zeng ZK, Li P, Xu X, Wang HL, Zhang S, Piao XS. Determination and Prediction of the Amino Acid Digestibility of Sunflower Seed Meals in Growing Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2014;28:86–94.
7. Gonzalez-Vega JC, Stein HH. Amino acid digestibility in canola, cottonseed, and sunflower products fed to finishing pigs. *J Anim Sci*. 2012;90:4391–400.
8. Nørgaard JV, Fernández JA, Jørgensen H. Ileal digestibility of sunflower meal, pea, rapeseed cake, and lupine in pigs. *J Anim Sci*. 2012;90:203–5.
9. Almeida FN, Htoo JK, Thomson J, Stein HH. Digestibility by growing pigs of amino acids in heat-damaged sunflower meal and cottonseed meal1. *J Anim Sci*. 2014;92:585–93.
10. Cotten B, Ragland D, Thomson JE, Adeola O. Amino acid digestibility of plant protein feed ingredients for growing pigs. *J Anim Sci*. 2016;94:1073–82.
11. Gaudichon C, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Daré S, Van Oyccke M, Ferrière F, Rautureau J, Tomé D. Net Postprandial Utilization of [15N]-Labeled Milk Protein Nitrogen Is Influenced by Diet Composition in Humans. *J Nutr*. 1999;129:890–5.
12. Bos C, Juillet B, Fouillet H, Turlan L, Daré S, Luengo C, N'tounda R, Benamouzig R, Gausserès N, Tomé D, et al. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:87–94.
13. Oberli M, Marsset-Baglieri A, Airinei G, Santé-Lhoutellier V, Khodorova N, Rémond D, Foucault-Simonin A, Piedcoq J, Tomé D, Fromentin G, et al. High True Ileal Digestibility but Not Postprandial Utilization of Nitrogen from Bovine Meat Protein in Humans Is Moderately Decreased by High-Temperature, Long-Duration Cooking. *J Nutr*. 2015;145:2221–8.
14. Devi S, Varkey A, Sheshshayee MS, Preston T, Kurpad AV. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *Am J Clin Nutr*. 2018;107:984–91.
15. Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, Duraisamy R, Thomas T, Preston T, Devi S, Kurpad AV. Ileal digestibility of intrinsically labeled hen's egg and meat protein determined with the dual stable isotope tracer method in Indian adults. *Am J Clin Nutr*. 2018;108:980–7.

16. Shivakumar N, Kashyap S, Kishore S, Thomas T, Varkey A, Devi S, Preston T, Jahoor F, Sheshshayee M, Kurpad AV. Protein-quality evaluation of complementary foods in Indian children. *Am J Clin Nutr.* 2019;109:1319–27.
17. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal Research: Reporting In Vivo Experiments. *PLoS Biol.* 2010;3.
18. Fromentin C, Sanders P, Nau F, Anton M, Fromentin G, Tomé D, Thibault J-N, Gaudichon C. A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with 15N and 13C: 15N-13C intrinsic labeling of egg proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26:43–8.
19. 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.* 2011;40:1461–72.
20. Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D, Fouillet H. The Nature of the Dietary Protein Impacts the Tissue-to-Diet 15N Discrimination Factors in Laboratory Rats. Blanc S, editor. *PLoS ONE.* 2011;6:e28046.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations, editor. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand [Internet]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. 66 p. Available from: <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>
22. Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti P-H, Sanz Y, Tomé D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res.* 2013;68:95–107.
23. Yao CK, Muir JG, Gibson PR. Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43:181–96.
24. Darragh AJ, Hodgkinson SM. Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. *J Nutr.* 2000;130:1850S-1856S.
25. Rutherford SM, Fanning AC, Miller BJ, Moughan PJ. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *J Nutr.* 2015;145:372–9.
26. Hendriks WH, van Baal J, Bosch G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants – a comparative species view. *Br J Nutr.* 2012;108:S247–57.
27. Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr.* 1994;71:29.
28. Rutherford SM, Moughan PJ. The rat as a model animal for the growing pig in determining ileal amino acid digestibility in soya and milk proteins. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2003;87:292–300.
29. Rutherford SM, Cui J, Goroncy AK, Moughan PJ. Dietary Protein Structure Affects Endogenous Ileal Amino Acids But Not True Ileal Amino Acid Digestibility in Growing Male Rats. *J Nutr.* 2015;145:193–8.
30. 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;54:1508–17.
31. Oberli M, Lan A, Khodorova N, Santé-Lhoutellier V, Walker F, Piedcoq J, Davila A-M, Blachier F, Tomé D, Fromentin G, et al. Compared with Raw Bovine Meat, Boiling but Not Grilling,

- Barbecuing, or Roasting Decreases Protein Digestibility without Any Major Consequences for Intestinal Mucosa in Rats, although the Daily Ingestion of Bovine Meat Induces Histologic Modifications in the Colon. *J Nutr.* 2016;146:1506–13.
32. Oberli M, Douard V, Beaumont M, Jaoui D, Devime F, Laurent S, Chaumontet C, Mat D, Le Feunteun S, Michon C, et al. Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res.* 2018;62:1700570.
 33. Gaudichon C, Roos N, Mahé S, Sick H, Bouley C, Tomé D. Gastric Emptying Regulates the Kinetics of Nitrogen Absorption from ¹⁵N-Labeled Milk and ¹⁵N-Labeled Yogurt in Miniature Pigs. *J Nutr.* 1994;124:1970–7.
 34. Bax M-L, Buffière C, Hafnaoui N, Gaudichon C, Savary-Auzeloux I, Dardevet D, Santé-Lhoutellier V, Rémond D. Effects of Meat Cooking, and of Ingested Amount, on Protein Digestion Speed and Entry of Residual Proteins into the Colon: A Study in Minipigs. *PLoS ONE.* 2013;8:e61252.
 35. Deglaire A, Bos C, Tomé D, Moughan PJ. Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *Br J Nutr.* 2009;102:1752.
 36. Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, Blachier F, Tomé D, Bos C. Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab.* 2011;8:52.
 37. Presto MH, Lyberg K, Lindberg JE. Digestibility of amino acids in organically cultivated white-flowering faba bean and cake from cold-pressed rapeseed, linseed and hemp seed in growing pigs. *Arch Anim Nutr.* 2011;65:21–33.
 38. Kaewtapee C, Mosenthin R, Nanning S, Wiltafsky M, Schäffler M, Eklund M, Rosenfelder-Kuon P. Standardized ileal digestibility of amino acids in European soya bean and rapeseed products fed to growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018;102:695–705.
 39. Mariotti F, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Daré S, Gaudichon C, Tomé D. Nutritional Value of [¹⁵N]-Soy Protein Isolate Assessed from Ileal Digestibility and Postprandial Protein Utilization in Humans. *J Nutr.* 1999;129:1992–7.
 40. Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Daré S, Tomé D, Metges CC. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology.* 2002;123:50–9.
 41. Han S-W, Chee K-M, Cho S-J. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chem.* 2015;172:766–9.
 42. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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;123:1939–51.

FIGURES

Figure 1: Amino acid labelling of protein isolate. A) ^{15}N enrichment in sunflower and goat whey amino acids. B) ^2H enrichment in sunflower and goat whey amino acids. Dotted lines show natural abundance of each isotope. Values are means \pm SEMs, $n=3$ replicates per group and per labelling.

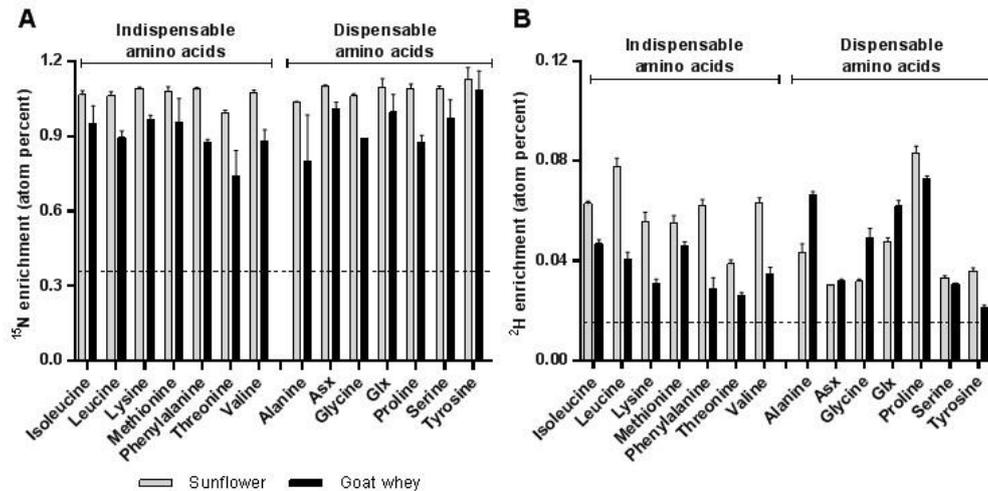
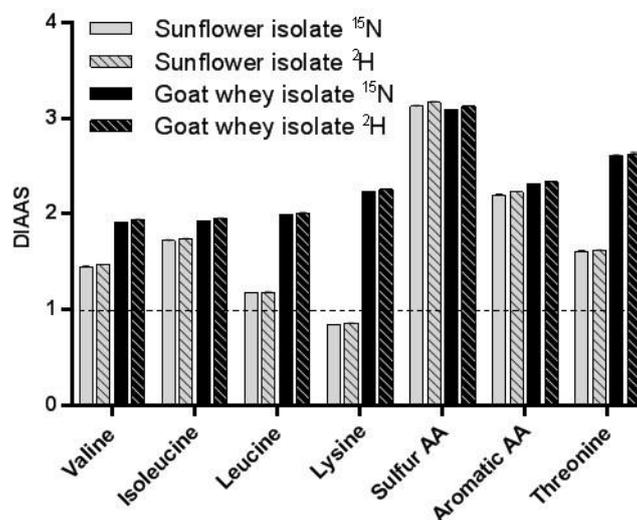


Figure 2: DIAAS of sunflower protein isolate and goat whey protein using ^{15}N and ^2H labelling. Sulfur AA are methionine and cysteine, Aromatic AA are tyrosine and phenylalanine. Values are means \pm SEMs, $n=8$ per group.

AA: amino acids. DIAAS: Digestible Indispensable Amino Acid Score



TABLES

Table 1: Amino acid composition of sunflower and whey protein isolates.

	Indispensable amino acid		Dispensable amino acid		
	Sunflower isolate	Goat whey isolate		Sunflower isolate	Goat whey isolate
Histidine	2.42	2.26	Alanine	4.02	4.28
Isoleucine	4.44	4.85	Arginine	9.42	2.97
Leucine	6.23	10.05	Asx	9.63	8.64
Lysine	3.48	8.84	Cysteine	3.84	3.93
Methionine	2.31	1.96	Glx	23.31	17.44
Phenylalanine	4.89	4.10	Glycine	5.75	2.05
Threonine	3.46	5.52	Proline	4.33	7.51
Valine	5.02	6.41	Serine	4.55	5.46
	-	-	Tyrosine	2.89	3.74

Amino acid composition is expressed in percentage of all amino acids. Asx: aspartate and asparagine.

Glx: glutamate and glutamine.

Table 2: Dietary nitrogen and hydrogen recovered in gastrointestinal contents as well as oro-caecal and oro-fecal protein digestibility in rats 6 hours after the ingestion of ¹⁵N and ²H sunflower or whey protein isolate.

	Sunflower	Goat whey	P _{value}	Sunflower	Goat whey	P _{value}
	¹⁵N recovery (% of ingested)			²H recovery (% of ingested)		
Stomach	0.25 ± 0.06	0.13 ± 0.03	0.11	-	-	-
Small Intestine	0.51 ± 0.03	0.57 ± 0.10	0.57	-	-	-
Ileum	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.86	-	-	-
Caecum	3.42 ± 0.27	2.19 ± 0.20	<0.01	4.33 ± 0.29	2.44 ± 0.28	<0.001
Colon	1.34 ± 0.33	0.53 ± 0.10	0.03	1.46 ± 0.26	0.70 ± 0.11	0.02
	¹⁵N digestibility (%)			²H digestibility (%)		
Oro-caecal digestibility	96.5 ± 0.3	97.7 ± 0.2	<0.01	95.7 ± 0.3	97.6 ± 0.3	<0.001
Oro-fecal digestibility	95.1 ± 0.5	97.2 ± 0.2	<0.01	94.2 ± 0.5	96.9 ± 0.2	<0.001

Means ± SEMs, n = 8 for both groups. Differences were tested using an unpaired t-test.

Table 3: Caecal amino acid digestibility determined from ^{15}N and ^2H enrichments in rats 6 hours after the ingestion of ^{15}N and ^2H sunflower or whey protein isolate.

	Sunflower isolate			Goat whey isolate			P value ²	
	^2H	^{15}N	P value ¹	^2H	^{15}N	P value ¹	^2H	^{15}N
Indispensable amino acids caecal digestibility (% of ingested)								
Leucine	96.3 ± 0.5	96.0 ± 0.3	0.37	99.3 ± 0.1	98.3 ± 0.2	<0.001	<0.001	<0.001
Isoleucine	97.4 ± 0.2	96.3 ± 0.3	<0.001	98.4 ± 0.3	97.3 ± 0.2	<0.01	0.04	0.03
Lysine	98.0 ± 0.3	96.4 ± 0.2	<0.001	99.9 ± 0.0	98.8 ± 0.1	<0.001	<0.001	<0.001
Methionine	98.2 ± 0.2	97.1 ± 0.2	<0.001	99.5 ± 0.1	98.4 ± 0.1	<0.001	<0.001	<0.001
Phenylalanine	96.0 ± 0.5	96.1 ± 0.4	0.47	99.3 ± 0.2	98.5 ± 0.1	<0.01	<0.001	<0.001
Threonine	97.1 ± 0.2	96.3 ± 0.3	<0.01	96.9 ± 0.4	96.4 ± 0.3	0.20	0.70	0.79
Valine	96.9 ± 0.4	95.8 ± 0.4	<0.001	98.7 ± 0.2	97.5 ± 0.2	<0.001	<0.001	<0.01
Mean	97.1 ± 0.2	96.3 ± 0.1	<0.001	98.9 ± 0.2	97.9 ± 0.1	<0.001	<0.001	<0.001
Dispensable amino acids caecal digestibility (% of ingested)								
Alanine	96.5 ± 0.5	95.8 ± 0.4	0.15	99.2 ± 0.2	96.6 ± 0.3	<0.001	<0.001	0.12
Glycine	98.5 ± 0.2	95.7 ± 0.2	<0.001	100.0 ± 0.0	97.0 ± 0.3	<0.001	<0.001	<0.01
Glx	98.8 ± 0.2	97.0 ± 0.2	<0.001	98.3 ± 0.3	97.3 ± 0.3	<0.001	0.18	0.53
Proline	97.3 ± 0.3	96.5 ± 0.3	<0.001	99.4 ± 0.1	98.8 ± 0.1	<0.001	<0.001	<0.001
Serine	99.0 ± 0.3	95.5 ± 0.2	<0.001	96.3 ± 0.8	95.1 ± 0.6	<0.01	<0.01	0.54
Tyrosine	-	96.2 ± 0.3	-	-	98.6 ± 0.2	-	-	<0.001
Mean	98.0 ± 0.2	96.1 ± 0.1	<0.001	98.6 ± 0.3	97.2 ± 0.2	<0.001	0.07	<0.001
Mean (all AA)	97.8 ± 0.3	96.3 ± 0.2	<0.001	98.7 ± 0.2	97.5 ± 0.2	<0.001	0.04	<0.01

Caecal amino acid digestibility is expressed as percentage of AA ingested. Glx: glutamate and glutamine. Values are means ± SEMs, n=8 for both groups.

¹ Differences between labellings were tested using a paired t-test

² Differences between proteins were tested using an unpaired t-test.

ONLINE SUPPLEMENTARY MATERIAL

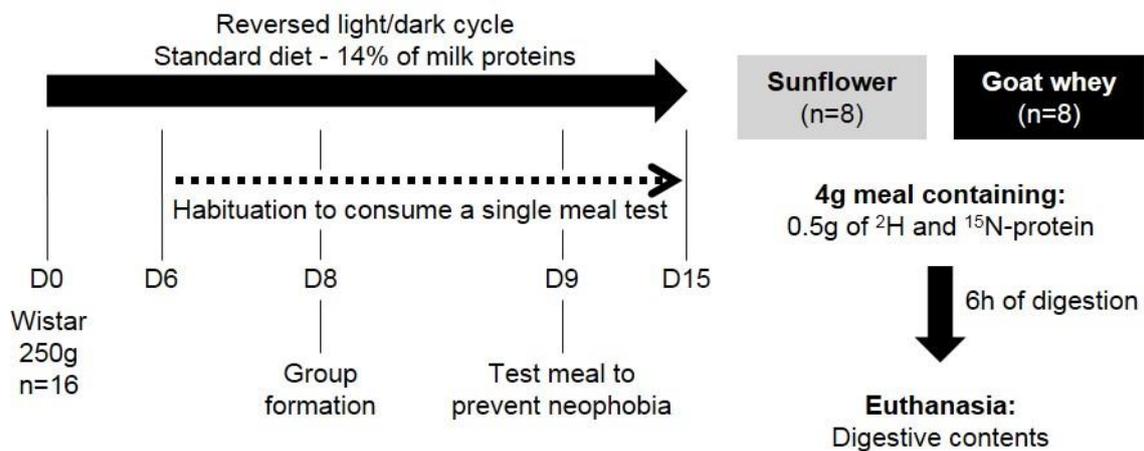
Supplemental table 1: Meal composition of standard diet and of sunflower and goat whey diets. Composition in mass and energy supply

	Standard diet P14		Sunflower		Goat whey	
	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy
Protein	140.0	14.5	117.0	14.4	120.0	13.9
Soybean oil	40.0	10.4	42.0	10.7	42.5	10.8
Starch	622.4	63.1	632.7	62.1	630.0	62.5
Sucrose	100.3	10.9	111.0	11.7	110.0	11.8
Cellulose	50.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0
Minerals ¹	35.0	0.0	35.0	0.0	35.0	0.0
Vitamins ¹	10.0	1.1	10.0	1.1	10.0	1.0
Others	2.3	0.0	2.3	0.0	2.5	0.0

Compositions are expressed in g/kg of dry matter (DM) and percentage of energy provided.

¹ Minerals and vitamins were formulated from AIN-93M (42)

Supplemental Figure 1: Experimental protocol



3.2. Article 2 : Digestibilité réelle des protéines et acides aminés de la spiruline ¹⁵N dans un modèle de rat

Article à soumettre.

Résumé

Objectif :

La deuxième étape de la mise en place de la méthode double traceur était de déterminer la qualité de la protéine de référence recommandée, la spiruline. Il existe peu d'études *in vivo* de digestibilité et les données existantes *in vivo* ou *in vitro* rapportent une digestibilité relativement faible. Ainsi, une étude utilisant la méthode double traceur chez l'Homme a trouvé une digestibilité moyenne des acides aminés indispensables de 82,2% avec des valeurs allant de 77,5 à 95,3%. Nous nous sommes demandé si cela pouvait être dû à la présence des parois cellulaires résistantes. Cette étude vise à déterminer la digestibilité de l'azote et des acides aminés de la spiruline chez le rat. Un objectif secondaire est de tester l'effet d'une sonication préalable à l'ingestion dans l'intention de fragiliser les parois cellulaires de la spiruline.

Méthodes :

Des rats Wistar ont été nourris avec un repas test contenant soit de la spiruline ¹⁵N soniquée (n = 11) soit de la spiruline ¹⁵N non soniquée (contrôle, n = 13). Les rats étaient euthanasiés six heures après l'ingestion du repas. La digestibilité de l'azote de la spiruline était déterminée par évaluation de la récupération de ¹⁵N dans les contenus digestifs par EA-IRMS. La digestibilité des acides aminés était mesurée par quantification des acides aminés dans le caecum par UHPLC et leur enrichissement en ¹⁵N par GC-C-IRMS. Les DIAAR étaient déterminés pour les deux groupes. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes associées à l'erreur standard.

Résultats :

Aucun effet de la sonication n'ayant été observé sur les valeurs de digestibilité, les résultats ont donc été poolés entre les deux groupes. La digestibilité fécale réelle de l'azote était de $86,0 \pm 0,7\%$, avec aucune différence entre les deux groupes. La digestibilité caecale moyenne des acides aminés était de $82,8 \pm 1,3\%$ avec des valeurs allant de $77,9 \pm 1,9\%$ pour la sérine à $89,4 \pm 1,0\%$ pour la méthionine. Le DIAAR était de 0,9 pour la lysine en utilisant 6,25 comme facteur de conversion de l'azote en protéines, et celui de l'histidine estimé à 0,77 compte tenu du score chimique et de la digestibilité moyenne des acides aminés indispensables.

Conclusion :

La digestibilité de l'azote et des acides aminés de la spiruline est relativement basse et nous n'avons pas mis en évidence l'effet d'une sonication. La composition en acides aminés de la spiruline est relativement bien équilibrée pour compenser sa faible digestibilité. Le facteur de conversion de l'azote en protéines est important pour la détermination, avec 6,25 la spiruline est limitée en lysine et en histidine alors qu'elle est limitée en histidine seulement avec un facteur de conversion de 5,6, correspondant mieux au cas des protéines végétales et aux micro-algues. La faible digestibilité est en contradiction avec la recommandation de la FAO qui préconisait, une protéine hautement digestible comme protéine de référence.

Real protein and amino acid digestibility of ¹⁵N spirulina in rats

Romain Tessier¹, Juliane Calvez¹, Nadezda Khodorova¹, Julien Piedcoq¹, Daniel Tomé¹,
Claire Gaudichon^{1*}

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

Address all correspondence and reprint requests to:

Claire Gaudichon, Ph.D.

Mailing address: UMR914 PNCA, AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris,
France

Email: claire.gaudichon@agroparistech.fr

Phone: +33 1 44 08 18 29

Fax: +33 1 44 08 18 56

Abbreviations: AA: amino acid; Asx: asparatate and asparagine; APE: atom percent excess; CS: control spirulina; DIAAR: digestible indispensable amino acid reference ratio; DIAAS: digestible indispensable amino acid score; DM: dry matter; EA: elemental analyzer; GC-C: gas chromatography coupled to a combustion furnace; Glx: glutamate and glutamine; IAA: indispensable amino acid; IRMS: isotope-ratio mass spectrometer; N: nitrogen; SEM: standard error of the mean; SS: sonicated spirulina; UHPLC: ultra-high-performance liquid chromatography

1 **Abstract**

2 Purpose:

3 Spirulina is often used as dietary supplement for its protein content and quality. However, *in*
4 *vivo* data on its protein digestibility are lacking. This study aims to determine nitrogen and
5 amino acid digestibility of whole cell spirulina in rats. A secondary objective was to test the
6 effect of sonication prior to ingestion in order to break cell walls.

7 Methods:

8 Wistar rats were fed a single test meal containing ¹⁵N spirulina that was either sonicated (n=11)
9 or not (control, n=13). Rats were euthanized 6 h after the meal ingestion. The amino acid
10 composition of spirulina was measured by UHPLC. Spirulina nitrogen digestibility was
11 measured by assessment of ¹⁵N recovery in digestive contents. Amino acid digestibility was
12 measured by quantification of the caecal amino acid content and their ¹⁵N enrichment.

13 Results:

14 Real fecal nitrogen digestibility was 86.0±0.7%. Mean ¹⁵N amino acid caecal digestibility was
15 82.8±1.3%, and values ranged from 77.9±1.9% for serine to 89.4±1.0% for methionine. No
16 effect of sonication was observed on protein and amino acid digestibility. The lowest chemical
17 score was observed for histidine (0.92). Among the digestible indispensable amino acid ratio
18 we could determine, the lowest one was 0.9 for lysine.

19 Conclusion:

20 The nitrogen and amino acid digestibility of spirulina was relatively low, and was not improved
21 by prior sonication. Its amino acid composition is relatively well balanced to partly compensate
22 for the poor digestibility. However, histidine and lysine are marginally insufficient in spirulina.

23 Introduction

24 Spirulina is a cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. Two species, *A. platensis* and *A.*
25 *maxima*, are primarily used in food supplements for their high protein content, which varies
26 between 50 and 70%, depending on growing conditions [1]. They also contain large amounts
27 of β -carotene, vitamin B12 and iron [1], which are presumed to have health benefits such as
28 anticancer, antibacterial and antiviral effects [1]. Furthermore, it has been shown that the
29 protein amino acid (AA) composition of spirulina meets FAO requirements [2]. Although
30 spirulina contains less histidine and lysine than bovine milk [3], its composition is more
31 balanced than most plant protein sources, making it an potentially useful amino acid source.

32 However, there are few studies on spirulina protein and amino acid bioavailability. In a human
33 study that implemented the dual isotope method, a novel, non-invasive method was used to
34 determine amino acid digestibility in humans by comparing plasma appearance of amino acids
35 to that of free amino acids. The authors found that spirulina amino acid digestibility ranged
36 from 77.5% for lysine to 95.3% for phenylalanine with a mean indispensable amino acid (IAA)
37 digestibility of 85.2% [4]. This study showed a relatively low protein digestibility that could be
38 explained by the presence of cell walls. In a study on *Chlorella vulgaris*, another microalgae, it
39 was demonstrated that ultrasonication tended to improve true fecal protein digestibility by 10%
40 in rats [5]. One possible explanation is that sonication, by application of sonic energy, could
41 enhance protein digestibility of spirulina by breaking cell walls.

42 This study aimed to evaluate the real digestibility of spirulina nitrogen and amino acids *in vivo*
43 in rats using ^{15}N labeled spirulina and to assess the effect of sonication.

44 **Materials and methods**

45 **Animal and diets**

46 All experiments were executed in compliance with ARRIVE guidelines, the EU directive
47 2010/63/EU for animal experiments, and were approved by Ethics committee in animal
48 experiment of INRA (N°17-20 and 16-44, Jouy-en-Josas, France) and the French Ministry of
49 Higher Education and Research (APAFIS#11921-2017091818236657 and APAFIS#9769-
50 2016102617397786). Male Wistar rats (Envigo, Huntingdon, United Kingdom) (n=24),
51 weighing 250-275 g at their arrival were housed individually in a reversed 12h light/dark cycle
52 and in standard conditions (free access to tap water and food). They were fed a standard diet
53 (**Table 1**). After acclimation, rats were sorted into two groups according to the spirulina meal
54 they would receive: control spirulina (CS, n=13) or sonicated spirulina (SS, n=11). From day 4
55 to 13, rats followed an alimentary protocol in order to accustom them to consume a single meal
56 in the morning. The protocol consisted of two meals: a morning meal of 4 g of standard diet for
57 30 mins (from 8:30 to 9:00 a.m.) and an *ad libitum* meal for 6 hours (from 12:00 to 6:00 p.m.).
58 Between these two meals, rats were fasted with free access to tap water (**Figure 1**). On day
59 8, in order to prevent neophobia, rats received a 4 g meal containing spirulina during the dark
60 phase. On day 13, they were fed a complete 4 g meal containing 0.77 g of spirulina (Cambridge
61 Isotope Laboratories, Andover, USA), either sonicated or not. The meal was extrinsically
62 labeled by adding 10 mg of ¹⁵N spirulina (98%, Cambridge Isotope Laboratories, Andover,
63 USA), sonicated or not. Unlabeled and labeled spirulina were sonicated for 1 h 30 min at 35
64 kHz (Elmasonic One, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany) and then freeze dried.
65 The spirulina composition, provided by the supplier, was composed of 60.9% protein (Kjeldahl
66 6.25), 6.5% fat, 4.2% fiber and 10.2% ash.

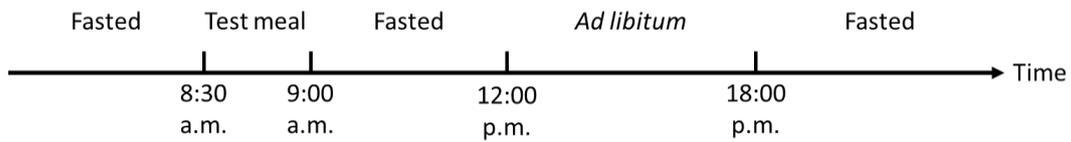
67 **Table 1** Meal composition of standard diet and spirulina diet

	Standard diet P14		Spirulina diet	
	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy
Protein	140.0	14.5	193.0	14.9
Soybean oil	40.0	10.4	29.0	8.2
Starch	622.4	63.1	578.0	63.2
Sucrose	100.3	10.9	106.0	12.5
Cellulose	50.0	0.0	48.0	0.0
Minerals ^a	35.0	0.0	34.0	0.0
Vitamins ^a	10.0	1.1	10.0	1.1
Others	2.3	0.0	2.0	0.0

68 Composition in mass (in g/kg of dry matter (DM)) and energy supply (% of energy provided).

69 ^a Minerals and vitamins were formulated from AIN-93M.

70 **Figure 1** Schematic representation of feeding pattern during the habituation to the small test
71 meal



72

73 The test meal composition was similar to the standard diet (**Table 1**). The spirulina amino acid
74 composition is given in **Table 2**. As previously described [6–8], six hours after the meal, rats
75 were intraperitoneally given a lethal dose of pentobarbital sodium (100 mg/mg) and
76 exsanguinated. Gastro-intestinal segments were identified as stomach, proximal small
77 intestine, ileum (defined as the last 10 cm before the caecum), caecum and colon. Luminal
78 contents of these segments were rinsed with NaCl solution (9‰), collected entirely, weighed
79 and stored at -20°C. Feces were collected during the 6 h following the test meal and were
80 added to colonic contents.

81

82 **Table 2** Amino acid composition of spirulina protein

Spirulina protein			
Indispensable amino acid		Dispensable amino acid	
Histidine	1.42	Alanine	8.24
Isoleucine	5.80	Arginine	7.07
Leucine	8.81	Asx	10.76
Lysine	4.68	Cysteine	1.32
Methionine	2.12	Glx	14.17
Phenylalanine	4.77	Glycine	4.90
Threonine	5.38	Proline	3.96
Valine	6.27	Serine	5.45
		Tyrosine	4.87

83 Amino acid composition is expressed in percentage of all amino acids. Asx: aspartate and asparagine.
 84 Glx: glutamate and glutamine.

85 **Analytical methods**

86 Nitrogen digestibility was assessed by measuring ¹⁵N recovery in digestive contents. Nitrogen
 87 percentage and ¹⁵N enrichments in digestive samples and meal were determined by an
 88 elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France) coupled with isotopic ratio
 89 mass spectrometry (IRMS) (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK). Atropine (Thermo
 90 Electron, Milano, Italy) and L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) were
 91 used as elemental and isotopic standards, respectively.

92 Proteins were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. Amino acids were isolated using a
 93 hydrogen form ion exchange resin (Dowex® 50WX8 hydrogen form 100-200 mesh, Sigma-
 94 Aldrich, Saint-Louis, USA) and derivatized with ethyl chloroformate. ¹⁵N enrichments in meal
 95 and digestive luminal contents were analyzed by gas chromatography (GC 6890N, Agilent
 96 Technologies, Les Ulis, France) coupled to an Isoprime isotope ratio mass spectrometer
 97 (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) *via* the GC5 Isoprime interface (350°C). The
 98 furnace temperature was 950°C. The inlet temperature was set at 270°C. Samples (2µl) were
 99 injected in splitless mode for ¹⁵N analysis. The GC column temperature program started at
 100 150°C, rose to 200°C at 4°C/min and then to 270°C at 25°C/min. The temperature was
 101 maintained for 20 min at 270°C.

102 To quantify amino acids, 10 mg of digestive contents and meal were hydrolyzed for 24 h with
103 HCl 6N at 110°C. Norvaline was used as an internal standard, added before hydrolysis.
104 Calibration standards were composed of a mixture of amino acids (Waters, Milford, USA) to
105 which norvaline was added. Amino acids and standards were derivatized using the AccQ-Tag
106 Ultra Derivatization kit (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's protocol. Amino
107 acid analysis was performed on an Acquity H-class UHPLC system with a PDA detector
108 (Waters Corporation, Milford, USA). Amino acids were separated using AccQ-Tag amino acid
109 C18 column (2.1 × 100 mm; 1.7 µm bead size; Waters Corporation, Milford, USA). Column
110 temperature was 43°C and the eluents were: AccQ-Tag Ultra Eluent A (Waters Corporation,
111 Milford, USA), 2% formic acid in acetonitrile, and MilliQ water. The solvent gradients were run
112 at 0.7 ml/min and injection volume was 1 µl.

113 **Calculations**

114 Exogenous nitrogen (N_{exo} in mmol) in gastro-intestinal contents was calculated as follows:

$$115 \quad N_{\text{exo}} = N_{\text{tot}} \times \frac{APE_s}{APE_m}$$

116 Where N_{tot} is the amount of nitrogen (N) in the sample and APE the enrichment excess
117 compared to the natural enrichment (in atom percent) of ^{15}N in the sample or the meal (s or
118 m).

119 As amino acids and peptides are absorbed primarily in the duodenum and jejunum, dietary N
120 losses were determined from N recovery in distal parts of the intestine (ileum and large
121 intestine, including feces). As digestion was almost complete after 6 h, losses due to residual
122 N in the stomach and intestine were considered negligible. Accordingly, fecal nitrogen
123 digestibility (in % of N) was determined as follows:

$$124 \quad \text{Fecal nitrogen digestibility}_N = \frac{N_{\text{ing}} - (N_{\text{exo ileum}} + N_{\text{exo caecum}} + N_{\text{exo fecal}})}{N_{\text{ing}}} \times 100$$

125 Where N_{ing} (mmol) is the amount of N ingested by the rats. Caecal nitrogen digestibility was
126 also assessed with this same formula, without the fecal N amount.

127 Caecal amino acid digestibility was calculated using ¹⁵N amino acid enrichments in the caecum
128 by GC-C-IRMS and amino acid quantification by UHPLC:

129
$$\text{Caecal amino acid digestibility}_N = \left(1 - \frac{\text{caecal AA}_i \text{ mass} \times \frac{{}^{15}\text{N AA}_i \text{ caecum}}{{}^{15}\text{N AA}_i \text{ meal}}}{\text{ingested AA}_i \text{ mass}} \right) \times 100$$

130 Mean amino acid digestibility was weighted by the amino acid composition of spirulina.

131 The digestible IAA reference ratio (DIAAR) was measured for each indispensable amino acid
132 using the oro-caecal amino acid digestibility with ¹⁵N:

133
$$\text{DIAAR} = \frac{\text{mg digestible dietary IAA in 1 g of dietary protein}}{\text{mg of the same dietary IAA in 1 g of reference protein}}$$

134 The digestible indispensable amino acid score (DIAAS) was calculated as follows:

135
$$\text{DIAAS} = \text{lowest value of DIAAR} \times 100$$

136 The reference profile used for DIAAS calculation was the recommended amino acid scoring
137 pattern for older children, adolescents and adults [9]. A nitrogen to protein conversion factor of
138 6.25 was used to calculate the amount of protein in the ingredient.

139 **Statistical analysis**

140 Results are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM). Differences between
141 the two groups were tested by unpaired Student's t-test R 3.5.1 (R project). If P<0.05,
142 differences were considered statistically significant.

143 Results

144 Nitrogen digestibility

145 Spirulina nitrogen digestibility was assessed using ^{15}N recovery in digestive contents. For both
146 groups, after six hours of digestion, most of the dietary nitrogen was found in the caecum and
147 colon (**Table 3**). The control group had more dietary nitrogen in the stomach and colon than
148 the sonicated group, but there was no difference in nitrogen digestibility. There was also no
149 effect of sonication on caecal digestibility for ^{15}N . Pooled spirulina nitrogen digestibility (n=24)
150 was $86.0 \pm 0.7\%$.

151 **Table 3** Dietary nitrogen recovered in gastrointestinal contents as well as caecal and fecal
152 nitrogen digestibility in rats 6 hours after ingestion of ^{15}N control or sonicated spirulina

	Control Spirulina	Sonicated Spirulina	P _{value}
^{15}N recovery (% of dietary N ingested)			
Stomach	0.98 ± 0.24	0.15 ± 0.03	<0.01
Small Intestine	0.81 ± 0.10	0.62 ± 0.10	0.19
Ileum	0.31 ± 0.09	0.45 ± 0.12	0.36
Caecum	9.43 ± 0.97	9.70 ± 0.79	0.83
Colon	4.88 ± 0.64	3.20 ± 0.42	<0.05
Nitrogen digestibility (%)			
Caecal digestibility (%)	90.3 ± 0.9	89.9 ± 0.8	0.75
Fecal digestibility (%)	85.4 ± 0.9	86.7 ± 1.0	0.36

153 Digestibility is expressed in percentage of dietary nitrogen ingested. Values are means \pm SEMs, n = 13
154 for CS group and n = 11 for SS. Differences were tested with an unpaired t-test.

155 Amino acid digestibility

156 Caecal amino acid digestibility was measured using ^{15}N labeling (**Table 4**). In the control group,
157 weighted average amino acid digestibility was $82.8 \pm 1.3\%$. Values ranged from $77.9 \pm 1.9\%$ for
158 serine to $89.4 \pm 1.0\%$ for methionine. In the sonicated group, values varied between $77.7 \pm 1.5\%$
159 for serine to 88.9% for lysine and methionine, and the mean was $81.6 \pm 1.5\%$. There were no
160 significant differences between groups regarding amino acids or their averages. Pooled caecal
161 amino acid digestibility was $82.3 \pm 1.0\%$, on average. Compared to caecal nitrogen digestibility,
162 caecal amino acid digestibility was 8% lower regardless of the group.

163 **Table 4** Caecal amino acid digestibility of spirulina determined from ¹⁵N enrichment in rats 6 h
 164 after ingestion of control or sonicated spirulina

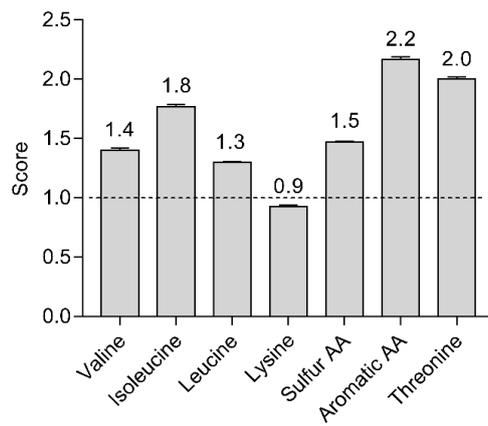
	Control Spirulina	Sonicated Spirulina	p value
Indispensable amino acid caecal digestibility (%)			
Leucine	82.3 ± 1.4	80.7 ± 1.6	0.48
Isoleucine	82.8 ± 1.5	82.5 ± 1.4	0.88
Lysine	85.6 ± 1.0	86.0 ± 1.2	0.81
Methionine	89.4 ± 1.0	87.8 ± 1.3	0.32
Phenylalanine	82.9 ± 1.2	83.7 ± 1.2	0.63
Threonine	85.6 ± 1.5	82.5 ± 1.8	0.20
Valine	80.8 ± 1.4	80.0 ± 1.8	0.72
Mean	84.2 ± 0.6	83.3 ± 0.6	0.29
Dispensable amino acid caecal digestibility (%)			
Alanine	81.9 ± 1.4	80.1 ± 1.8	0.43
Glycine	82.0 ± 1.5	79.3 ± 1.8	0.25
Glx	83.0 ± 1.3	82.5 ± 1.6	0.82
Proline	87.4 ± 1.0	87.0 ± 1.0	0.75
Serine	77.9 ± 1.9	77.3 ± 1.6	0.82
Tyrosine	83.8 ± 1.4	83.4 ± 1.4	0.85
Mean	82.6 ± 0.7	81.6 ± 0.7	0.28
Mean (all AA)	82.8 ± 1.3	81.6 ± 1.5	0.57

165 Caecal amino acid digestibility is expressed in percentage of amino acid ingested. Glx: glutamate and
 166 glutamine. Values are means ± SEMs, n = 13 for CS group and n = 11 for SS. Differences between
 167 groups were tested using an unpaired t test.

168 **Chemical Score and DIAAS**

169 The lowest chemical score was obtained for histidine (0.92). Considering the absence of any
 170 differences in digestibility between two groups, DIAAR was calculated in the pooled
 171 groups (**Figure 2**). The lowest one was observed lysine (0.9), meaning that spirulina protein
 172 was limited in lysine. Given the chemical score of histidine and the mean IAA digestibility of 83.7
 173 %, the DIAAS is expected to be 0.77 (histidine).

174 **Figure 2** DIAAR of spirulina



175

176 Sulfur AA are methionine and cysteine. Aromatic AA are tyrosine and phenylalanine. N conversion
177 factor used: 6.25. Values are means \pm SEMs, n=24

178 **Discussion**

179 This study aimed to assess nitrogen and amino acid digestibility of spirulina in a rat model
180 using ¹⁵N intrinsically labeled spirulina and to evaluate the effect of sonication on spirulina
181 digestibility. The results revealed a modest nitrogen digestibility and an even lower value for
182 amino acids. Lysine was slightly limiting, with a DIAAS of 0.9.

183 When pooling all animals, fecal nitrogen digestibility of spirulina was 86.0±0.7%. This is a
184 relatively low digestibility score compared to an animal protein like meat (97%) [6], and also
185 compared to plant protein like cooked rolled oats (95.2%) or cooked peas (89%) [10].
186 Nevertheless, spirulina nitrogen digestibility is comparable to, or lower than, fecal values found
187 in rats for some cereals including rice, wheat or oats [10]. Protein digestibility is higher with
188 protein isolates than with unpurified protein. For example, pea protein concentrate true fecal
189 digestibility is 99%, while cooked bean digestibility is only 89% [10].

190 We found a lower caecal digestibility of amino acids (82%) than caecal digestibility of nitrogen
191 (90%). This important discrepancy could be due to a non-protein nitrogen component that has
192 already been described in microalgae [3]. Spirulina analysis by the supplier consistently,
193 showed that if protein content represented 60.9% of spirulina using the Kjeldahl method, only
194 43% was based on amino acid content. The presence of urea or ammonia, for instance, could
195 have been absorbed in the caecum and colon thus leading to an overestimation of protein
196 digestibility. We can therefore consider that spirulina protein digestibility would be
197 approximately 82% rather than 86% concerning caecal amino acid digestibility, and even lower
198 if we account for possible losses at the fecal level. However, determination of amino acid
199 losses at the fecal level are considered too uncertain because of fermentation processes. The
200 value obtained with amino acids at the caecal level, rather than nitrogen, could thus be used
201 as a reference value for spirulina. Our values of amino acid digestibility are consistent with
202 those obtained in humans with the dual isotope method (85.2%) [4]. In the study by Devi et al.
203 (2018), values ranged from 77.5% for lysine to 95.3% for phenylalanine, while our values
204 ranged from 80.8% for valine to 89.4% for methionine.

205 The DIAAS score of spirulina is expected to be 0.77 of histidine although we could not
206 determine histidine digestibility due to the GC-C-IRMS chromatographic conditions. It is lower
207 than that of some plant protein sources already assessed in rats, such as soy (0.90 for sulfured
208 AA) or sunflower (0.84 for lysine) [8] but higher than rice (0.60 for lysine) [9]. It must be pointed
209 out that the spirulina DIAAR in this study were obtained using a nitrogen to protein conversion
210 factor of 6.25, which allows a direct comparison with other proteins. The DIAAR of lysine is 0.9
211 in this condition but would be 1.0 using a factor of 5.7 and the DIAAR of histidine would be
212 0.85 instead of 0.77. A conversion factor of 5.7 is situated between the value reported by
213 Teuling (5.08) [3] and that reported by Safi et al [6] (6.27). 5.7 is also the mean value of the
214 nitrogen-protein conversion factor for plant protein. As this conversion factor is more realistic
215 than the default factor 6.25, this suggests that in fact, lysine is not limited in spirulina. Finally,
216 as spirulina is not consumed as a major source of protein, even a moderate histidine and lysine
217 deficiencies are easily compensable by other sources of protein in the diet.

218 The low nitrogen digestibility of spirulina could be due to the use of whole-cell spirulina. Since
219 previous studies have shown a low nitrogen digestibility of spirulina in different experimental
220 models [11, 12], we tested if prior ultrasonication of freeze-dried spirulina could enhance
221 protein bioavailability. It has been shown that sonication can improve protein extraction
222 efficiency of microalgae by disrupting lignocellulose walls and reducing particle size [2]. Our
223 results, however, did not show any significant effect of sonication on nitrogen and amino acid
224 digestibility of spirulina. A prior study on a micro-algae, *Chorella vulgaris*, showed that while
225 ultrasonication did not statistically improve true fecal protein digestibility in rats (even if there
226 was an increase of 10%), it did improve net protein utilization and protein efficiency ratio, two
227 other protein quality indexes [5]. In our study, we found a significant decrease of 1.3% in fecal
228 nitrogen recovery with sonicated spirulina but without any significant differences in amino acid
229 digestibility. Thus our results are concordant with the study by Janczyk et al. [5], in which
230 digestibility was assessed at the fecal level, only.

231 Our study has some limitations. The first is measurement of AA digestibility at the caecal and
232 not the ileal level. The FAO proposed the rat as an alternate model to humans and pigs for
233 DIAAS determination [9]. However, there is no standardized method to determine ileal
234 digestibility in rats due to the impossibility of continuously collecting ileal effluents. We
235 developed a method that is based on a relatively short postprandial period (5 to 6h), aiming for
236 the best compromise between limiting the fermentation time and to achieving complete
237 digestion of the test meal. We have used it to measure protein digestibility of various protein
238 sources [13, 14, 6, 15] and more recently, amino acid digestibility [8]. Our values obtained in
239 this last study for milk protein, and in the present one for spirulina, are consistent with others
240 obtained in pigs [16] and humans [4], supporting the reliability of this method to provide a good
241 proxy of AA digestibility. The second limitation of our study that we did not test for the integrity
242 of cell walls after sonication. Therefore we cannot exclude absence of significant disruption of
243 cells. Lastly, the use of intrinsic labeling of dietary protein may overestimate dietary losses due
244 to tracer recycling in digestive enzymes. However, this phenomenon is limited in the context
245 of a 6h postprandial test, and furthermore, due to the successive dilutions of ¹⁵N enrichment in
246 the plasma amino acid pool and then in digestive proteins. Overall, this technique leads to a
247 minor underestimation of protein digestibility that was assessed as about 1% [17].

248 In conclusion, this study not only provides the first data on spirulina real nitrogen and amino
249 acid digestibility in rats but also highlights important differences between nitrogen and amino
250 acid caecal digestibility. We propose that the mean value of caecal individual amino acid
251 digestibility, which is around 83%, could be used as a reference. This study could not verify
252 that sonication improved digestibility.

253 **Conflict of interest and funding disclosure:** On behalf of all authors, the corresponding
254 author states that there is no conflict of interest.

255

256 **Acknowledgments:** We thank Julien Piedcoq for his technical assistance and Daniel Tomé
257 for his valuable insight on the project.

258

259 **Author's contribution:** Claire Gaudichon designed the research; Romain Tessier, Juliane
260 Calvez and Nadezda Khodorova conducted the research; Romain Tessier and Claire
261 Gaudichon analyzed data; Romain Tessier wrote the article; Juliane Calvez, Nadezda
262 Khodorova and Claire Gaudichon proofread the article; Romain Tessier and Claire Gaudichon
263 had primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final
264 manuscript.

Bibliography

1. Hoseini SM, Khosravi-Darani K, Mozafari MR (2013) Nutritional and Medical Applications of *Spirulina* Microalgae. *Mini-Rev Med Chem* 13:1231–1237. <https://doi.org/10.2174/1389557511313080009>
2. Lupatini AL, Colla LM, Canan C, Colla E (2017) Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *J Sci Food Agric* 97:724–732. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7987>
3. Teuling E, Wierenga PA, Schrama JW, Gruppen H (2017) Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *J Agric Food Chem* 65:7989–8002. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01788>
4. Devi S, Varkey A, Sheshshayee MS, et al (2018) Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *Am J Clin Nutr* 107:984–991. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy062>
5. Janczyk P, Franke H, Souffrant WB (2007) Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Anim Feed Sci Technol* 132:163–169. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.007>
6. Oberli M, Lan A, Khodorova N, et al (2016) Compared with Raw Bovine Meat, Boiling but Not Grilling, Barbecuing, or Roasting Decreases Protein Digestibility without Any Major Consequences for Intestinal Mucosa in Rats, although the Daily Ingestion of Bovine Meat Induces Histologic Modifications in the Colon. *J Nutr* 146:1506–1513. <https://doi.org/10.3945/jn.116.230839>
7. Tessier R, Ribeiro-Parenti L, Bruneau O, et al (2019) Effect of different bariatric surgeries on dietary protein bioavailability in rats. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 317:G592–G601. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00142.2019>
8. Tessier R, Khodorova N, Calvez J, et al (2020) ¹⁵N and ²H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *J Nutr* 150:450–457. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>
9. FAO Expert Consultation (2013) Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
10. Rutherford SM, Fanning AC, Miller BJ, Moughan PJ (2015) Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *J Nutr* 145:372–379. <https://doi.org/10.3945/jn.114.195438>
11. Engelen MPKJ, Com G, Anderson PJ, Deutz NEP (2014) New stable isotope method to measure protein digestibility and response to pancreatic enzyme intake in cystic fibrosis. *Clin Nutr* 33:1024–1032. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.004>
12. Kose A, Ozen MO, Elibol M, Oncel SS (2017) Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Spirulina platensis* as a nutritional supplement. *3 Biotech* 7:170. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0832-4>
13. Lacroix M, Léonil J, Bos C, et al (2006) Heat Markers and Quality Indexes of Industrially Heat-Treated [¹⁵N] Milk Protein Measured in Rats. *J Agric Food Chem* 54:1508–1517. <https://doi.org/10.1021/jf051304d>
14. Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, et al (2011) Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab* 8:52. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-52>

15. Oberli M, Douard V, Beaumont M, et al (2018) Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res* 62:1700570. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700570>
16. Deglaire A, Bos C, Tomé D, Moughan PJ (2009) Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *Br J Nutr* 102:1752. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991267>
17. Deglaire A, Moughan PJ, Airinei G, et al (2019) Intact and hydrolyzed casein lead to similar ileal endogenous protein and amino acid flows in adult humans. *Am J Clin Nutr* nqz268. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz268>

3.3. Article 3 : Mise à l'épreuve de l'utilisation de la spiruline ¹³C comme protéine de référence dans la méthode double traceur afin de déterminer la digestibilité des acides aminés de plusieurs sources protéiques chez le rat

Article à soumettre.

Résumé

Contexte et objectifs :

La troisième étude s'est intéressée à la spiruline en tant que protéine de référence et à la mise à l'épreuve de la méthode double traceur chez le rat. La spiruline ¹³C a été utilisée comme protéine de référence dans les premières études chez l'Homme qui ont décrit cette méthode, mais la pertinence de cette protéine est questionnable. En effet, la FAO préconisait que la protéine de référence soit hautement digestible, ce qui n'est pas le cas comme nous l'avons vu précédemment. Il n'existe par ailleurs pas d'étude sur la digestibilité d'une dose traceur de spiruline en conditions standard (c'est-à-dire par mesure directe de la digestibilité à partir des contenus digestifs) ni sur la répétabilité des résultats dans différents repas. Cet aspect est important car dans la méthode double traceur, la digestibilité de la spiruline est évaluée une fois et vaut pour toutes les études ultérieures. Le but de notre étude est de fournir des données de digestibilité caecale réelle chez le rat, en association avec différentes sources protéiques, et d'évaluer la validité de la méthode des ratios isotopiques.

Méthodes :

Des rats Wistar ont été nourris avec un repas test contenant comme unique source de protéine de la spiruline (n = 7), du lactosérum de chèvre (n = 8) ou un isolat de tournesol (n = 15) ainsi que 10 mg de spiruline intrinsèquement marquée au ¹³C comme dose traceur de référence. L'isolat de tournesol et le lactosérum de chèvre étaient marqués au ¹⁵N et au ²H alors que la spiruline était marquée au ¹⁵N seulement. Après 3 ou 6 heures de digestion, les rats ont été euthanasiés. La digestibilité ¹³C de la protéine et des acides aminés de spiruline ont été mesurées aux niveaux fécal et caecal respectivement. La méthode double traceur a été évaluée par mesure des enrichissements des acides aminés en ²H, ¹⁵N ou ¹³C dans le repas, les protéines plasmatiques (au lieu des acides aminés libres dans la méthode originale) et les contenus caecaux par GC-C-IRMS. Les résultats ont été comparés à ceux de digestibilité caecale des acides aminés de ces sources protéiques, précédemment décrits (**Articles 1 et 2**).

Résultats :

La digestibilité fécale du ^{13}C de la spiruline était de $90,6 \pm 0,6\%$ dans le groupe spiruline, $89,0 \pm 0,5$ dans le groupe lactosérum et $88,8 \pm 0,5\%$ dans le groupe tournesol. La digestibilité caecale moyenne des acides aminés de spiruline ^{13}C était différente selon le repas ingéré par les rats, elle était de $82,8 \pm 1,7\%$ en association avec la spiruline, $89,8 \pm 1,0\%$ avec le lactosérum et $90,4 \pm 0,4\%$ avec le tournesol. La méthode des ratios isotopiques dans les acides aminés des protéines plasmatiques n'a pas donné de résultats cohérents d'absorption des acides aminés pour les rats euthanasiés à 6h, notamment pour les repas tournesol et lactosérum. Les valeurs des rats ayant reçu le repas spiruline sont plus physiologiques mais n'étaient pas non plus en accord avec la digestibilité caecale. A 3h, les résultats des rats ayant ingéré du tournesol étaient plus acceptables. Dans les contenus caeaux, les indices d'absorption des acides aminés déterminés avec la méthode double traceur étaient proches des valeurs de digestibilité obtenues par la méthode classique dans le caecum pour le lactosérum et le tournesol mais pas pour la spiruline.

Conclusion :

La digestibilité des acides aminés ^{13}C d'une dose traceur de spiruline en association avec différentes sources de protéines n'apparaît pas répétable. Elle est de plus modérée ($<90\%$), ce qui remet en cause son utilisation en tant que protéine de référence pour la méthode double traceur. La méthode des ratios isotopiques plasmatiques n'est pas réalisable simplement chez le rat, la limite principale étant la quantité de sang prélevable de façon séquentielle. La signature isotopique dans les protéines plasmatiques ne donne pas de valeurs fiables d'absorption des acides aminés à 6h. En revanche, la méthode des ratios dans le caecum fournit des valeurs proches, et acceptables, de celles obtenues avec une méthode classique de mesure digestive. Cette approche pourrait être prometteuse pour déterminer la digestibilité iléale des acides aminés chez le rat.

Challenging the use of ¹³C spirulina as the reference protein in the dual isotope method to assess the amino acid digestibility of different protein sources in rats

Romain Tessier¹, Juliane Calvez¹, Julien Piedcoq¹, Daniel Tomé¹, Nadezda Khodorova¹,
Claire Gaudichon^{1*}

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

Address all correspondence and reprint requests to:

Claire Gaudichon, Ph.D.

Mailing address: INRA-AgroParisTech UMR914 PNCA, 16 rue Claude Bernard, F-75005
Paris, France

Email: claire.gaudichon@agroparistech.fr

Phone: 33 1 44 08 18 29

Fax: 33 1 44 08 18 56

Abbreviations:

AA: amino acid; APE: atom percent express; C: carbon; DAA: dispensable amino acid; DM: dry matter; GC-C: gas chromatography coupled to a combustion furnace; IAA: indispensable amino acid; IRMS: isotope ratio mass spectrometer; SEM: standard error of the mean; UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography

1 **Abstract**

2 Background and context:

3 The dual stable isotope method has been developed as a minimally invasive method to
4 measure the ileal digestibility of amino acids in humans. In rats, there is no standardized
5 methods for ileal digestibility determination and the dual isotope method could be useful. We
6 aimed to assess in rats the caecal digestibility of a tracer dose of ^{13}C spirulina and to challenge
7 its use as reference in this new method.

8 Methods:

9 Wistar rats were fed a single meal containing spirulina (n=7), goat whey protein (n=8) or
10 sunflower isolate (n=15) as unique protein source and 10mg of ^{13}C -labeled spirulina as the
11 tracer dose reference protein. After 3h or 6h of digestion rats were euthanized. ^{13}C spirulina
12 protein and amino acid digestibility were assessed at the caecal level. The dual isotope method
13 was evaluated by measuring ^2H , ^{15}N and ^{13}C indispensable amino acids enrichments in the
14 meal, plasma protein and caecal digestive contents. Results were compared to those of caecal
15 amino acid digestibility published in previous studies.

16 Results:

17 Mean amino acid caecal ^{13}C spirulina digestibility was lower when associated to spirulina
18 ($82.8\pm 1.7\%$) than to goat whey ($89.8\pm 1.0\%$) and sunflower ($90.4\pm 0.4\%$). The measurement of
19 isotopic enrichments in plasma protein amino acids did not result in reliable values of amino
20 acid absorption. In caecal contents, the absorption index of amino acids evaluated with the
21 dual isotope approach were close to those obtained with the classical caecal method for goat
22 whey and sunflower but not for spirulina.

23 Conclusion:

24 The absorption index of ^{13}C amino acids from the tracer dose of spirulina was not repeatable
25 when associated to different protein sources. The dual isotope approach in plasma is hardly
26 implementable in rats, the main limitation being the amount of plasma that can be collected
27 sequentially. The isotopic signatures in plasma proteins at 6h did not display reliable values of
28 AA absorption. In contrast, the isotopic approach in the caecum provided concordant values
29 with those obtained with the classical method except in the spirulina group. This approach
30 could be promising to determine the amino acid digestibility at the ileal level but warrants
31 further development.

32 **Introduction**

33 To measure ileal amino acid (AA) digestibility in humans, the FAO developed a dual isotope
34 tracer method (FAO Expert Working Group 2014). This method is minimally invasive compared
35 to the standard method using ileal tubes and is based on the measurement of two isotopic
36 enrichments in plasma and in the meal, ^2H or ^{15}N being used in the test protein and ^{13}C for a
37 reference protein of known digestibility. Because of its affordability and high content of protein,
38 ^{13}C spirulina was proposed as the reference protein.

39 There are few studies on spirulina digestibility. The first result using a dual isotope method
40 assessed the digestibility of spirulina phenylalanine to 80% (Engelen *et al.* 2014). Another
41 study using the dual isotope method showed a mean indispensable amino acid spirulina
42 digestibility of 82% with values going from 77% (lysine) to 95% (phenylalanine) (Devi *et al.*
43 2018) in humans. Those two studies compared the labeled spirulina to one or several labeled
44 free amino acid. Another study in broiler chicken (Tavernari *et al.* 2018), without isotopic
45 labeling, measured ileal AA digestibility of spirulina with values ranged from 77% for leucine to
46 85.3% for phenylalanine with an average of 81%. In rats fed ^{15}N spirulina, Tessier *et al.* (R
47 Tessier *et al.* 2020) reported a mean caecal AA digestibility of 82.8% ranging from 77.9 for
48 serine to 89.4% for methionine.

49 However, there is no assessment of the digestibility of a tracer dose and its repeatability in
50 different meal situations. This study aimed to determine in rats the protein and AA digestibility
51 of a tracer dose of intrinsically labeled ^{13}C spirulina in different conditions and to challenge its
52 use as a reference protein in the dual isotope tracer method.

53 **Materials and methods**

54 **Animal and diets**

55 This study complies with ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.* 2010). It was conducted in
56 compliance with the EU directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the
57 Ethics committee in animal experiments at INRA (N°17-20, Jouy-en-Josas, France) and the
58 French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS#11921-2017091818236657).
59 Male Wistar rats (Envigo, Huntingdon, United Kingdom) (250-275 grams, n=23) were housed
60 individually in standard conditions and under a reversed 12h light/dark cycle. They were fed a
61 standard diet (**Table 1**).

62 **Table 1.** Meal composition of standard and experimental diets

	Standard diet		Spirulina		Goat whey		Sunflower	
	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy
Protein	140.0	14.5	193.0	14.9	120.0	13.9	117.0	14.4
Soybean oil	40.0	10.4	29.0	8.2	42.5	10.8	42.0	10.7
Starch	622.4	63.1	578.0	63.2	630.0	62.5	632.7	62.1
Sucrose	100.3	10.9	106.0	12.5	110.0	11.8	111.0	11.7
Cellulose	50.0	0.0	48.0	0.0	50.0	0.0	50.0	0.0
Minerals ¹	35.0	0.0	34.0	0.0	35.0	0.0	35.0	0.0
Vitamins ¹	10.0	1.1	10.0	1.1	10.0	1.0	10.0	1.1
Others	2.3	0.0	2.0	0.0	2.5	0.0	2.3	0.0

63 Composition in mass (g/kg of dry matter (DM) and energy supply (% of energy provided). ¹ Minerals and
64 vitamins were formulated from AIN-93M (Reeves, Nielsen, et Fahey 1993). Standard and goat whey
65 diets were formulated using 6.37 as nitrogen to protein conversion factor and 5.6 was used for spirulina
66 and sunflower diets.

67 Rats were split in three groups according to the protein they received the last day, spirulina
68 (n=7), sunflower (n=8) or goat whey (n=8). These rats were euthanized at 6 hours. Another
69 group of rats receiving sunflower (n=7) but euthanized 3 hours after meal ingestion was
70 included. From day 6 to 15, rats were submitted to an alimentary pattern to accustom them to
71 consume a single small meal in the morning. This protocol consisted in two meals: a morning
72 meal of 4g of standard diet (from 8:30 to 9:00 AM) and an *ad libitum* meal for 6 hours (from

73 12:00 to 6:00 PM). Rats were fasted with free access to tap water between these two meals.
 74 On day 15, they were fed a 4g meal similar to the standard diet but containing either spirulina,
 75 sunflower isolate or goat whey as protein source (**Table 1**). Spirulina was labeled with ¹⁵N and
 76 goat whey and sunflower isolates were doubly labeled with ¹⁵N and ²H as previously described
 77 by Tessier *et al.* (Tessier et al. 2020). All meals also contained a tracer dose of 10mg
 78 intrinsically ¹³C-labeled spirulina (97%). Spirulina protein contained 48.2g/100g of
 79 indispensable amino acids (IAA) (**Table 2**).

80 **Table 2.** AA composition of spirulina

Spirulina protein			
	IAA		DAA
Histidine	1.42	Alanine	8.24
Isoleucine	5.80	Arginine	7.07
Leucine	8.81	Asx	10.76
Lysine	4.68	Cysteine	1.32
Methionine	2.12	Glx	14.17
Phenylalanine	4.77	Glycine	4.90
Threonine	5.38	Proline	3.96
Valine	6.27	Serine	5.45
		Tyrosine	4.87

81 AA composition is expressed in percentage of all amino acids. IAA: indispensable amino acid; DAA:
 82 dispensable amino acid.

83 Six hours after ingestion, rats were given a lethal dose of pentobarbital sodium (100mg/g) and
 84 euthanized by exsanguination. Luminal digestive contents (stomach, small intestine, ileum,
 85 caecum, and colon) were rinsed with NaCl solution (9‰) collected, weighed and stored at -
 86 20°C. Feces were collected and added to colonic contents. Blood was collected during the
 87 exsanguination, centrifuged to collect the plasma and stored at -20°C.

88 **Analytical methods**

89 Digestibility of the ¹³C spirulina tracer dose was assessed by measuring ¹³C recovery in
 90 digestive contents. Carbon percentage and ¹³C enrichments in digestive samples and meal
 91 were determined by an elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France)
 92 coupled with isotopic ratio mass spectrometer (IRMS) (Isoprime, GV Instrument, Manchester,

93 UK). Atropine (Thermo Electron, Milano, Italy) was used as elemental standard and L-glutamic
94 acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) was used as isotopic standards.

95 Plasma proteins were precipitated with 5-sulfosalicylic acid (10%, Sigma-Aldrich, Saint-Louis,
96 USA). After freeze-drying, plasma and digestive contents (about 100mg) proteins were
97 hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. AA were isolated using a hydrogen form resin
98 (Dowex® 50WX8 hydrogen form 100-200 mesh, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and
99 derivatized with ethyl chloroformate (Fromentin *et al.* 2012). ¹³C and ¹⁵N enrichments in plasma
100 and meal AA and ¹³C enrichment of digestive luminal AA were analyzed by gas chromatography
101 (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to an Isoprime isotope ratio mass
102 spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) via the GC5 Isoprime interface
103 (350°C). The furnace temperature was 950°C for ¹⁵N and 650°C for ¹³C. Samples (2 µl) were
104 injected in split 10 mode for ¹³C analysis and in splitless mode for ¹⁵N analysis. For ²H analysis,
105 the GC was coupled with pyrolysis reactor (1400°C) and an IRMS. The reactor in the pyrolysis
106 conversion device was conditioned daily by the injection of hexane to provide sufficient
107 pyrolysis efficiency. A 30-m Rxi-17 capillary column (Restek, Evry, France; 0.25 mm i.d. and
108 0.5 µm film thickness) was used. Samples were injected in split mode (3:1) for ²H analysis.

109 For both ¹⁵N/¹³C and ²H analyses, the inlet temperature was set at 270°C and the temperature
110 program started at 150°C, rose to 200°C at 4°C/min and then to 270°C at 25°C/min. The
111 temperature was maintained for 20 min at 270°C.

112 For AA quantification, 2mg of digestive contents and meal were hydrolyzed for 24h with HCl
113 6N at 110°C. Norvaline was used as an internal standard added before the hydrolysis.
114 Calibration standards were composed of a mixture of AA (Waters, Milford, USA) to which was
115 added norvaline. AA and standards were derivatized using the AccQ-Tag Ultra Derivatization
116 kit (Waters, Milford, USA) according to manufacturer's protocol. The AA analysis was
117 performed on an Acquity H-class Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)
118 system with a PDA detector (Waters Corporation, Milford, USA). The AA were separated using
119 AccQ-Tag amino acid C18 column (2.1×100 mm; 1.7 µm bead size; Waters Corporation,

120 Milford, USA). Column temperature was 43°C and the eluents were: AccQ-Tag Ultra Eluent A
121 (Waters Corporation, Milford, USA), 2% formic acid in acetonitrile, and MilliQ water. The
122 solvent gradients were run at 0.7 ml/min and injection volume was 1 µl.

123 The enrichments and caecal digestibility of IAA from ¹⁵N and/or ²H protein (milk, sunflower and
124 spirulina) enrichment and protein and IAA digestibility were published previously (Tessier et al.
125 2020; 2020).

126 **Calculations**

127 Exogenous carbon (C_{exo} , mmol) in digestive contents was calculated:

$$128 \quad C_{\text{exo}} = C_{\text{tot}} \times \frac{APE_s}{APE_m}$$

129 With C_{tot} , the total amount of carbon in the luminal contents and APE, the enrichment excess
130 (atom percent) of the meal (m) or the sample (s) compared to the natural enrichment. ($APE_{s/m}$
131 = $AP_{s/m}$ – natural enrichment).

132 As AA and peptides are absorbed mostly in the proximal intestine, ¹³C carbon losses were
133 determined from the carbon recovery in the distal parts of the intestine. As digestion was
134 almost complete after 6h, the losses due to residual carbon in the stomach and intestine were
135 considered as negligible. Accordingly, fecal ¹³C digestibility (in percentage of carbon ingested)
136 was determined as follow:

$$137 \quad \text{Fecal } ^{13}\text{C digestibility}_c = \frac{C_{\text{ing}} - (C_{\text{exo ileum}} + C_{\text{exo caecum}} + C_{\text{exo fecal}})}{C_{\text{ing}}} \times 100$$

138 With C_{ing} , the amount of carbon ingested with the meal by rats.

139 In the same way, caecal ¹³C digestibility was assessed with the same formula minus the C_{exo}
140 fecal:

$$141 \quad \text{Caecal } ^{13}\text{C digestibility}_c = \frac{C_{\text{ing}} - (C_{\text{exo ileum}} + C_{\text{exo caecum}})}{C_{\text{ing}}} \times 100$$

142

143 ^{13}C caecal AA digestibility was calculated using ^{13}C amino acid enrichment by GC-C-IRMS and
 144 quantification by UHPLC in the caecum:

$$145 \quad {}^{13}\text{C} \text{ caecal AA digestibility}_i = \left(1 - \frac{\text{caecal AA}_i \text{ mass} \times \frac{{}^{13}\text{C AA}_i \text{ caecum}}{{}^{13}\text{C AA}_i \text{ meal}}}{\text{ingested AA}_i \text{ mass}} \right) \times 100$$

146 Mean amino acid digestibility was weighted by the amino acid composition of spirulina.

147 For the dual isotope method, APE ratios $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ were calculated for the meal ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ meal
 148 ratio), caecal ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ caecal ratio) content and plasma protein ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ plasma). For the caecal
 149 absorption index, APE ratio were also calculated with $^2\text{H}/^{13}\text{C}$ in the meal and the caecal
 150 contents. The ^{13}C caecal AA digestibility of each rat was used for calculations.

151 In the plasma protein, IAA absorption index ($\text{IAA}_{\text{absorption plasma}}$) was calculated for each IAA (i)
 152 as follow:

$$153 \quad \text{IAA}_{\text{absorption plasma } i} = {}^{13}\text{C} \text{ caecal AA digestibility}_i \times \frac{\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{13}\text{C}} \text{ plasma ratio } i}{\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{13}\text{C}} \text{ meal ratio } i}}$$

154 In the caecum, IAA absorption index ($\text{IAA}_{\text{absorption caecum}}$) was calculated for each IAA (i) as follow:

$$155 \quad \text{IAA}_{\text{absorption caecum } i} = 100 - \left(\frac{100 - {}^{13}\text{C} \text{ caecal AA digestibility}_i}{\frac{\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{13}\text{C}} \text{ meal ratio } i}{\frac{{}^{15}\text{N}}{{}^{13}\text{C}} \text{ caecum ratio } i}} \right)$$

156 **Statistical analysis**

157 Results are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). Group effect was tested
 158 with 1-way ANOVA and differences between groups were tested with Bonferroni post-hoc test
 159 using SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Comparison between protein and mean AA
 160 digestibility, and between AA digestibility and IAA absorption index, were tested using paired
 161 or un-paired t-test. If $P < 0.05$, differences were considered statistically significant.

162 Results

163 ¹³C spirulina digestibility

164 ¹³C-spirulina digestibility was assessed only in rats euthanized after six hours. In the three
165 groups, six hours after ingestion, most of the ¹³C was found in the caecum and the colon (**Table**
166 **3**). Spirulina group had less ¹³C in the caecum than goat whey and sunflower group. Despite
167 these differences, ¹³C-spirulina fecal digestibility was not different between the three groups
168 and average ¹³C spirulina digestibility was 89.4±0.3%. By omitting fecal losses of carbon,
169 caecal digestibility of ¹³C spirulina was higher when ingested with spirulina than with goat whey
170 and sunflower (P<0.01 for both).

171 **Table 3.** ¹³C recovered in gastrointestinal contents, caecal and fecal digestibility of ¹³C spirulina

	Spirulina	Goat whey	Sunflower	P _{value}
	% of ¹³ C ingested			
Stomach	0.58 ± 0.24	0.49 ± 0.22	0.21 ± 0.17	0.44
Small Intestine	0.46 ± 0.11	0.72 ± 0.20	0.55 ± 0.20	0.60
Ileum	0.19 ± 0.07	0.56 ± 0.20	0.55 ± 0.21	0.30
Caecum	5.64 ± 0.40 a	8.68 ± 0.67 b	8.43 ± 0.36 b	<0.001
Colon	3.57 ± 0.73	1.81 ± 0.46	2.27 ± 0.52	0.11
Caecal digestibility (%)	94.2 ± 0.3 a	90.8 ± 0.8 b	91.0 ± 0.3 b	<0.001
Fecal digestibility (%)	90.6 ± 0.6	89.0 ± 0.5	88.8 ± 0.5	0.06

172 Spirulina digestibility is expressed in percentage of ¹³C ingested. Values are means ± SEMs, n=7 for
173 spirulina, n= 8 for goat whey and sunflower. Group effect was tested with a 1-way ANOVA and
174 differences between groups were tested using a Bonferroni post-hoc test. Values with different letters
175 within the same row are statistically different.

176 ¹³C spirulina AA digestibility

177 AA digestibility of ¹³C-labeled spirulina was measured in rat caecum after six hours (**Table 4**).
178 For each AA, except serine, AA digestibility was significantly when ingested with spirulina.
179 There was no difference when ingested either with sunflower or goat whey groups. When
180 ingested with spirulina, lysine was the most digestible AA in contrast to methionine that was
181 the highest digestible when ingested with for goat whey and sunflower. For all groups, the
182 lowest digestibility was observed for glycine. When associated to whey and sunflower, there
183 was no significant difference between ¹³C spirulina caecal digestibility and mean AA caecal

184 digestibility (P=0.47 and P=0.08 respectively). When associated with spirulina, there were
 185 differences (P<0.001) between the two parameters.

186 **Table 4.** Caecal AA digestibility of ¹³C- spirulina

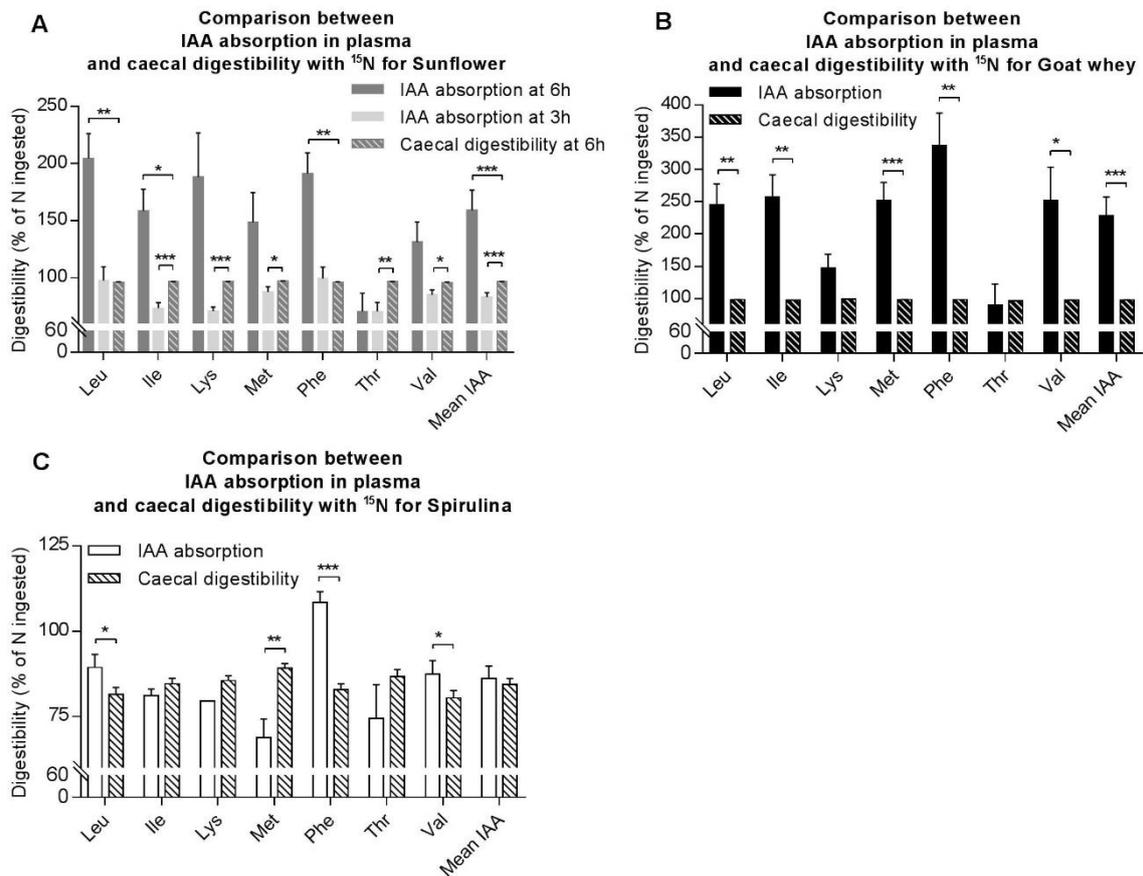
	Spirulina	Goat whey	Sunflower	P _{value}
Indispensable ¹³ C amino acids caecal digestibility (%)				
Leucine	84.2 ± 1.6 a	91.6 ± 0.8 b	91.8 ± 0.4 b	<0.001
Isoleucine	85.8 ± 1.4 a	92.1 ± 0.7 b	92.6 ± 0.3 b	<0.001
Lysine	87.8 ± 1.1 a	92.8 ± 0.7 b	92.0 ± 0.4 b	<0.001
Methionine	86.7 ± 1.3 a	93.8 ± 0.7 b	93.8 ± 0.3 b	<0.001
Phenylalanine	80.9 ± 1.9 a	89.5 ± 1.1 b	90.2 ± 0.4 b	<0.001
Threonine	87.0 ± 1.2 a	91.4 ± 0.9 b	91.5 ± 0.4 b	<0.01
Valine	84.6 ± 1.5 a	91.5 ± 0.8 b	91.9 ± 0.3 b	<0.001
Mean	85.4 ± 0.6 a	91.7 ± 0.3 b	91.7 ± 0.2 b	<0.001
Dispensable ¹³ C amino acids caecal digestibility (%)				
Alanine	79.9 ± 2.0 a	86.1 ± 1.6 b	87.1 ± 0.5 b	<0.01
Glycine	76.1 ± 2.4 a	84.8 ± 1.6 b	87.2 ± 0.6 b	<0.001
Glx	78.9 ± 2.1 a	88.9 ± 1.0 b	90.0 ± 0.4 b	<0.001
Proline	85.3 ± 1.4 a	91.8 ± 0.8 b	91.1 ± 0.4 b	<0.001
Serine	90.2 ± 1.4	92.7 ± 0.8	92.5 ± 0.6	0.15
Tyrosine	79.9 ± 2.2 a	89.8 ± 1.1 b	90.4 ± 0.5 b	<0.001
Mean	81.7 ± 1.0 a	89.0 ± 0.6 b	89.7 ± 0.4 b	<0.001
Mean (all AA)	82.8 ± 1.7 a	89.8 ± 1.0 b	90.4 ± 0.4 b	<0.001

187 Digestibility is expressed in percentage of AA ingested. Values are means ± SEMs, n=7 for spirulina, n=
 188 8 for goat whey and sunflower. Group effect was tested with a 1-way ANOVA and differences between
 189 groups were tested using a Bonferroni post-hoc test.

190 **Application of the dual-tracer method in plasma and caecum**

191 ¹⁵N or ²H/¹³C ratio enrichments were calculated in the meal, in plasma protein and in caecal
 192 contents for each IAA. The IAA absorption indexes were calculated using ¹³C spirulina caecal
 193 IAA digestibility (**Table 4**) and the results were compared with caecal IAA digestibility of ¹⁵N
 194 spirulina, ¹⁵N/²H sunflower isolate and ¹⁵N/²H goat whey previously published (Tessier et al.
 195 2020; 2020).

196 **Figure 1.** IAA absorption index in plasma and caecal digestibility of ¹⁵N in sunflower (A), goat
 197 whey (B) and spirulina (C)

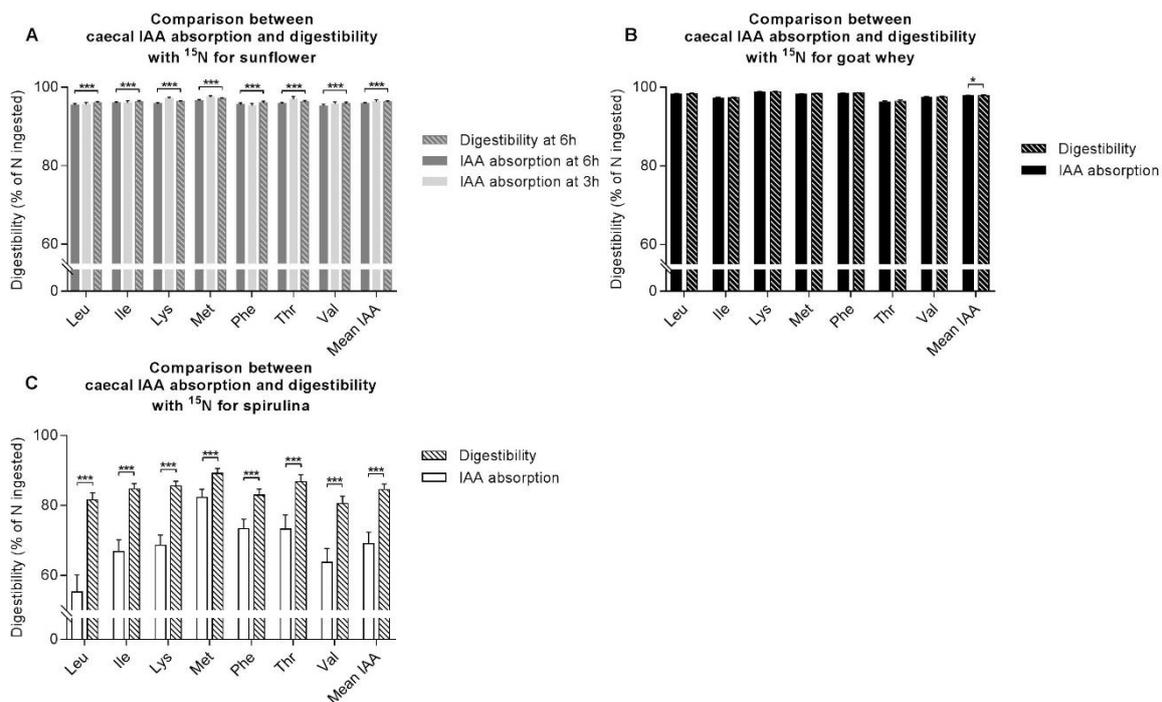


198
 199 Comparison between absorption index and caecal ¹⁵N IAA digestibility using paired t-test for spirulina,
 200 goat whey and sunflower (6h) and unpaired t-test for sunflower (3h). Values are means ± SEM, n=7 for
 201 spirulina and sunflower (3h) and n=8 for goat whey and sunflower (6h). N=1 for lysine absorption index
 202 in spirulina group. * for P<0.05, ** for P<0.01 and *** for P<0.001.

203 IAA absorption determined from isotopic enrichments in plasma protein are shown on **Figure**
 204 **1 (Table S2)**. For rats euthanized six hours after ingestion, absorption index values were
 205 aberrant for sunflower and goat whey groups with values superior to 100% and a high
 206 variability. In the spirulina group, values were in physiological ranges except for phenylalanine.
 207 However, they were higher than those obtained with the direct measurement (**Table S1**) for
 208 leucine and valine but lower for the others IAA. In average, there was no difference between
 209 plasma IAA absorption and caecal IAA digestibility (P=0.63) and the average value without
 210 phenylalanine (80.8±2.3%) was lower but not different of the mean caecal IAA digestibility
 211 (84.5±0.7%, P=0.09). IAA absorption index was also determined in rats euthanized three hours
 212 after the sunflower meal ingestion. For these rats, IAA absorption values were physiologically

213 acceptable but they were lower than ^{15}N caecal digestibility values, except for phenylalanine
 214 and leucine. In average, there was a 12.4% difference between plasma IAA absorption index
 215 at 3 h and caecal IAA digestibility ($P<0.001$).

216 **Figure 2.** Caecal IAA absorption index and digestibility of ^{15}N for sunflower (A), goat whey (B)
 217 and spirulina (C)



218

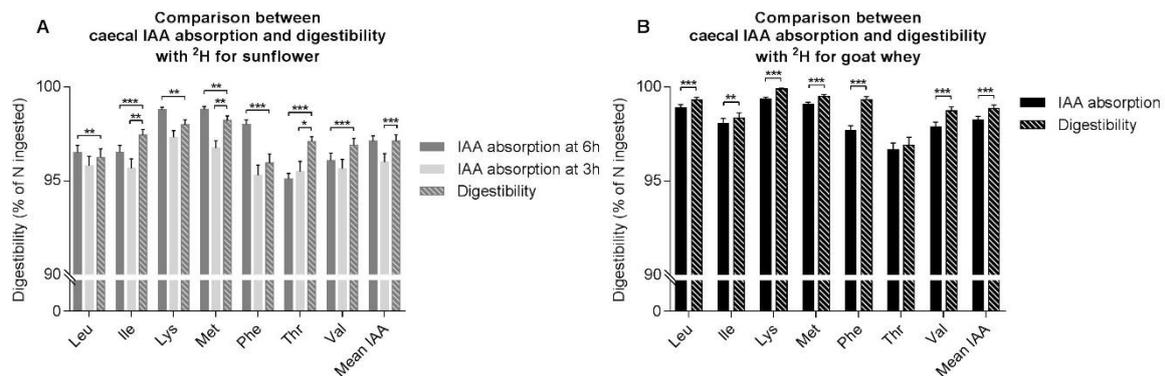
219 Comparison between absorption index and caecal ^{15}N IAA digestibility using paired t-test for spirulina,
 220 goat whey and sunflower (6h) and unpaired t-test for sunflower (3h). Values are means \pm SEM, $n=7$ for
 221 spirulina and sunflower (3h) and $n=8$ for goat whey and sunflower (6h). * for $P<0.05$, ** for $P<0.01$ and
 222 *** for $P<0.001$.

223 The principle of the dual isotope method was also used to calculate the relative AA losses in
 224 the caecum and thus caecal AA absorption index, for ^{15}N (Figure 2, Table S3) and ^2H labeling
 225 (Figure 3, Table S4). Using ^{15}N values 6 h after meal ingestion, there was a statistical
 226 difference between caecal digestibility and caecal absorption index ($P<0.001$), for each IAA
 227 and in average for spirulina and sunflower but not for goat whey, except in average. For
 228 sunflower and goat whey, the discrepancy between plasma IAA absorption and caecal IAA
 229 digestibility was low (0.5% and 0.1% respectively). For spirulina, caecal digestibility was higher
 230 than caecal absorption index and the difference was important (15.5% in average). At 3h, there
 231 was no difference ($P=0.99$) between IAA absorption indexes and caecal IAA digestibility after

232 six hours. Moreover, there was no differences between IAA absorption indexes for sunflower
 233 between 3h and 6h.

234 With deuterium, mean caecal IAA absorption values were not statistically different from mean
 235 caecal IAA digestibility for sunflower at 6h (0.2%, P=0.99), but there was differences for each
 236 individual AA (**Figure 3**). At 3h, there was differences between caecal IAA absorption and
 237 digestibility for isoleucine, methionine, threonine and in average (2.9% difference, P<0.001).
 238 When using the dual tracer method in caecum, there was no differences between the two times
 239 of digestion for 4 of the 7 IAA determined, but in average there was a 1.1% difference
 240 (P<0.001). For goat whey, caecal IAA absorption values were statistically different from caecal
 241 IAA digestibility in average (1.1%) and for each IAA except threonine (P=0.27).

242 **Figure 3.** Caecal IAA absorption index and digestibility of ²H for sunflower (A) and goat whey
 243 (B)



244

245 Comparison between absorption index and caecal ²H IAA digestibility using paired t-test for goat whey
 246 and sunflower (6h) and unpaired t-test for sunflower (3h). Values are means ± SEM, n=7 for sunflower
 247 (3h) and n=8 for goat whey and sunflower (6h). * for P<0.05, ** for P<0.01 and *** for P<0.001.

248 **Discussion**

249 This study aimed to evaluate in rats the use of ^{13}C -labeled spirulina as the tracer dose of
250 reference protein in the dual isotope method and its reliability for the determination of AA
251 digestibility of different ^{15}N and/or ^2H -labeled dietary protein. For this purpose, we determined
252 absorption indexes using the dual tracer ratio principle and we compared the results to values
253 of $^{15}\text{N}/^2\text{H}$ caecal digestibility. Results showed that protein and AA digestibility of the tracer dose
254 of ^{13}C spirulina could vary when associated to different protein. The absorption indexes
255 obtained from plasma protein isotopic enrichments were not relevant. In contrast, we found
256 that the dual isotope principle could be convenient to determine AA losses and thus AA real
257 digestibility in caecal digestive contents.

258 **^{13}C spirulina caecal digestibility**

259 We found that ^{13}C -spirulina digestibility was $89.4 \pm 0.3\%$, a value that is higher than the value
260 we previously found in similar conditions using ^{15}N spirulina in rats ($85.4 \pm 0.9\%$) (Tessier *et al.*
261 *2020*). This could suggest that there is an isotope effect (^{13}C vs ^{15}N) for the determination
262 of the caecal digestibility, perhaps due to the recycling of ^{15}N through transamination process
263 in caecal microbiota. However, we had reported little differences between ^{15}N and ^2H for the
264 determination of caecal AA digestibility of whey and sunflower isolates in rats (R Tessier *et al.*
265 *2020*) while ^2H is almost not exchanged through transamination. As whey and sunflower are
266 highly digestible, the impact of an isotopic effect related to microbial transamination may be
267 negligible but such an impact could be higher for a lower digestible protein like spirulina.
268 Digestibility of spirulina obtained in previous studies was also lower than the value determined
269 in the present study (Devi *et al.* 2018; Kashyap *et al.* 2019; Tavernari *et al.* 2018). Implementing
270 the dual tracer isotope method in which ^{13}C spirulina AA digestibility was assessed with ^2H free
271 AA as reference (Devi *et al.* 2018), mean IAA ileal digestibility was 82.2% with values going
272 from 77.5% for lysine to 95.3% for phenylalanine. Ileal IAA digestibility was also determined in
273 broiler chicken (Tavernari *et al.* 2018) and was 81.2% with a smaller difference between the
274 extreme AA values (77.1% for leucine and 85.3% for phenylalanine). One possibility to explain

275 the discrepancies between the present study and others is a variability between spirulina
276 batches from the suppliers; accordingly, we have observed differences of composition in
277 protein and fibers.

278 **Implementation of the dual isotope method in plasma protein in rats**

279 In humans, the dual isotope method requires sequential blood sampling to obtain plasmatic
280 kinetics of isotopic enrichment (FAO Expert Working Group 2014; Devi *et al.* 2018). To
281 implement the dual isotope method in rats, we initially made sequential blood sampling at the
282 tail vein. However, as the amount of plasma was not enough to measure two isotope
283 enrichments, we euthanized a group of rats 3h after the meal ingestion. Moreover, we
284 hypothesized that due to the absence of repeated meals that is required for this method,
285 plasma protein could trap the isotopic signatures of free plasma AA prior to the sampling. After
286 six hours of digestion, ¹⁵N IAA absorption indexes calculated with the dual isotope method
287 were aberrant for goat whey and sunflower, except for threonine, with values far above 100%.
288 In contrast, for spirulina group, absorption values were physiologically relevant although they
289 were different from those obtained with the direct measurement of ¹⁵N AA caecal recovery.
290 Half of the plasma IAA absorption indexes were higher than digestibility values and half were
291 lower. In the 3 h group (in the sunflower group only), absorption values were in physiological
292 ranges, ranging from 70.4% for threonine to 99.3% to phenylalanine. Nevertheless, they were
293 inferior to those obtained with ¹⁵N caecal digestibility, except for phenylalanine and leucine.
294 For all groups, variability of plasma absorption indexes was high, probably due to
295 interindividual variation of absorption kinetics and analytical errors. Indeed, the ratio method
296 has a major drawback in multiplying the analytical uncertainties of the 4 enrichment values.
297 Moreover, in the spirulina group, some rats rejected a part of their test meal, leading to
298 variations in protein and ¹³C spirulina ingestion. In average, they ate 75.9±8.2% of the spirulina
299 meal while goat whey rats ate 91.6±2.8% and sunflower rats ate 94.3±1.6%.

300 To resume, these results show that the use of dual isotope method is not appropriate in rats,
301 because of the inability to sample enough blood sequentially along the experiment time. The

302 measurement of isotopic signatures in plasma protein was tested as an option, but it seems
303 that a postprandial time of 6 h was too long. A shorter time of 3 h gave better results but the
304 absorption indexes differed from values of caecal digestibility. Further experiments, although
305 cumbersome, could be useful to determine the most relevant time after the meal to measure
306 the enrichment ratios in plasma proteins. Deuterium enrichment was not used for the
307 determination of isotopic ratio in plasma protein, because first results showed no ^2H enrichment
308 after 6 hours of digestion.

309 **Determination of IAA absorption indexes in caecal contents**

310 We also evaluated the principle of the dual isotope method to determine the IAA absorption
311 index in the caecal samples. The rationale for such an approach is that the classical method
312 is quantitative and requires to determine the amount of digesta during all the postprandial
313 period. The two possibilities to determine the total amount of effluents is either to recover all
314 the digesta or to use a non-absorbable marker. Our method consists in collecting the caecal
315 digesta in which the non-digested molecules accumulate, but the limit is that digestibility is
316 determined at the caecal and not at the ileal level. The use of a non-absorbable marker for
317 ileal determination was not possible in our study because the amount of ileal digesta is too low
318 to measure isotopic enrichments as well as the marker. In contrast to the classical method for
319 the determination of digestibility, the dual isotope principle is not quantitative but qualitative
320 relatively to the reference protein. We thus challenged this principle to calculate the amount of
321 AA losses comparatively to the ^{13}C AA spirulina losses, knowing their real digestibility. In
322 contrast to plasma protein, we could determine both ^{15}N and ^2H enrichments in AA as
323 previously published (Tessier *et al.* 2020; 2020). With ^{15}N , spirulina caecal absorption index
324 was 69.0% in average, significantly lower than ^{15}N caecal digestibility. Interestingly, for goat
325 whey and sunflower, there was a very good agreement between the absorption indexes and
326 the digestibility values. For sunflower in which we had 2 post-digestion times, 3 and 6 h,
327 absorption indexes were similar between both times (0.5%) for each AA. For ^2H , data are
328 available for sunflower and milk only in contrasts to spirulina was only labeled with ^{15}N . As for

329 ¹⁵N, caecal absorption indexes were close to the digestibility value, but slightly lower for 3h
330 digestion time (1.1% difference with 6h and with digestibility value) in the sunflower group.
331 Although some differences between both methods were statistically significant, especially in
332 paired comparisons, we consider that these differences are physiologically acceptable. This
333 shows that the dual isotope method in caecal contents is a good proxy of amino acid caecal
334 digestibility, and that method could be interestingly developed for the determination of ileal
335 digestibility.

336

337 In conclusion, these results showed of the dual isotope method in plasma is hardly
338 implementable in rats. We also found that ¹³C spirulina may not be appropriate as the reference
339 protein due to a modest digestibility and a lack of repeatability of digestibility values. In contrast
340 to plasma absorption indexes, using the ratio methods in ileal digesta, after analytical
341 optimization to face the problem of the low amount of dry matter present at this level, could be
342 promising to assess the AA digestibility on a single digestive sample.

343

344 CG, DT: designed the research; RT, JC, NK, JP: conducted the research; RT, CG: analyzed
345 data; RT, CG: wrote the paper; RT, CG: had primary responsibility for final content; and all
346 authors: read and approved the final manuscript.

Bibliography

- Deglaire, A, C Bos, D Tomé, et P J Moughan. 2009. « Ileal Digestibility of Dietary Protein in the Growing Pig and Adult Human ». *British Journal of Nutrition* 102 (12): 1752. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991267>.
- Devi, S, A Varkey, M S Sheshshayee, T Preston, et A V Kurpad. 2018. « Measurement of Protein Digestibility in Humans by a Dual-Tracer Method ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 107 (6): 984-91. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy062>.
- Engelen, M P K J, G Com, P J Anderson, et N E P Deutz. 2014. « New Stable Isotope Method to Measure Protein Digestibility and Response to Pancreatic Enzyme Intake in Cystic Fibrosis ». *Clinical Nutrition* 33 (6): 1024-32. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2013.11.004>.
- FAO Expert Working Group. 2014. *Research Approaches and Methods for Evaluating the Protein Quality of Human Foods*. <http://www.fao.org/3/a-i4325e.pdf>.
- Fromentin, C, P Sanders, F Nau, M Anton, G Fromentin, D Tomé, J-N Thibault, et C Gaudichon. 2012. « A Pilot Study for the Intrinsic Labeling of Egg Proteins with ¹⁵N and ¹³C ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 26 (1): 43-48. <https://doi.org/10.1002/rcm.5291>.
- Kashyap, S, N Shivakumar, A Varkey, T Preston, S Devi, et A V Kurpad. 2019. « Co-Ingestion of Black Tea Reduces the Indispensable Amino Acid Digestibility of Hens' Egg in Indian Adults ». *The Journal of Nutrition* 149 (8): 1363-68. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz091>.
- Kilkenny, Carol, William J Browne, Innes C Cuthill, Michael Emerson, et Douglas G Altman. 2010. « Animal Research: Reporting in Vivo Experiments: The ARRIVE Guidelines ». *British Journal of Pharmacology*, juin, 3. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x>.
- Nørgaard, J V, J A Fernández, et H Jørgensen. 2012. « Ileal Digestibility of Sunflower Meal, Pea, Rapeseed Cake, and Lupine in Pigs ». *Journal of Animal Science* 90 (suppl_4): 203-5. <https://doi.org/10.2527/jas.53919>.
- Reeves, Philip G., Forrest H. Nielsen, et George C. Fahey. 1993. « AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet ». *The Journal of Nutrition* 123 (11): 1939-51. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>.
- Tavernari, F D C, L F Roza, D Surek, C Sordi, M L B D Silva, L F T Albino, M J Migliorini, D Paiano, et M M Boiago. 2018. « Apparent Metabolisable Energy and Amino Acid Digestibility of Microalgae *Spirulina Platensis* as an Ingredient in Broiler Chicken Diets ». *British Poultry Science* 59 (5): 562-67. <https://doi.org/10.1080/00071668.2018.1496401>.
- Tessier, R, J Calvez, N Khodorova, J Piedcoq, D Tomé, et C Gaudichon. 2020. « Real protein and amino acid digestibility of ¹⁵N spirulina in rats ». (*unpublished*), mars 2020.
- Tessier, R, N Khodorova, J Calvez, R Kapel, A Quinsac, J Piedcoq, D Tomé, et C Gaudichon. 2020. « ¹⁵N and ²H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey ». *The Journal of Nutrition* 150 (3): 450-57. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>.

347 **Supplemental Tables**

348 **Table S1.** Caecal IAA digestibility of spirulina, goat whey isolate and sunflower isolate using
 349 ¹⁵N and ²H labeling

	Spirulina		Goat whey isolate		Sunflower isolate	
	¹⁵ N	² H	¹⁵ N	² H	¹⁵ N	² H
Indispensable amino acids caecal digestibility (% of ingested)						
Leucine	81.6 ± 2.0	99.3 ± 0.1	98.3 ± 0.2	96.3 ± 0.5	96.0 ± 0.3	
Isoleucine	84.7 ± 1.6	98.4 ± 0.3	97.3 ± 0.2	97.4 ± 0.2	96.3 ± 0.3	
Lysine	85.5 ± 1.4	99.9 ± 0.0	98.8 ± 0.1	98.0 ± 0.3	96.4 ± 0.2	
Methionine	89.2 ± 1.4	99.5 ± 0.1	98.4 ± 0.1	98.2 ± 0.2	97.1 ± 0.2	
Phenylalanine	82.9 ± 1.7	99.3 ± 0.2	98.5 ± 0.1	96.0 ± 0.5	96.1 ± 0.4	
Threonine	86.8 ± 2.0	96.9 ± 0.4	96.4 ± 0.3	97.1 ± 0.2	96.3 ± 0.3	
Valine	80.5 ± 2.1	98.7 ± 0.2	97.5 ± 0.2	96.9 ± 0.4	95.8 ± 0.4	
Mean	84.5 ± 0.7	98.9 ± 0.2	97.9 ± 0.1	97.1 ± 0.2	96.3 ± 0.1	

350 Adapted from (R Tessier *et al.* 2020; 2020). Values are means ± SEM, n=7 for spirulina, and n=8 for whey
 351 and sunflower isolate.

352 **Table S2.** IAA absorption index in plasma

	Spirulina		Goat Whey		Sunflower (3h)	Sunflower (6h)	
	¹⁵ N IAA absorption in plasma	¹⁵ N caecal IAA digestibility	¹⁵ N IAA absorption in plasma	¹⁵ N caecal IAA digestibility	¹⁵ N IAA absorption in plasma	¹⁵ N caecal IAA digestibility	¹⁵ N caecal IAA digestibility
Leu	89.4 ± 3.8*	81.6 ± 2.0	244.7 ± 32.8**	98.3 ± 0.2	97.3 ± 12.1	204.6 ± 21.6**	96.0 ± 0.3
Ile	81.2 ± 1.8	84.7 ± 1.6	256.9 ± 34.7**	97.3 ± 0.2	73.3 ± 4.8***	158.5 ± 19.1*	96.3 ± 0.3
Lys	79.5	85.5 ± 1.4	147.3 ± 21.5	98.8 ± 0.1	70.6 ± 3.9***	188.1 ± 38.6	96.4 ± 0.2
Met	69.0 ± 5.4**	89.2 ± 1.4	251.7 ± 27.9***	98.4 ± 0.1	87.6 ± 4.5*	148.6 ± 25.8	97.1 ± 0.2
Phe	108.5 ± 3.1***	82.9 ± 1.7	337.2 ± 50.4**	98.5 ± 0.1	99.3 ± 9.9	191.1 ± 18.3**	96.1 ± 0.4
Thre	74.6 ± 9.8	86.8 ± 2.0	89.5 ± 33.1	96.4 ± 0.3	70.4 ± 8.0**	70.4 ± 15.9	96.3 ± 0.3
Val	87.4 ± 4.0	80.5 ± 2.1	252.1 ± 51.5*	97.5 ± 0.2	85.1 ± 4.1*	131.2 ± 17.7	95.8 ± 0.4
Mean	85.7 ± 2.6	84.5 ± 0.7	228.1 ± 16.8***	97.9 ± 0.1	83.9 ± 3.2***	159.2 ± 10.2***	96.3 ± 0.1

353 Comparison between plasma IAA absorption index and caecal ¹⁵N IAA digestibility using paired t-test. *
 354 for P<0.05, ** for P<0.01, *** for P<0.001. Values are means ± SEM, n=7 for spirulina and sunflower
 355 (3h) and n=8 for goat whey and sunflower.

356 **Table S3.** IAA absorption index in caecum using ¹⁵N

	Spirulina		Goat Whey		Sunflower (3h)	Sunflower (6h)	
	¹⁵ N IAA absorption in caecum	¹⁵ N caecal IAA digestibility	¹⁵ N IAA absorption in caecum	¹⁵ N caecal IAA digestibility	¹⁵ N IAA absorption in caecum	¹⁵ N caecal IAA digestibility	
Leu	55.2 ± 4.9***	81.6 ± 2.0	98.2 ± 0.2	98.3 ± 0.2	95.6 ± 0.6	95.5 ± 0.4***	96.0 ± 0.3
Ile	66.7 ± 3.4***	84.7 ± 1.6	97.2 ± 0.3	97.3 ± 0.2	96.1 ± 0.5	96.0 ± 0.3***	96.3 ± 0.3
Lys	68.5 ± 3.0***	85.5 ± 1.4	98.8 ± 0.1	98.8 ± 0.1	97.1 ± 0.4	95.8 ± 0.3***	96.4 ± 0.2
Met	82.3 ± 2.3***	89.2 ± 1.4	98.2 ± 0.1	98.4 ± 0.1	97.5 ± 0.4	96.6 ± 0.2***	97.1 ± 0.2
Phe	73.3 ± 2.7***	82.9 ± 1.7	98.4 ± 0.1	98.5 ± 0.1	95.3 ± 0.6	95.6 ± 0.4***	96.1 ± 0.4
Thre	73.2 ± 4.1***	86.8 ± 2.0	96.1 ± 0.4	96.4 ± 0.3	96.9 ± 0.8	95.8 ± 0.3***	96.3 ± 0.3
Val	63.7 ± 4.0***	80.5 ± 2.1	97.4 ± 0.2	97.5 ± 0.2	95.7 ± 0.6	95.2 ± 0.5***	95.8 ± 0.4
Mean	69.0 ± 1.7***	84.5 ± 0.7	97.8 ± 0.1*	97.9 ± 0.1	96.3 ± 0.2	95.8 ± 0.1***	96.3 ± 0.1

357 Comparison between caecal ¹⁵N IAA absorption index and caecal ¹⁵N IAA digestibility using paired t-
 358 test. * for P<0.05, ** for P<0.01, *** for P<0.001. Values are means ± SEM, n=7 for spirulina and
 359 sunflower (3h) and n=8 for goat whey and sunflower.

360

361 **Table S4.** IAA absorption index in caecum using ²H

	Goat Whey		Sunflower (3h)	Sunflower (6h)	
	² H IAA absorption in caecum	² H caecal IAA digestibility	² H IAA absorption in caecum	² H caecal IAA digestibility	
Leu	98.9 ± 0.2***	99.3 ± 0.1	95.8 ± 0.5	96.5 ± 0.4**	96.3 ± 0.5
Ile	98.1 ± 0.3**	98.4 ± 0.3	95.7 ± 0.5**	96.5 ± 0.4***	97.4 ± 0.2
Lys	99.4 ± 0.1***	99.9 ± 0.0	97.3 ± 0.4	98.8 ± 0.3*	98.0 ± 0.3
Met	99.1 ± 0.1***	99.5 ± 0.1	96.8 ± 0.4**	98.8 ± 0.1**	98.2 ± 0.2
Phe	97.7 ± 0.3***	99.3 ± 0.2	95.3 ± 0.5	98.0 ± 0.2***	96.0 ± 0.5
Thre	96.7 ± 0.4	96.9 ± 0.4	95.5 ± 0.5*	95.1 ± 0.3***	97.1 ± 0.2
Val	97.9 ± 0.2***	98.7 ± 0.2	95.7 ± 0.5	96.1 ± 0.4***	96.9 ± 0.4
Mean	98.2 ± 0.1***	98.9 ± 0.2	96.0 ± 0.2***	97.1 ± 0.2	97.1 ± 0.2

362 Comparison between caecal ²H IAA absorption index and caecal ²H IAA digestibility using paired t-test.
 363 * for P<0.05, ** for P<0.01, *** for P<0.001. Values are means ± SEM, n=7 for spirulina and sunflower
 364 (3h) and n=8 for goat whey and sunflower

365

3.4. Article 4 : Mesure iléale et méthode double traceur pour déterminer la digestibilité des acides aminés et la qualité protéique de biscuits de tournesol marqués au ¹⁵N chez des volontaires sains.

Article à soumettre.

Résumé

Contexte et objectifs :

La dernière étape ce travail était de déterminer la qualité de l'isolat de tournesol chez l'Homme et de valider la méthode double traceur par comparaison avec la digestibilité iléale. Un des objectifs du projet ProDige étant de produire des aliments protéiques à partir des isolats de protéoléagineux, l'isolat de tournesol a été incorporé dans des biscuits. Pour déterminer la qualité protéique de l'isolat chez des volontaires sains, la digestibilité iléale a été mesurée à l'aide de sondes naso-iléales, et les pertes métaboliques ont été évaluées pour déterminer l'UPPN. Les résultats de digestibilité iléale ont été comparés aux résultats d'absorption des acides aminés dans le plasma par la méthode double traceur. A la lumière de nos résultats précédents, nous avons utilisé un mélange d'acides aminés libres ¹³C comme « protéine » de référence, car supposée hautement digestible. En raison de la cuisson du biscuit, les acides aminés libres ¹³C ont été incorporés dans du chocolat ou dans de la compote de pommes.

Méthodes :

Douze volontaires sains ont été intubés avec une sonde naso-iléale. Ils reçurent pendant 4h, 9 repas composés de biscuits contenant, comme source de protéines, un isolat protéique de tournesol intrinsèquement marqué au ¹⁵N, ainsi que des doses d'acides aminés provenant d'algues et marqués au ¹³C. Ces acides aminés étaient inclus, soit dans un chocolat noir (n = 7) soit dans de la compote de pomme (n = 5). Pendant les 8 heures suivant l'ingestion du premier repas les contenus digestifs, le sang et l'urine étaient collectés. L'azote, le carbone et les enrichissements en ¹⁵N et ¹³C des contenus digestifs ont été analysés par EA-IRMS. Les acides aminés ont été quantifiés par UHPLC dans les contenus iléaux, ainsi que leurs enrichissements en ¹⁵N et ¹³C par GC-C-IRMS, pour mesurer les digestibilités iléales réelles du tournesol. Les enrichissements isotopiques ont aussi été analysés dans les acides aminés plasmatiques afin de déterminer les indices d'absorption des acides aminés indispensables par la méthode double traceur. Les indices d'absorption des acides aminés indispensables ont été calculés pour les deux isotopes en utilisant les aires sous la courbe ainsi qu'en utilisant les moyennes d'enrichissements des plateaux isotopiques. Les enrichissements en ¹⁵N ont été mesurés dans les pools azotés du plasma et de l'urine pour calculer l'UPPN. Le DIAAS du tournesol a été calculé avec plusieurs facteurs de conversion de l'azote en protéines. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes associées à l'erreur standard.

Résultats :

La digestibilité iléale réelle du tournesol était de $86,0 \pm 4,0\%$ lorsqu'il était associé au chocolat et de $88,9 \pm 5,2\%$ associé à la compote. La digestibilité iléale des acides aminés était respectivement de $83,1 \pm 5,6\%$ et de $85,3 \pm 8,6\%$ avec une grande amplitude entre les acides aminés. Le DIAAS était de 0,78 (lysine) avec 6,25 comme facteur de conversion. L'UPPN de l'isolat de tournesol était de $72,2 \pm 3,7\%$ associé au chocolat et de $72,3 \pm 4,5\%$ associé à la compote. L'utilisation du chocolat comme vecteur des acides aminés libres ^{13}C induisait une diminution du flux d'azote endogène, de la digestibilité moyenne des acides aminés indispensables ainsi qu'un ralentissement de l'apparition de l'azote exogène dans les acides aminés et l'urée plasmatiques. La digestibilité des acides aminés libres ^{13}C était de 98,1% en moyenne, pour les deux vecteurs. Les résultats obtenus avec la méthode double traceur étaient acceptables sauf pour la méthionine et la phénylalanine. En moyenne, les indices d'absorption étaient inférieurs de 13 % à la digestibilité iléale, et associés à une forte variabilité. L'utilisation des aires sous courbes donnait des résultats plus proches de la digestibilité iléale que le calcul des enrichissements au niveau du plateau isotopique.

Conclusion :

La qualité de l'isolat protéique incorporé dans un biscuit est caractérisée par une digestibilité relativement faible et par une insuffisance en lysine mais aussi par une bonne utilisation postprandiale nette. La méthode double traceur a été utilisée avec deux méthodes de calcul des ratios plasmatiques, et le calcul des aires sous courbes des enrichissements isotopiques, recommandé par la FAO, semble plus fiable que l'utilisation des plateaux isotopiques. Le vecteur utilisé pour les acides aminés ^{13}C semble avoir un effet sur les résultats avec une tendance du chocolat à diminuer la biodisponibilité des acides aminés du repas test, probablement lié à son contenu élevé en polyphénols. L'adéquation entre les indices d'absorption des acides aminés indispensables et leur digestibilité iléale était variable selon les acides aminés considérés.

Ileal sampling and dual tracer isotope methods for amino acid digestibility and protein quality of ¹⁵N sunflower biscuits in healthy humans

Romain Tessier¹, Juliane Calvez¹, Gheorghe Airinei¹, Nadezda Khodorova¹, Romain Kapel², Alain Quinsac³, Olivier Galet⁴, Julien Piedcoq¹, Robert Benamouzig¹, Daniel Tomé¹, Claire Gaudichon^{1*}

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

² LRGP Unité Mixte de Recherche CNRS 7274, Université de Lorraine, Plateforme SVS, Vandoeuvre-les-Nancy, France

³ Terres Inovia, 11, rue Monge, 33600 Pessac, France

⁴ Avril, Paris, France

Address all correspondence and reprint requests to:

Claire Gaudichon, Ph.D.

Mailing address: INRA-AgroParisTech UMR914 PNCA, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Email: claire.gaudichon@agroparistech.fr

Phone: 33 1 44 08 18 29

Fax: 33 1 44 08 18 56

Abbreviations:

AA: amino acid; Asx: aspartate and asparagine; AP: atom percent; APE: atom percent excess; AUC: area under the curve; BMI: body mass index; C: carbon; CS: chemical score; DAA: dispensable amino acid; EA: elemental analyzer; Glx: glutamate and glutamine; IAA: indispensable amino acid; IRMS: isotope ratio mass spectrometer; N: nitrogen; NPPU: net post prandial utilization; PEG: polyethylene glycol; SD: standard deviation; TBW: total body water

1 **Abstract**

2 Background and context:

3 In the search for new protein sources, sunflower is a good candidate in regards of the protein
4 content of oilseed coproduct. There is also the need of minimally invasive method to measure
5 amino acid digestibility in humans. This study aimed to assess the quality of a sunflower isolate
6 protein and amino acid (AA) and to compare results of ileal digestibility with values obtained
7 with the recently developed dual isotope method.

8 Methods:

9 Twelve healthy volunteers were intubated with a naso-ileal tube. They received during 4 h,
10 nine meals composed of 13 g of biscuits containing intrinsically labeled ^{15}N sunflower protein
11 isolate and a dose of ^{13}C labeled algal AA mixed either in a dose of dark chocolate (chocolate,
12 $n=7$) or in an apple compote (compote, $n=5$). Ileal digestive contents, blood and urine were
13 sampled over 8 h after the first meal ingestion. ^{15}N and ^{13}C enrichments of protein and AA were
14 measured in digestive contents and in plasma. We assessed ileal digestibility of sunflower
15 isolate and algal AA as well as indispensable amino acids (IAA) absorption indexes obtained
16 with the dual tracer method. Digestible indispensable amino acid score (DIAAS) of sunflower
17 isolate was calculated. ^{15}N enrichments were measured in plasma and urine nitrogen pools to
18 determine net post prandial protein utilization (NPPU).

19 Results:

20 Sunflower protein isolate real ileal digestibility (RID) was $86.0\pm 4.0\%$ when associated with
21 chocolate and $88.9\pm 5.2\%$ associated with compote and mean ileal AA digestibility was
22 $83.1\pm 5.6\%$ and $85.3\pm 8.6\%$ respectively with a high amplitude among AA. DIAAS was 0.78
23 (lysine). Pooled NPPU was $72.4\pm 3.8\%$ and there were no differences between groups except
24 for plasma nitrogen kinetics. IAA digestibility obtained with the dual isotope method was close
25 to ileal sampling except for methionine and phenylalanine. Results for methionine and
26 phenylalanine were aberrant.

27 Conclusion:

28 The quality of sunflower protein isolate incorporated in a biscuit is characterized by a moderate
29 digestibility and lysine insufficiency, but a good NPPU. We implemented the dual isotope
30 method using different conditions. The vector of free ^{13}C amino acid seemed to influence the
31 results, with a trend for the chocolate to lower sunflower AA bioavailability. Results from ^{15}N
32 IAA absorption indexes and ileal sampling are in relative good adequacy but depends on the
33 amino acids.

34

35 **Keywords:** Stable isotopes, protein metabolism, clinical study, dual isotope method, plant
36 protein

37 **Introduction**

38 Due to the increased population and protein demand worldwide, there is a need for new protein
39 sources. Oilseeds like sunflower are good candidates as oil coproducts, oil cake, are rich in
40 protein, about 30% (w/w) (1) but their quality needs to be assessed for human.

41 Protein quality can be assessed in humans by their bioavailability (digestibility, nitrogen
42 retention) (2) or by the amino acid scoring approach that corrects the chemical score of AA by
43 their digestibility (3). Because of colonic fermentation, digestibility must be preferentially
44 determined in the ileum (4) and as digestibility varies according to AA (5), individual AA ileal
45 digestibility is preferred. Ileal digestibility can be measured in humans by using a naso-ileal
46 tube but this is invasive and expensive. An alternative minimally invasive method based on the
47 measurement of isotope enrichments in plasma AA after the ingestion of the tested protein
48 labeled with ^{15}N or ^2H together with a ^{13}C reference protein of known digestibility has been
49 proposed by the FAO (6). This dual tracer method has already been implemented in humans
50 (7–12) but it needs validation against the standard direct ileal determination of AA digestibility.

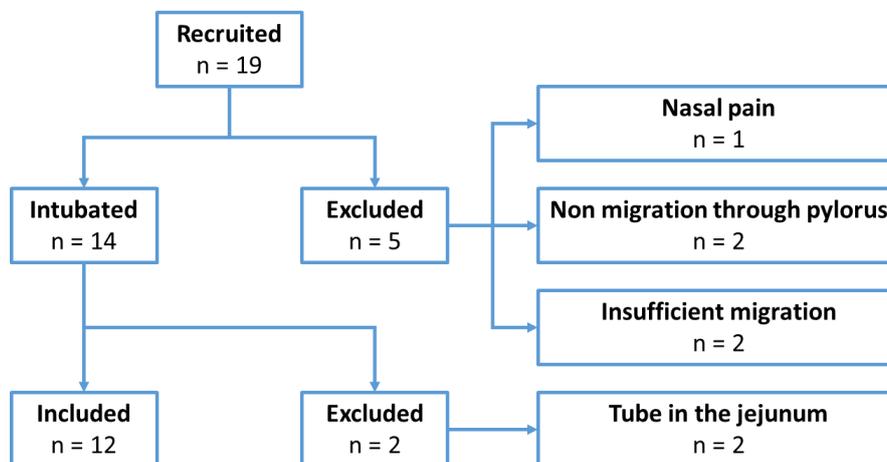
51 There is no available data on sunflower quality in humans. A previous study using naso-ileal
52 tube and labeled protein showed that the protein digestibility of a rapeseed isolate, another
53 oilseed, was low but compensated by a high postprandial utilization (2). Sunflower cake protein
54 digestibility measured in pig (1,13–15) and sunflower isolate protein and AA digestibility in rats
55 (16) were high. The present work aimed to evaluate the bioavailability and DIAAS of a
56 sunflower isolate in healthy volunteers. For this purpose, sunflower protein isolate labeled with
57 ^{15}N was incorporated in biscuits to measure digestive and metabolic losses and to assess
58 protein and AA digestibility by ileal sampling and dual tracer method.

59 **Materials and methods**

60 **Subjects**

61 The study was conducted in the Human Nutrition Research Center of Avicenne Hospital
62 (APHP, Bobigny, France). It was approved by the Ethical Committee Sud Méditerranée IV and
63 was registered at www.clinicaltrials.gov database (NCT04024605). The eligibility criteria were
64 a BMI between 18 and 30 kg/m², an age between 18 and 65 years, a negative serology for
65 HIV, hepatitis C virus antibody, hepatitis B virus surface antigen and the absence of dietary
66 allergy and digestive disease. All the volunteers signed an informed consent. Nineteen
67 volunteers were recruited and the final sample size was n=12 (**Table 1**). The cause of failure
68 was non-migration of the tube through the pylorus (n=2), insufficient migration in the small
69 intestine (n=2) and nasal pain (n=1). Two volunteers were excluded after the experiment
70 because their tube was not positioned in the terminal ileum (**Figure 1**).

71 **Figure 1.** Flowchart of the study and exclusion criteria



73 **Table 1.** Anthropometric characteristics of the subjects

	n=12
Sex (F/M)	8/4
Age (years)	40.4 ± 10.5
BMI (kg/m ²)	23.7 ± 2.9
TBW (L)	34.6 ± 5.6

74 Values are means ± SD, n=12. BMI: body mass index. TBW: total body water.

75 **Test meals**

76 Sunflower was labeled with two applications of ^{15}N enriched fertilizer during growth (Terres
77 Inovia, Pessac, France). Seeds were dehulled and de-oiled (Olead, Pessac, France) and
78 proteins were extracted and isolated as described previously (16) (UMR LRGP, Nancy,
79 France). The ^{15}N labelled sunflower protein isolate was incorporated in chocolate chips biscuits
80 (13g) (Foodinnov, Rennes, France). Biscuits were composed of 17.2% (w/w) of ^{15}N sunflower
81 isolate as main protein source (**Table S1**). There was also a small amount of gluten in the
82 wheat flour used in the biscuit (2.8% of the biscuit). Algal ^{13}C free AA mixture (97%) (Eurisotop,
83 Saint-Aubin, France) was not incorporated in the biscuits to avoid any alteration due to Maillard
84 reaction during cooking. Chocolates were initially chosen as the vector for ^{13}C AA to ensure a
85 slow gastric emptying of the amino acids to obtain a concomitant delivery between ^{15}N that is
86 provided by the biscuit and ^{13}C . Due to the high additional energy as well as the high
87 polyphenol content that chocolate represented (between 283 and 510 mg/100g (17,18)) and
88 the possible interaction with protein digestibility, we decided also to test a less caloric vector
89 and lower in polyphenol, an apple compote. Finally, the chocolate was given in 7 subjects and
90 the compote in 5 subjects. Chocolate and compote composition are given in **Table 2**. Meal
91 was split in nine portions, the first one was composed of 4 biscuits and the other eight were
92 composed of 1 biscuit. In total, volunteers ingested 156g of biscuits, including 25g of ^{15}N
93 sunflower isolate. Alongside biscuits, they ingested chocolate or apple compote for a total
94 amount of 400mg of ^{13}C AA mixture. Volunteers were allowed one glass of water hourly, or
95 half a glass by meal portion. Sunflower isolate contained 14.2% of nitrogen and ^{15}N enrichment
96 was 0.80 atom percent, two times the natural enrichment. In the biscuits, there was 3.5% of
97 nitrogen and the enrichment was 0.73 atom percent. Sunflower isolate was composed of
98 33.1% of IAA and 66.9% of dispensable amino acids (DAA) (**Table 3**). Amino acid composition
99 of algal mixture is presented in **Table S2**.

100 **Table 2.** Composition of chocolate and compote

	Chocolate	Compote
	g/100g	
Chocolate	88.3	/
Sugar	8.0	10.0
Fiber	/	2.0
Cocoa butter	2.0	/
Algal amino acid mixture	0.7	0.7
Energy (kcal/100g)	391.7	44.0

101 Composition expressed in grams for 100 grams and energy content expressed in kcal/100g.

102 **Table 3.** Amino acid composition of sunflower isolate in percentage of all amino acids

	IAA	DAA	
Histidine	2.42	Alanine	4.02
Isoleucine	4.19	Arginine	9.41
Leucine	6.39	Asx	9.19
Lysine	4.44	Cysteine	2.04
Methionine	3.05	Glx	22.54
Phenylalanine	3.88	Glycine	7.58
Threonine	3.93	Proline	4.89
Valine	4.81	Serine	4.58
	-	Tyrosine	2.65

103 Asx: aspartate and asparagine. Glx: glutamate and glutamine.

104 **Clinical design**

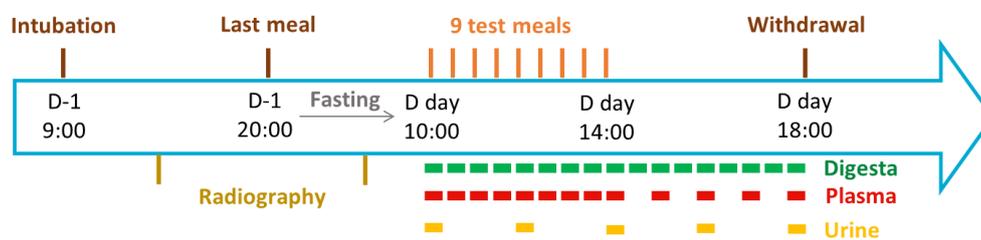
105 A week before the experiment, volunteers had to follow a standardized diet to achieve a mean
 106 protein intake of 1.3g/kg of body weight/day. This quantity of protein corresponds to the
 107 average consumption of protein in France (19).

108 The intestinal tube was composed of three lumens, one was used to inflate or deflate a balloon
 109 to help the migration of the tube, another one allowed collection of ileal digestive contents and
 110 the third one to perfuse a non-absorbable marker of the intestinal flow, the polyethylene glycol
 111 (PEG 4000, 20g/L, Biogaran, Colombes, France).

112 The day before the experiment (**Figure 2**), the tube was introduced through the subject nose
 113 and was allowed to progress through the stomach and the digestive tract for 24h. From 20:00
 114 the volunteer fasted. On the day of the experiment, the position of the tube was checked with

115 a radiography and by pH verification. At 9:00 a catheter was inserted in the forearm vein of the
 116 subject. The intestinal perfusion of PEG 4000 was initiated at a rate of 1mL/min. Basal
 117 collection of ileal effluent was performed for 30 min, as well as blood, urine and expired air
 118 sampling. At 10:00 subjects begun to eat the first meal (4 portions), and then one portion each
 119 half hour. The experiment lasted 8 h from the first meal to the removal of the tube. The
 120 expiratory exchange was measured discontinuously by 20 min periods each hour under a
 121 Canopy coupled to an indirect calorimeter (Deltatrac). Digestive contents were collected
 122 continuously and pooled by half hour. The volume and pH were measured and
 123 diisopropylfluorophosphate was added as anti-protease. Digestive contents were frozen at -
 124 20°C before being freeze-dried. Plasma was sampled every 30 minutes for 4 hours and every
 125 hour after. After centrifugation, plasma supernatant was dispatched in aliquots and frozen at -
 126 20°C. Urines were collected entirely every two hours and weighed. A part was treated with
 127 thymol oil and liquid Vaseline and kept at 4°C and a part was frozen at -20°C.

128 **Figure 2.** Experimental design



129

130 **Analytical methods**

131 The concentration of PEG 4000 in the digesta was assessed by the turbidimetric method (20)
 132 to determine the ileal flow rate. Urea concentrations in plasma and urine were measured using
 133 Urease-Berthelot method (Urea assay, Randox, Crumlin, UK).

134 Nitrogen digestibility and utilization were assessed by measuring ¹⁵N recovery in digestive
 135 contents, urea pools, plasma free AA, biscuits and protein. Nitrogen and carbon percentage
 136 and ¹⁵N and ¹³C enrichment in digestive ileal samples and meal were determined by an
 137 elemental analyzer (EA) (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France) coupled with isotopic

138 ratio mass spectrometry (IRMS) (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK). Atropine
139 (Thermo Electron, Milano, Italy) and L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-Louis,
140 USA) were used as elemental and isotopic standards, respectively.

141 ¹⁵N and ¹³C enrichments in digesta and plasma individual AA were analyzed by gas
142 chromatography (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to an Isoprime
143 isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) via the GC5
144 Isoprime interface. The combustion furnace temperature was 950°C and 850°C for N and C
145 mode, respectively. The GC column (RXI-17, 30 m long, 0.25 µm i.d., 0.5 µm film thickness;
146 Restek) temperature program started at 150 °C, rose to 200°C by 4°C/min and then to 270 °C
147 by 25°C/min; the final temperature was maintained for 10 min. The inlet temperature was set
148 at 270°C. Plasma samples (2µL) were injected in split mode (2:1) and digestive samples were
149 injected with split 10:1.

150 Sunflower proteins and digestive contents were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C.
151 Urinary urea was isolated on a sodium form of cation exchange resin (Dowex® 50WX8 sodium
152 form 100-200 mesh, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) after isolation of urinary ammonia and
153 treatment by urease (Urease from Jack Bean type III, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA).
154 Plasma was split into three fractions: proteins, free AA and urea. Plasma proteins were isolated
155 by acid precipitation with 5-sulfosalicylic acid (1mg/mL) and freeze-dried. After treatment by
156 urease, urea fraction was separated from amino acid fraction by the use of sodium form cation
157 exchange resin like for urinary urea. Plasma AA were freeze-dried. Resin containing urea was
158 eluted by KHSO₄ (2.5M). AA for sunflower isolate, ileal contents and plasma were isolated
159 using a hydrogen form ion exchange resin (Dowex® 50WX8 hydrogen form 100-200 mesh,
160 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and derivatized with ethyl chloroformate (21).

161 For amino acid quantification, norvaline was used as an internal standard added before the
162 hydrolysis. Calibration standards were composed of a mixture of AA (Waters, Milford, USA) to
163 which norvaline was added. AA and standards were derivatized using the AccQ-Tag Ultra
164 Derivatization kit (Waters, Milford, USA) according to manufacturer's protocol. The amino acids

165 analysis was performed on an Acquity H-class UHPLC system with a PDA detector (Waters,
166 Milford, USA). The AA were separated using AccQ-Tag amino acid C18 column (2.1 × 100
167 mm; 1.7 µm bead size; Waters, Milford, USA). Column temperature was 43°C and the eluents
168 were: AccQ-Tag Ultra Eluent A (Waters, Milford, USA), 2% formic acid in acetonitrile, and
169 MilliQ water. The solvent gradients were run at 0.7 mL/min according to manufacturer's
170 protocol and injection volume was 1 µL. The weight of each AA was calculated using free AA
171 molecular weight (22).

172 **Calculations**

173 The ileal flow rate was evaluated for each period of 30 minutes (F, mL/30min)

$$174 \quad F = \frac{[\text{PEG}]_{\text{solution}}}{[\text{PEG}]_{\text{digesta}}} \times \text{perfusion flow rate} \times 30$$

175 where [PEG] is the concentration of glycol in the perfused solution and in the digestive
176 contents, perfusion flow rate of the PEG was set at 1mL/min.

177 The total nitrogen flow rate ($N_{\text{tot ileum}}$, mmol/30min) in the ileum was assessed for each period:

$$178 \quad N_{\text{tot ileum}} = \frac{N_s \times DM_s \times F}{14 \times 10}$$

179 With N_s as the percentage of nitrogen measured in the ileal sample, DM_s as the dry matter of
180 the ileal sample (g/100g), F as the ileal flow rate (mL/30min) and 14 as the molar mass of
181 nitrogen (g/mol).

182 The exogenous nitrogen flow rate ($N_{\text{exo ileum}}$, mmol/30min) was the nitrogen from the sunflower
183 isolate in the meal:

$$184 \quad N_{\text{exo ileum}} = N_{\text{tot ileum}} \times \frac{APE_{\text{ileum}}}{APE_{\text{meal}}}$$

185 With $N_{\text{tot ileum}}$ the total nitrogen flow (mmol/30min), and APE (atom percent excess) the
186 enrichment excess compared to the basal enrichment (in atom percent (AP)) of ^{15}N . Basal
187 enrichment was the enrichment measured in the t=0 sample of each volunteer.

188 Endogenous nitrogen ($N_{\text{endo ileum}}$ in mmol/30min) was the difference between $N_{\text{tot ileum}}$ and N_{exo}
189 ileum.

190 Real ileal digestibility (RID, % of ingested nitrogen) was:

$$191 \quad \text{RID} = \frac{N_{\text{ingested}} - \sum N_{\text{exo ileum}}}{N_{\text{ingested}}} \times 100$$

192 With N_{ingested} the amount of nitrogen ingested by the subjects in the biscuits (mmol) and $\sum N_{\text{exo}}$
193 ileum the cumulative exogenous nitrogen recovered in the ileum over the 8 hours of experiment
194 (mmol).

195 To determine AA ileal digestibility, it was necessary to determine the total amount of each AA
196 ingested and the amount of exogenous AA recovered in the ileal contents.

197 The total amount of amino acid ingested ($AA_{\text{ingested } i}$, mmol) was:

$$198 \quad AA_{\text{ingested } i} = [AA]_{\text{meal } i} \times \text{protein ingested}$$

199 With $[AA]_{\text{meal } i}$ the quantity of each AA “i” in the sunflower isolate (mmol/g) and “protein
200 ingested” the amount of isolate ingested by the subject (g)

201 The quantity of exogenous AA in digesta ($AA_{\text{exo } i}$, mmol) at every period was:

$$202 \quad AA_{\text{exo } i}(t) = [AA]_{\text{ileum } i}(t) \times DM(t) \times F(t) \times \frac{APE_{\text{ileum } i}(t)}{APE_{\text{meal}}}$$

203 With $[AA]_{\text{ileum } i}$ the quantity of each AA “i” in the digestive contents at each period “t” (mmol/g),
204 DM the amount of dry matter in the digestive contents (g/100mL), F the ileal flow rate
205 (mL/30min) and APE the enrichment excess of each AA “i” in the digestive contents at each
206 period “t” compared to the basal enrichment (in atom percent) of ^{15}N . Basal enrichment was
207 the enrichment measured in the $t=0$ sample of each volunteer.

208 For each AA, the ileal digestibility (% of ingested AA) was:

$$209 \quad \text{AA ileal digestibility}_i = 1 - \left(\frac{\sum AA_{\text{exo } i}}{AA_{\text{ingested } i}} \times 100 \right)$$

210 With $\sum AA_{\text{exo } i}$ for each AA "i" the sum of exogenous AA over 8 h (mmol) and $AA_{\text{ingested } i}$ the
211 quantity of AA "i" ingested by the volunteer (mmol).

212 Mean AA digestibility was weighted by the AA composition of sunflower protein isolate.

213 The formula for determination of ileal digestibility of ^{13}C free AA was similar.

214 The chemical score (CS) was defined as follow for every IAA:

215
$$CS = \frac{\text{mass of dietary IAA}_i \text{ in 1g of dietary protein}}{\text{mass of the same dietary IAA}_i \text{ in 1g of reference protein}}$$

216 The reference profile taken for CS calculations was the recommended amino acid scoring
217 pattern for older children, adolescents and adults (3).

218 The digestible indispensable amino acid ratio (DIAA ratio), was calculated as follows for IAA:

219
$$\text{DIAA ratio} = CS_i \times \text{AA ileal digestibility}_i$$

220 The DIAAS was the smallest DIAA ratio calculated.

221 The choice of the nitrogen-to-protein conversion factor may have a strong impact on calculation
222 of the CS, DIAA ratio and the DIAAS. Hence, the calculations were done using different
223 nitrogen-to-protein conversion factor: 6.25 as the standard conversion factor, 5.6 as the mean
224 value for plant protein and 5.29 as the conversion factor specifically estimated for sunflower
225 seed (19).

226 The exogenous nitrogen incorporation into plasma proteins, body and urinary urea pools (N_{exo}
227 (t), % of ingested nitrogen/30min) was assessed for each period as follows:

228
$$N_{\text{exo}}(t) = N_{\text{tot}}(t) \times \frac{APE_s(t)}{APE_{\text{meal}} \times N_{\text{ingested}}} \times 100$$

229 With $N_{\text{tot}}(t)$ the total nitrogen content at the time t (mmol), N_{ingested} the amount of nitrogen
230 ingested by the volunteers (mmol). Basal enrichment of the sample was the enrichment
231 measured in the t=0 sample of each volunteer.

232

233 Exogenous nitrogen in plasma free AA ($N_{\text{exo plasma AA}}(t)$, % of ingested nitrogen/30min) was:

234
$$N_{\text{exo plasma AA}}(t) = \sum [AA] \times \text{Body plasma volume} \times \frac{APE_s(t)}{APE_{\text{meal}} \times N_{\text{ingested}}} \times 100$$

235 With $\Sigma[AA]$ the sum of all AA measured over 8h ($\mu\text{mol/L}$), Body plasma volume (L) as 5% of
236 the body weight (23), basal enrichment of the sample was the enrichment measured in the $t=0$
237 sample of each volunteer.

238 The NPPU (% of ingested nitrogen) was the amount of nitrogen retained in the body after 8 h.
239 It corresponded to the nitrogen ingested minus the metabolic and digestive losses:

240
$$\text{NPPU} = \frac{N_{\text{ingested}} - (\sum N_{\text{exo ileum}} + \sum N_{\text{exo urinary urea}} + N_{\text{exo body urea}})}{N_{\text{ingested}}} \times 100$$

241 With $N_{\text{exo body urea}}$ the remaining exogenous nitrogen in the plasma urea at 8 h.

242 ^{15}N enrichments in the meal was measured in biscuits and ^{13}C enrichments in the meal was
243 calculated according to AA enrichments and amounts in the ingredients (sunflower protein
244 isolate and algal AA mixture) (**Figure S1**).

245 For each AA_i , its ^{13}C enrichment in the meal (biscuit + chocolate or compote) was calculated
246 as followed:

247
$$AP_{i\text{-meal}} = \frac{(AA_{i\text{-mix}} \times AP_{AAi\text{-mix}} + AA_{i\text{-biscuit}} \times AP_{AAi\text{-biscuit}})}{(AA_{i\text{-mix}} + AA_{i\text{-biscuit}})}$$

248 Where $AA_{i\text{-mix}}$ is the amount of the amino acid in the tracer dose of ^{13}C free AA algal ingredient,
249 $AA_{i\text{-biscuit}}$ the amount of amino acid in the biscuit, $AP_{AAi\text{-mix}}$ is the ^{13}C enrichment of the amino
250 acid in free AA algal ingredient (i.e. 98 AP) and $AP_{AAi\text{-biscuit}}$ the ^{13}C enrichment of the biscuit (i.e.
251 natural abundance)

252 The ratio between the two isotopes was measured in the meal and in plasma for each IAA (i):

253
$$\text{Meal ratio } i = \frac{^{15}\text{N}_{\text{meal } i}}{^{13}\text{C}_{\text{meal } i}}$$

254
$$\text{Plasma ratio } i = \frac{^{15}\text{N}_{\text{plasma } i}}{^{13}\text{C}_{\text{plasma } i}}$$

255 The plasma ratio was measured using the mean enrichment of the plateau period of ¹⁵N and
256 ¹³C kinetics.

257 The AUC for plasma enrichment in both isotopes were calculated for every IAA.

258 The ratio between the two isotopes AUC was measured in the plasma for each IAA (i):

259
$$\text{Plasma AUC } i = \frac{\text{AUC}^{15}\text{N}_i}{\text{AUC}^{13}\text{C}_i}$$

260 Using the dual isotope method, IAA absorption (IAA_{absorption plasma i}) for every IAA (i) was
261 determined using plasma AUC or plasma ratio:

262
$$\text{IAA}_{\text{absorption plasma } i} = {}^{13}\text{C AA digestibility}_i \times \frac{\text{Plasma AUC } i}{\text{Meal ratio } i}$$

263
$$\text{IAA}_{\text{absorption plasma } i} = {}^{13}\text{C AA digestibility}_i \times \frac{\text{Plasma ratio } i}{\text{Meal ratio } i}$$

264 With ¹³C AA digestibility i the ileal ¹³C digestibility of the amino acid “i” determined by analysis
265 of digestive content.

266 **Statistical analysis**

267 Data are expressed as means ± standard deviation (SD). Differences between the vector
268 groups (chocolate or compote) were estimated using unpaired student t test and kinetic data
269 were analyzed in a mixed model with group as a fixed factor and time as a repeated factor.
270 Differences between digestibility methods were estimated using paired student t test. All
271 analysis were done using R (version 3.5.1, R project). Differences were considered statistically
272 significant for a P_{value} inferior to 0.05.

273 **Results**

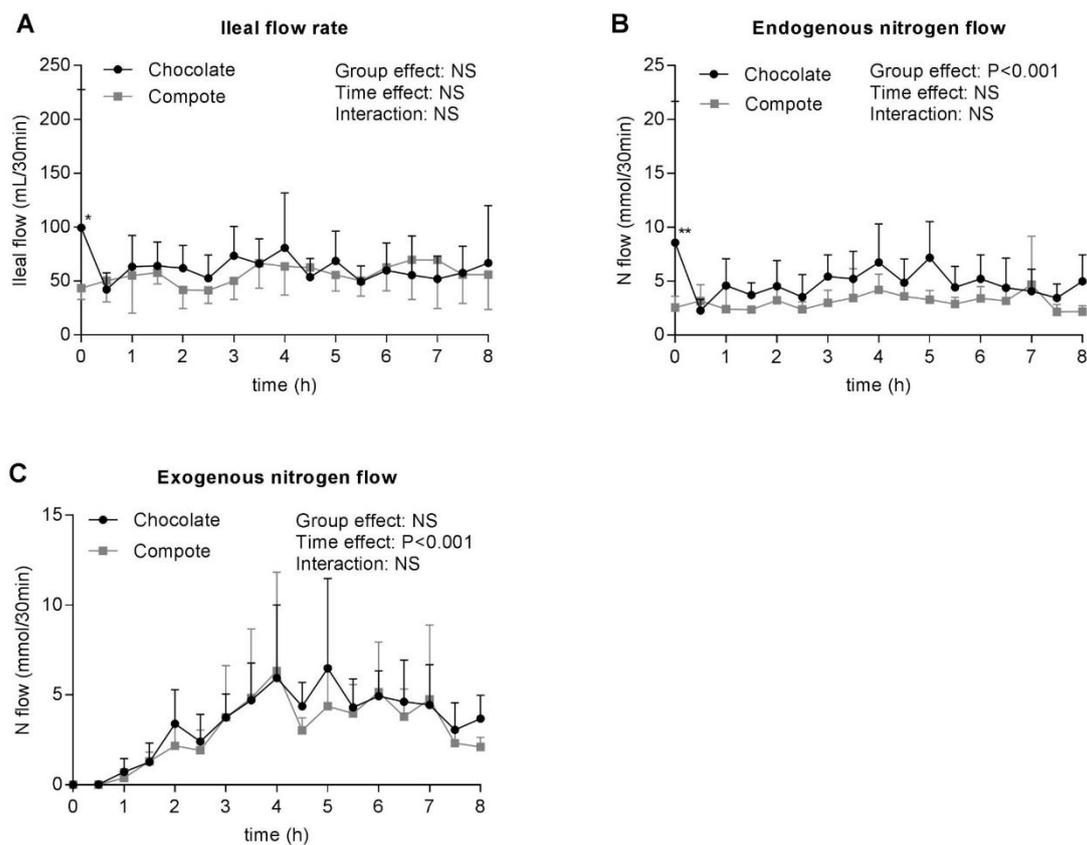
274 **Nitrogen kinetics and RID of ¹⁵N-labeled sunflower**

275 The ileal flow rate was steady along time after ingestion of the first meal (**Figure 3A**) (P=0.95).
276 In average it was 62.9 ± 22.2 mL/30min *i.e.* 2.2 ± 0.8 mL/min for chocolate group and $54.4 \pm$
277 19.6 mL/30min *i.e.* 1.8 ± 0.7 mL/min with no difference between the two groups (P=0.18). In
278 total, 879.0 ± 337.0 mL of effluent flowed through the terminal ileum over 8 h.

279 Endogenous nitrogen flow was stable after the first meal (**Figure 3B**), and curve followed the
280 ileal flow. There was no effect of time on endogenous nitrogen flow (P=0.60) but there was a
281 difference between groups (P<0.001). In average, endogenous nitrogen flow was 4.9 ± 1.9
282 mmol/30min and 3.1 ± 0.8 mmol/30min for chocolate and compote group, respectively
283 (P=0.08). The exogenous nitrogen (**Figure 3C**) appeared in the ileum 1 h after the first meal
284 ingestion and increased until 4 h. Between 4 and 7 h, dietary nitrogen recovered in the ileum
285 was stable before decreasing from 7 h for both groups. There was no difference between
286 groups.

287 The average nitrogen ingested by volunteers was 369.6 ± 14.9 mmol. Cumulated exogenous
288 nitrogen recovered in the ileum were 51.6 ± 15.7 mmol and 41.7 ± 19.8 mmol in chocolate and
289 compote group, respectively. RID of sunflower protein nitrogen was similar between groups
290 with 86.0 ± 4.0 % of the nitrogen ingested for chocolate group, and 88.9 ± 5.2 % in compote
291 group. Pooled RID was 87.2 ± 4.6 %.

292 **Figure 3.** Ileal flow (A), endogenous (B) and exogenous (C) nitrogen kinetics in ileum



293

294 Values are means \pm SD, n=7 for chocolate and n=5 for compote group. Ileal flow rate is in mL/30min
 295 and endogenous and exogenous nitrogen flows are in mmol/30min. N: nitrogen. NS: non-significant. *
 296 indicates a significant difference between groups within a time point (P<0.05).

297 **Ileal AA digestibility of ¹⁵N-labeled sunflower and DIAAS**

298 AA digestibility of sunflower protein isolate was determined in the ileum (**Table 4**). In the
 299 chocolate group, mean dietary AA ileal digestibility was 83.1 ± 5.6 % and values ranged from
 300 64.4 ± 10.4 for glycine to 91.0 ± 3.7 % for glx. In average mean ileal IAA digestibility ($86.8 \pm$
 301 6.1 %) was higher (P<0.01) than DAA digestibility (80.2 ± 11.9 %) and the variability among
 302 AA was lower. In the compote group, mean AA ileal digestibility was 85.3 ± 8.6 % values from
 303 71.8 ± 12.8 % for glycine to 95.0 ± 3.1 % for methionine. In average IAA digestibility was 91.2
 304 ± 5.8 % and DAA digestibility was 84.5 ± 11.0 %. For all AA, there was no statistical difference
 305 between the two groups and no difference for mean AA. Nevertheless, mean IAA digestibility
 306 was lower in chocolate group than in compote group (P<0.01). Mean ileal AA digestibility was
 307 lower than RID for chocolate group (P=0.01) but not for compote group (P=0.11).

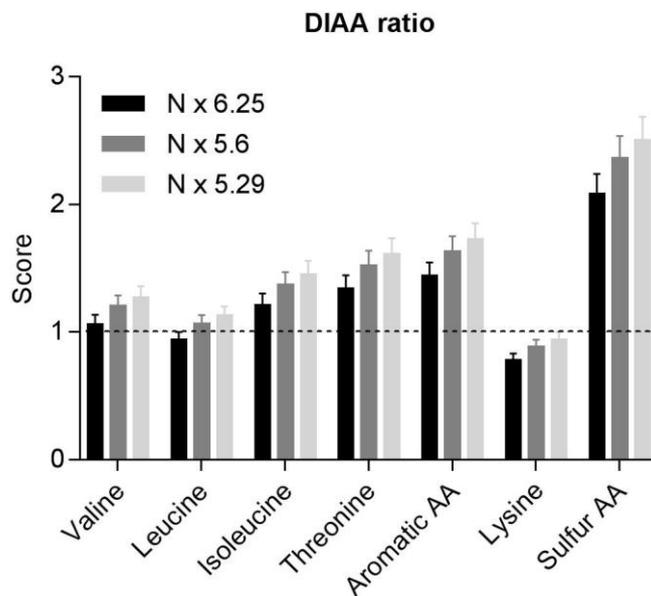
308 **Table 4.** AA ileal digestibility of ¹⁵N sunflower isolate

	Chocolate	Compote	P _{value}	Pooled
IAA digestibility				
Leucine	88.5 ± 5.5	92.5 ± 5.4	0.24	90.1 ± 5.6
Isoleucine	85.9 ± 6.1	90.4 ± 6.4	0.24	87.8 ± 6.3
Lysine	84.4 ± 5.0	87.7 ± 5.7	0.31	85.8 ± 5.3
Methionine	89.3 ± 7.8	95.0 ± 3.1	0.16	91.7 ± 6.7
Phenylalanine	88.9 ± 6.2	92.6 ± 6.8	0.35	90.4 ± 6.4
Threonine	83.8 ± 6.0	88.8 ± 6.2	0.19	85.9 ± 6.3
Valine	86.7 ± 5.8	91.0 ± 6.4	0.25	88.5 ± 6.2
Mean IAA	86.8 ± 6.1	91.2 ± 5.8	<0.01	88.6 ± 6.3
DAA digestibility				
Alanine	86.7 ± 5.5	90.6 ± 6.1	0.27	88.3 ± 5.8
Glycine	64.4 ± 10.4	71.8 ± 12.8	0.29	67.5 ± 11.6
Glx	91.0 ± 3.7	93.9 ± 4.2	0.23	92.2 ± 4.0
Proline	79.1 ± 7.3	85.3 ± 7.4	0.18	81.6 ± 7.7
Serine	79.9 ± 8.4	79.9 ± 7.5	0.99	79.9 ± 7.2
Mean DAA	80.2 ± 11.9	84.5 ± 11.0	0.18	82.1 ± 11.6
Mean (all AA)	83.1 ± 5.6	85.3 ± 8.6	0.60	84.0 ± 6.7
RID	86.0 ± 4.0	88.9 ± 5.2	0.30	87.2 ± 4.6

309 Values are means ± SD, n=7 for all AA in chocolate group, except n=3 for serine. N=5 for compote group
 310 except n=4 for serine. RID and Pooled (chocolate + compote) values are presented. Glx: glutamate and
 311 glutamine.

312 The CS (**Figure S2**) and the DIAAS (**Figure4**) were calculated with the three nitrogen-to-
 313 protein conversion factors. The amount of protein in the sunflower isolate was estimated at
 314 89.6% with 6.25, 79.1% with 5.6 and 74.7% with 5.29. CS was above 1.0 for all IAA with the
 315 three conversions except for lysine with 6.25 factor (0.91). DIAA ratio was below 1.0 for leucine
 316 for 6.25 factor (0.94 ± 0.06) and for lysine with the 3 factors. DIAAS was below 1.0 for lysine
 317 for the 3 factors (0.78 ± 0.05 for 6.25, 0.89 ± 0.05 for 5.6 and 0.94 ± 0.06 for 5.29).

318 **Figure 4.** DIAA ratio of sunflower protein isolate according to the N factor used



319

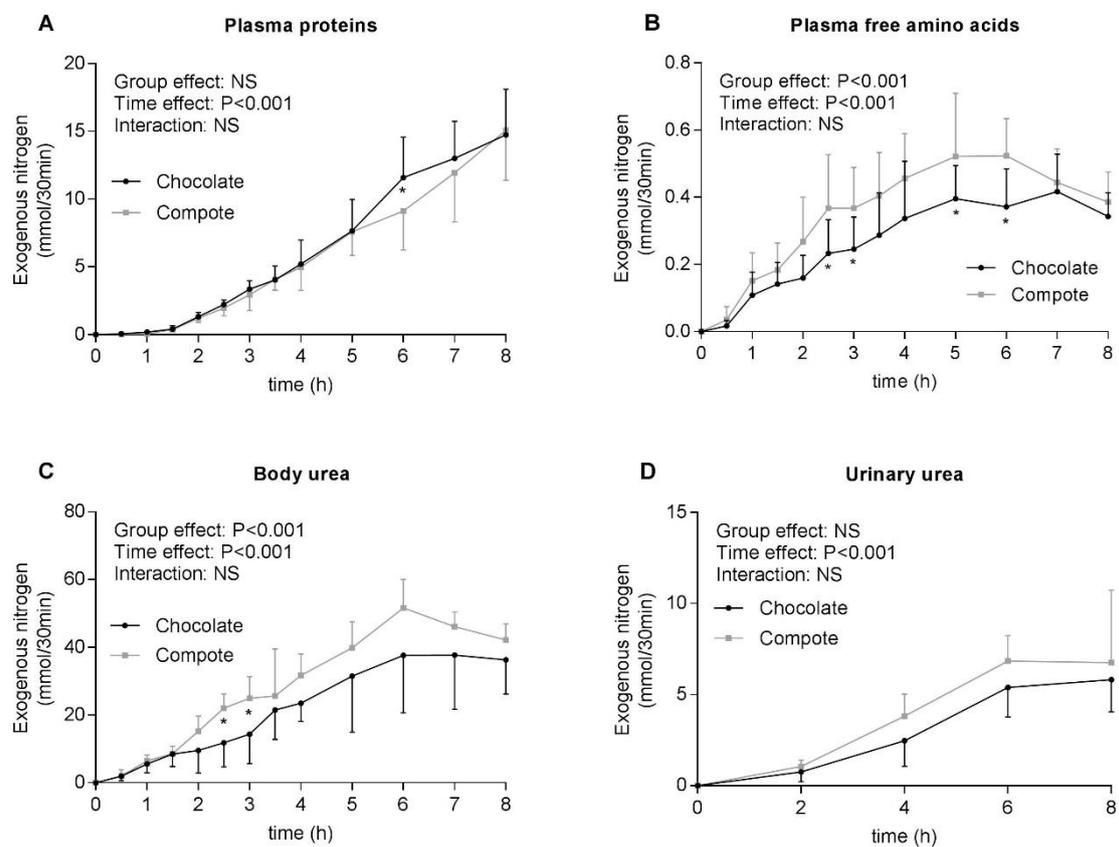
320 Values are means \pm SD, n=12. Aromatic AA: tyrosine and phenylalanine; Sulfur AA: cysteine and
321 methionine.

322 **Exogenous nitrogen transfer to plasma and urinary pools and NPPU**

323 The transfer of dietary nitrogen to plasma and urinary pools is shown in **Figure 5**. The
324 incorporation in plasma protein (**Figure 5A**) started 1 h after the first meal and was linear until
325 the end of the experiment (no group effect). After 8 h, in chocolate group, 14.4 ± 3.0 mmol of
326 exogenous nitrogen was incorporated in plasma proteins, which represented 4.1 ± 1.2 % of
327 ingested nitrogen. In compote group, 15.1 ± 3.7 mmol was incorporated after 8 h, representing
328 4.0 ± 1.0 % of the ingested nitrogen. There were no differences between groups, along time
329 or at 8 h. In plasma free AA (**Figure 5B**), the transfer of dietary nitrogen was more important
330 and faster in compote group than in the chocolate group (group effect, $P < 0.001$). At 8 h $0.4 \pm$
331 0.1 mmol of exogenous nitrogen was transferred to free AA (0.10 ± 0.02 % of ingested
332 nitrogen). For chocolate group, incorporation of dietary nitrogen in body urea (**Figure 5C**) was
333 linear between 0.5 and 6 h after the first meal and was steady between 6 and 8h. At the
334 maximum, 37.7 ± 17.0 mmol of exogenous nitrogen (10.1 ± 4.3 % of ingested nitrogen) was
335 transferred to body urea and residual exogenous nitrogen in body urea at 8 h was 36.3 ± 10.1
336 mmol. For compote group, incorporation was also linear but the slope was more important than

337 in chocolate group (group effect, $P < 0.001$). The maximum was 51.6 ± 8.5 mmol (group effect
 338 $P < 0.01$; $13.8 \pm 2.5\%$ of ingested nitrogen). Residual exogenous nitrogen in body urea at 8 h
 339 was 42.2 ± 4.7 mmol. The appearance of exogenous nitrogen in urinary urea (**Figure 5D**)
 340 started at 2 h and was stable between 6 and 8h. The difference between groups was not
 341 statistically significant ($P = 0.06$). The cumulative amounts of dietary nitrogen excreted in urine
 342 were 14.4 ± 4.9 mmol ($4.0 \pm 1.4\%$ of nitrogen ingested) for chocolate group and 18.5 ± 4.2
 343 mmol ($4.9 \pm 1.1\%$ of nitrogen ingested) for compote group.

344 **Figure 5.** Dietary nitrogen incorporation in plasma proteins (A), in plasma amino acids (B), in
 345 body urea (C) and in urinary urea (D)



346

347 Values are means \pm SD, $n = 7$ for chocolate and $n = 5$ for compote. NS: non-significant. * indicates a
 348 significant difference between groups within time point ($P < 0.05$).

349 Metabolic losses are summarized in **Table 5**. As consequence, NPPU was 72.4 without any
 350 effect of the vector.

351 **Table 5.** Net Post Prandial Utilization of sunflower protein isolate

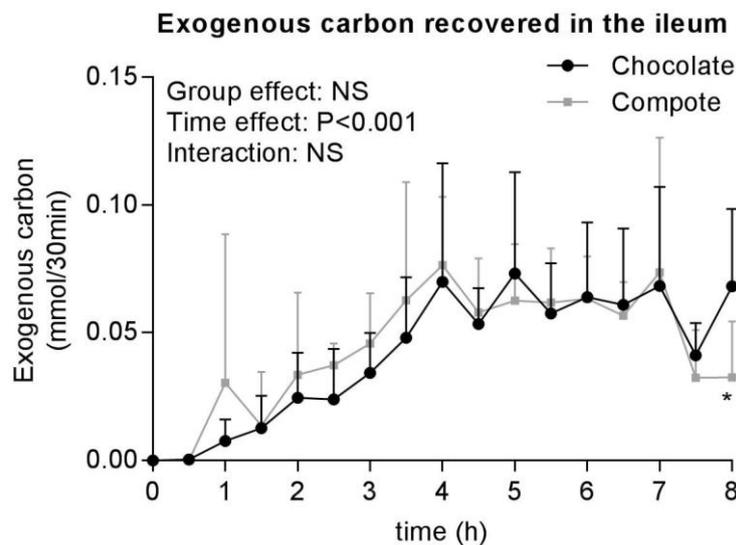
	Chocolate	Compote	P _{value}	Pooled
N _{ingested}	366.6 ± 18.9	373.8 ± 5.9	0.44	369.6 ± 14.9
ΣN _{exo ileum}	51.6 ± 15.7	41.7 ± 19.8	0.36	47.5 ± 17.4
ΣN _{exo urinary urea}	14.4 ± 4.9	18.5 ± 4.2	0.17	16.1 ± 4.9
N _{exo body urea}	36.3 ± 10.1	42.2 ± 4.7	0.26	38.7 ± 8.6
NPPU (%)	72.2 ± 3.7	72.6 ± 4.5	0.87	72.4 ± 3.8

352 Values are mean ± SD, n=7 for chocolate and n=5 for compote.

353 **Amino acid digestibility of the reference ¹³C algal free AA mixture**

354 Dietary carbon from ¹³C algal free AA mixture was found in the ileum 1h after the first meal
 355 (**Figure 6**) and increased for 4 h. Between 4 and 8 h, ¹³C reached a plateau. There were no
 356 differences between vectors except at 8 h (P=0.02).

357 **Figure 6.** ¹³C recovery in the ileum.



358 Values are means ± SD, n=7 for chocolate and n=5 for compote. Exogenous carbon ileal flow are in
 359 mmol/30min. NS: non-significant. * indicates a significant difference between groups within time point
 360 (P<0.05).
 361

362 The cumulative ¹³C recovered in the ileum was 0.63 ± 0.19 mmol for chocolate and 0.61 ± 0.13
 363 mmol for compote. ¹³C ileal digestibility was thus 95.6 ± 1.1% in average (**Table 6**).

364 For chocolate, mean ileal digestibility of ^{13}C AA was $98.0 \pm 1.1\%$ of ingested AA and values
 365 varied from $95.0 \pm 2.9\%$ for tyrosine to 98.8% for alanine and phenylalanine (**Table 6**). There
 366 was no statistical difference between IAA ($97.5 \pm 1.9\%$) and DAA ($97.7 \pm 2.0\%$) in this group.
 367 In compote, mean ileal ^{13}C AA digestibility was $98.1 \pm 1.0\%$, values ranged from $95.2 \pm 3.0\%$
 368 for tyrosine to $99.1 \pm 0.8\%$ for phenylalanine. Mean IAA ($97.8 \pm 1.6\%$) and DAA digestibility
 369 ($97.7 \pm 2.0\%$) were similar in compote. There was no difference between chocolate and
 370 compote for mean and individual AA digestibility. ^{13}C algal AA digestibility was significantly
 371 higher than ^{13}C digestibility in the bulk ($P < 0.001$).

372 **Table 6.** AA ileal digestibility of ^{13}C algal free AA.

^{13}C algal AA digestibility				
	Chocolate	Compote	P _{value}	Pooled
IAA digestibility				
Leucine	98.4 ± 1.0	98.4 ± 0.9	0.95	98.4 ± 0.9
Isoleucine	98.0 ± 1.2	97.9 ± 1.2	0.96	97.9 ± 1.2
Lysine	95.6 ± 2.6	96.1 ± 2.8	0.78	95.8 ± 2.6
Methionine	96.5 ± 1.9	97.9 ± 0.7	0.16	97.1 ± 1.7
Phenylalanine	98.8 ± 0.9	99.1 ± 0.8	0.52	98.9 ± 0.8
Threonine	97.3 ± 1.6	97.2 ± 1.6	0.99	97.2 ± 1.5
Valine	97.7 ± 1.3	97.7 ± 1.2	0.90	97.7 ± 1.2
Mean IAA	97.5 ± 1.8	97.8 ± 1.6	0.44	97.6 ± 1.7
DAA digestibility				
Alanine	98.8 ± 0.6	98.9 ± 0.6	0.74	98.9 ± 0.6
Glycine	97.8 ± 1.2	98.1 ± 1.2	0.66	97.9 ± 1.2
Glx	98.0 ± 1.2	98.1 ± 1.4	0.87	98.1 ± 1.2
Proline	98.5 ± 0.8	98.8 ± 0.6	0.48	98.7 ± 0.7
Serine	97.0 ± 1.8	97.1 ± 1.6	0.93	97.0 ± 1.6
Tyrosine	95.0 ± 2.9	95.2 ± 3.0	0.93	95.1 ± 2.8
Mean DAA	97.6 ± 2.0	97.7 ± 2.0	0.79	97.6 ± 2.0
Mean (all AA)	98.0 ± 1.1	98.1 ± 1.0	0.87	98.1 ± 1.0
Carbon digestibility	95.5 ± 1.3	95.6 ± 1.0	0.83	95.6 ± 1.1

373 Values are means \pm SD. In chocolate group, n=3 for serine, n=4 for threonine and n=7 for others amino
 374 acids. In compote group, n=5 for all amino acids. Carbon digestibility for each vector and pooled values
 375 are presented Glx: glutamate and glutamine.

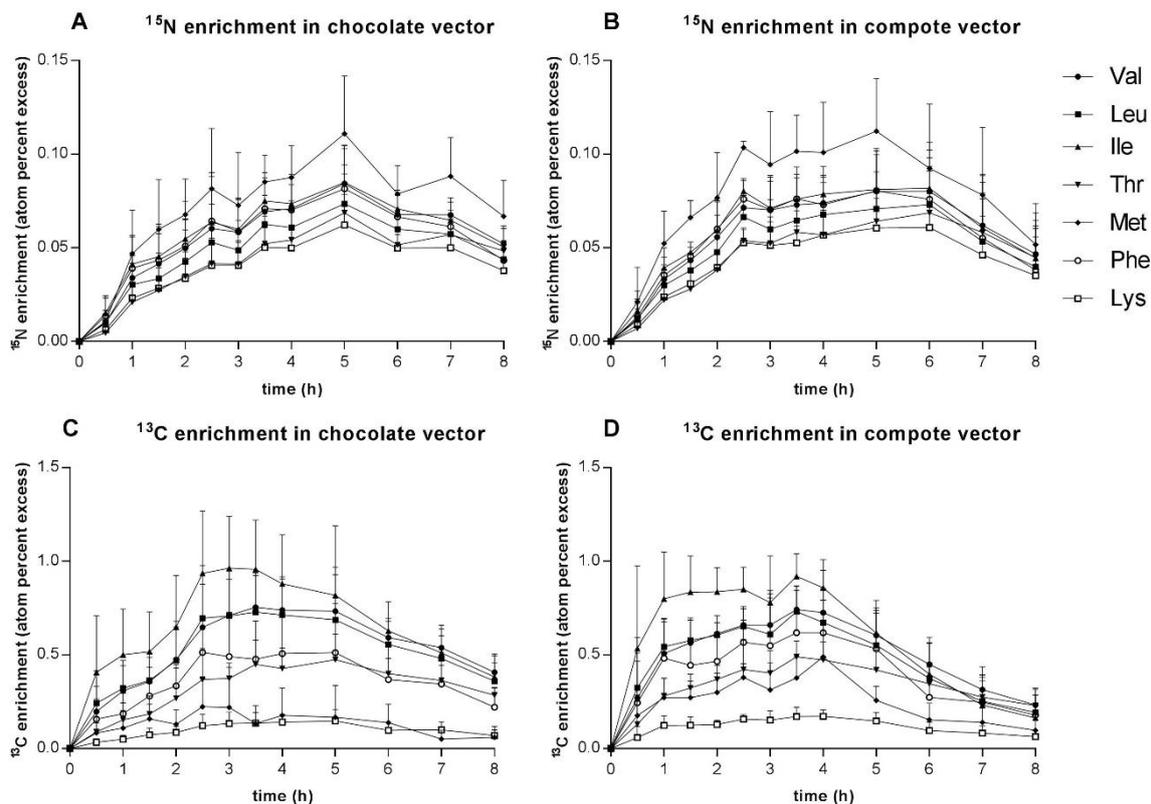
376 **Dual tracer determination of ^{15}N sunflower IAA digestibility**

377 With both chocolate and compote vectors, dietary ^{15}N IAA appeared in plasma after 0.5 h
 378 (**Figure 7A** and **Figure 7B**) and we observed a plateau between 3 and 6 h after ingestion of
 379 the first meal. Methionine was the most enriched IAA in blood and phenylalanine and lysine
 380 were the least enriched. ^{15}N enrichments in individual IAA did not differ between the compote

381 and chocolate vectors except for methionine that was more enriched in the compote group
382 ($P=0.02$).

383 For dietary ^{13}C IAA (**Figure 7C** and **Figure 7D**), kinetics displayed different shape between
384 groups but there was no statistical difference in average (group effect $P=0.08$) between
385 vectors. Algal free IAA appeared and increased rapidly in compote group with a plateau
386 between 1 h and 4 h, while it was between 3 h and 6 h for chocolate group, like for ^{15}N . For
387 both groups, isoleucine was the most enriched IAA in ^{13}C , and lysine was the least enriched.
388 There was a difference in ^{13}C enrichment between chocolate and compote group for
389 methionine only ($P=0.02$). For chocolate vector, a concomitant plateau for ^{15}N and ^{13}C was
390 observed between 3.5 h and 5 h and between 2.5 and 4 h for the compote vector.

391 **Figure 7.** ^{15}N enrichment in plasma IAA for chocolate vector (A) and compote vector (B) and
392 ^{13}C enrichment in plasma IAA for chocolate vector (C) and compote vector (D).



393

394 Values are means \pm SD, $n=7$ for chocolate and $n=5$ for compote.

395 The plasma $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ratios were calculated from the average enrichment values during the
396 concomitant plateau period for ^{13}C and ^{15}N , or from the AUC on the whole postprandial period.

397 AUC were not different between groups for both isotopes, except for ¹³C methionine AUC that
 398 was twice higher in chocolate than in compote group (P=0.03) (**Table 7**).

399 **Table 7.** AUC of isotopic IAA enrichment in plasma.

	AUC					
	¹⁵ N sunflower isolate			¹³ C algal AA		
	Chocolate	Compote	P _{value}	Chocolate	Compote	P _{value}
Valine	0.46 ± 0.09	0.48 ± 0.09	0.76	4.35 ± 0.65	4.04 ± 0.75	0.46
Leucine	0.40 ± 0.08	0.42 ± 0.08	0.60	4.20 ± 0.80	3.80 ± 0.87	0.43
Isoleucine	0.48 ± 0.08	0.50 ± 0.08	0.75	5.27 ± 0.94	4.75 ± 0.82	0.34
Threonine	0.37 ± 0.10	0.39 ± 0.09	0.73	2.64 ± 0.55	2.72 ± 0.51	0.81
Methionine	0.60 ± 0.11	0.69 ± 0.14	0.23	1.05 ± 0.61	2.01 ± 0.71	0.03
Phenylalanine	0.46 ± 0.09	0.47 ± 0.10	0.76	2.94 ± 0.84	3.29 ± 0.95	0.51
Lysine	0.33 ± 0.07	0.36 ± 0.07	0.55	0.80 ± 0.22	0.94 ± 0.23	0.30
Mean	0.44 ± 0.11	0.47 ± 0.13	0.28	3.03 ± 1.71	3.08 ± 1.39	0.90

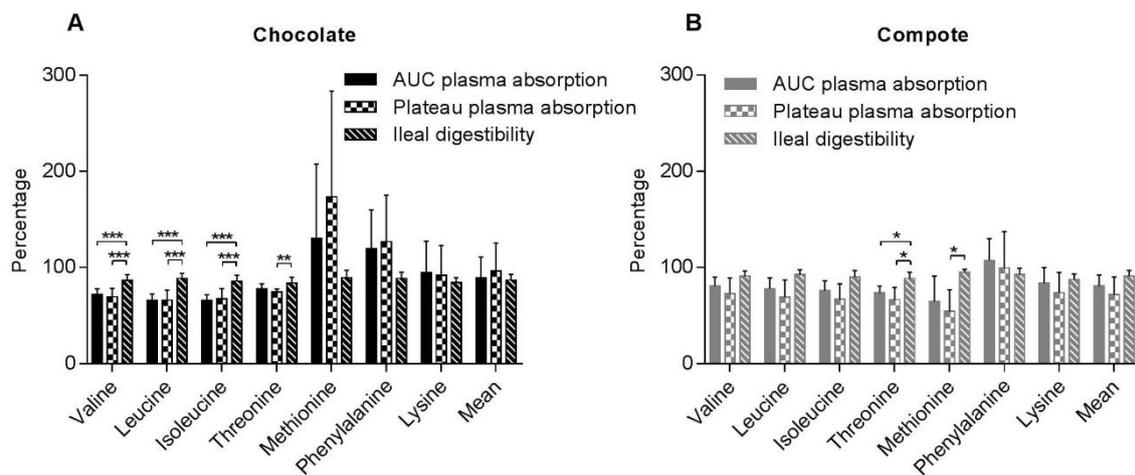
400 Values are means ± SD, n=7 for chocolate group and n=5 for compote group.

401 Sunflower IAA absorption index calculated from plasma AUC (**Figure 8**) gave values relatively
 402 close to ileal AA digestibility (**Table 4**) and with some discrepancies depending on the amino
 403 acids and the vector. For chocolate group, despite significant differences for individual AA
 404 observed for valine, leucine and isoleucine, there was, no difference in average (89.4 ± 21.4%
 405 with plasma AUC and 86.8 ± 6.1% for ileal digestibility, P=0.72) between methods. The
 406 absence of any statistical differences was due to the high interindividual variability. Likewise,
 407 no difference was found between methods for mean or individual AA digestibility within the
 408 compote group (80.6 ± 11.7% for plasma AUC and 91.2 ± 5.8% for ileal digestibility in average),
 409 except for threonine (P=0.04) and leucine (P=0.04).

410 When mean enrichment of ¹⁵N and ¹³C at the plateau was used to calculate absorption indexes,
 411 values found with the chocolate were not different from those calculated using AUC but they
 412 were different from ileal digestibility for valine, leucine, isoleucine and threonine. For compote,
 413 values obtained using plateau plasma enrichment seemed lower than those obtained with AUC
 414 plasma enrichment and ileal digestibility, even if these differences were not statistically
 415 significant, due to a high variability among subjects.

416 With the dual isotope method, values were aberrant for methionine and phenylalanine, with
 417 values higher than 100% with the chocolate vector and in contrast, or in contrast with a low
 418 methionine value with the compote, independently of the use of AUC or plateau enrichment
 419 for calculation. Overall, absorption indexes using AUC were closer to ileal digestibility than
 420 when using plateau enrichment.

421 **Figure 8.** Sunflower IAA digestibility comparison between the dual tracer method using AUC
 422 or plateau plasma enrichment values and direct ileal sampling for chocolate vector (A) and
 423 compote vector (B).



424 Values are means \pm SD, n=7 for chocolate and n=5 for compote. Differences between plasma
 425 absorption index (AUC or plateau) and ileal digestibility were tested using paired t-test. * for P<0.05, **
 426 for P<0.01, *** for P<0.001)

428 **Discussion**

429 This study aimed to evaluate different components of sunflower isolate nutritional protein
430 quality in humans using intrinsic ¹⁵N labeling of sunflower isolate to determine its digestive and
431 metabolic bioavailability. Amino acid digestibility was assessed using the standard method by
432 determining the non-absorbed amino acids in the ileal samples and the dual tracer method by
433 determining the absorbed AA in the plasma.

434 **Sunflower protein quality**

435 Sunflower protein isolate RID measured using ileal tubing was 87.2±4.6% in average with a
436 2.9% difference when associated to chocolate or compote. It is a lower value compared to
437 sunflower protein isolate digestibility obtained in rats (95.1%) (16). As previous observations
438 showed that digestibility is higher in rats than humans (24), this discrepancy could be partly
439 explain by the model. Moreover, in the present study, sunflower isolate was cooked within a
440 biscuit while it was given as a raw protein to rats. Cooking, especially with gluten-containing
441 products, can alter digestibility by creating aggregates. It has been shown that methylglyxocal,
442 a product of Maillard reaction, could react with glutenin and form aggregates, leading to a
443 reduction of *in vitro* digestibility by a third (25). This value of sunflower protein isolate ileal
444 digestibility is lower than that obtained with the same methodology, i.e. using ¹⁵N labeled
445 protein and ileal tubing in humans, for different animal and plant proteins including milk, meat,
446 pea (26–28) and lupine (91.0%) (29) but higher than rapeseed isolate (84.0%) (2). Like for
447 whole protein, we also found that real sunflower protein isolate ileal AA digestibility was low,
448 but there was a large variability between AA, from 67.5% for glycine to 92.2% for glx, and also
449 between individuals as shown by the important standard deviation. Among IAA, lysine was the
450 less digestible (pooled value: 85.8%) and methionine was the most digestible IAA (91.7%) as
451 it was already described in other studies on sunflower digestibility in animal (1,13–15).

452 The DIAAS calculation directly depends on the nitrogen-to-protein conversion factor chosen.
453 The IAA composition is the major determinant of this score and must be expressed by grams

454 of protein. The protein content of the ingredient or isolate depends on the nitrogen conversion
455 factor used. To allow comparison between protein, 6.25 is often used but this value is not
456 representative of the real content of protein, especially in plant protein (30). For this reason,
457 we used two other conversion factors, 5.6 as a mean value for plant proteins and 5.29 as a
458 value in oilseeds (19,30). Higher the conversion factor is, lower the DIAAS is. Using 6.25,
459 sunflower protein is limited in lysine and leucine, while with the two other factors, sunflower is
460 only limited in lysine. With the different conversion factors, the DIAAS of sunflower isolate
461 varied from 0.78, which corresponds to a protein of moderate quality, to 0.94 which correspond
462 to a nearly well balanced protein. It is thus very important to indicate the conversion factor used
463 in the calculation of the DIAAS in order to be able to compare results between different studies.
464 In our previous study on a sunflower isolate digestibility in rats (16), the DIAAS was 0.84 for
465 lysine with 6.25 conversion factor, a value that is consistent with our value in humans (0.78)
466 when considering the higher digestibility obtained in rats. The NPPU obtained for sunflower
467 isolate was relatively high (pooled value of $72.4 \pm 3.8\%$). Sunflower NPPU value is close to meat
468 (71%) (27), soy (73.0%) (31) but is lower to the one found in milk (77%) (26,32) and higher
469 than the one found in another oilseed isolate, rapeseed (70.5%) (2). NPPU indicates the
470 proportion of ingested protein retained in the body during the eight hours following the first
471 meal ingestion, by estimating digestive and metabolic losses. Metabolic losses are
472 approximated by deamination process taking place in the body (6). Because of our particular
473 repeated meal pattern, absorption kinetics were delayed. The NPPU we obtained for sunflower
474 could have thus been overestimated by reducing metabolic losses. Indeed, it has been shown
475 in humans that the intake of "slow" meals like repeated meals induced less postprandial AA
476 oxidation than one "fast" meal of identical composition (33).

477 **Influence of the compote and chocolate on protein sunflower quality**

478 As our work aimed not only to study sunflower protein quality but also to challenge to dual
479 isotope method, we used a mixture of ^{13}C -labelled amino acids from alga protein as reference
480 protein. Because of Maillard reactions, ^{13}C AA could not be incorporated in sunflower biscuits,

481 considering that they were cooked at 180°C during fabrication. The search for an uncooked or
482 low temperature cooked vector was not easy, and the tested vectors were chocolate and apple
483 compote. Indeed, first results using the chocolate as ¹³C vector showed a lower digestibility of
484 sunflower protein than expected from our previous study in rats (16). We hypothesized that it
485 was due to the high content of polyphenols in dark chocolate (between 280 and 840 mg/100g
486 (17,18) that is known to have a negative effect on protein digestion and digestibility, as it has
487 been shown before (34,35). For this reason, apple compote that also contains polyphenol
488 (between 100 and 200 mg/100g) (17,18) but in a lesser amount than chocolate was used. We
489 observed that the nature of vector that was associated with the sunflower biscuit could have
490 an impact on the isolate quality. Indeed, there were statistical differences between the vectors
491 for ¹⁵N appearance in plasma free AA and urea pools, endogenous protein ileal losses and
492 mean ileal IAA digestibility. The higher endogenous losses can be due to chocolate
493 polyphenols, as already reported (36,37). Several other parameters were not significantly
494 different between the two vectors but overall, the chocolate tended to lower the ¹⁵N protein and
495 AA digestibility, in relation with the important polyphenol dose that was ingested with this
496 vector.

497 Additionally, the plasma appearance of ¹³C AA differed between the two vectors, being faster
498 with compote than with chocolate. It could be due to the fact that AA were trapped in the
499 chocolate texture and thus were released more progressively than when added to the compote.
500 However, there was no clear evidence of delayed apparition of ¹³C in the ileum. Moreover, ¹³C
501 and ¹⁵N delivery kinetics in ileum showed similar profiles with a plateau after 4h and a decrease
502 after 7h.

503 **¹³C free AA as the reference protein for the dual isotope method**

504 ¹³C free AA were preferred to ¹³C spirulina previously used for this method to guaranty a high
505 digestibility of the reference protein as recommended by the FAO expert group (6) and to
506 ensure a better repeatability. Indeed, spirulina composition varies between commercial
507 batches and protein digestibility may be variable among studies (7,10,38,39). In rats we found

508 a mean AA digestibility of 83% (39) which indicates that spirulina is not a source of highly
509 digestible protein. To date there is no data of spirulina AA digestibility obtained in humans at
510 the ileal level. The two studies determining spirulina digestibility with the dual tracer method
511 showed non reproducible values with an overall difference of 2.7% among AA and even a
512 11.7% difference for lysine (7,10). It is usually assumed that free AA have a 100% digestibility
513 and our study provides a precise value of 98% in average. This high digestibility, associated
514 to a low variability, comforts our hypothesis that using free AA may be a better option than ¹³C
515 spirulina because the values for the ¹³C reference AA must be robust and reproducible since
516 they are the basis of the calculation for the dual isotope method.

517 However, using free ¹³C AA also presents a drawback when regarding plasma ¹⁵N and ¹³C AA
518 enrichments. Kinetics differed between the two labeling with a faster apparition of ¹³C AA,
519 especially with the compote group, and a more transient plateau for ¹⁵N AA. This is probably
520 due to the fact that free AA are more rapidly absorbed than protein bound AA in addition to the
521 use of a distinct vector in our study.

522 **Validity of the dual ¹⁵N/¹³C method for the determination of AA digestibility**

523 We determined the AA digestibility using two calculations, either using isotopic enrichment
524 AUC or plateau enrichments, and compared the values of ileal digestibility obtained with the
525 standard method. Overall, values were closer to ileal digestibility using AUC calculation than
526 mean plateau enrichment. In the first study using the dual isotope method (7), authors used
527 the average enrichment of both isotopes (²H and ¹³C), during the plateau phase (between 5 h
528 and 8 h in their case). As our plateau were not synchronized between the two isotopes (¹⁵N
529 and ¹³C), we also tested using areas under the curve, as recommended in the FAO expert
530 report (6) and thus found it was more convenient in our case.

531 For both methods of calculation, methionine and phenylalanine values were aberrant. For
532 methionine, it could be due to partial co-elution with glutamate peak and difficulties to properly
533 integrate the peaks. For other AA, values obtained with the dual tracer method were lower than

534 those of ileal digestibility, except with lysine for chocolate vector. Using AUC, the mean IAA
535 value (without methionine and phenylalanine) was $74.3 \pm 10.3\%$ for chocolate vector and 78.4
536 $\pm 9.4\%$ for compote vector, being 12.5 and 12.8% lower than mean ileal digestibility,
537 respectively. The interindividual variability was also important, much higher than that obtained
538 with ileal digestibility. These discrepancies, although moderate, could be explained by AA
539 transaminations. The FAO recommended to use ^2H labeling for the dual isotope method
540 instead of ^{15}N to avoid label mixing after transamination (6). Initially, sunflower was also
541 supposed to be labeled with deuterated water but probably because of weather conditions,
542 such as high temperature and sunshine during $^2\text{H}_2\text{O}$ applications in field, the ^2H labeling was
543 insufficient to be used in our studies. If deuterium labeling is convenient in pots because
544 external conditions are well controlled, procedures are not easily standardizable in fields and
545 are additionally very expensive. As transaminations also affect hydrogens of AA, Devi *et al.* (7)
546 corrected their results by a transamination factor they calculated using LC-MS analysis. The
547 determination of transamination factors of nitrogen may improve the dual isotope method using
548 ^{15}N , but such a work is analytically challenging. Nevertheless, as lysine and threonine do not
549 transaminate, IAA absorption values should be in good adequacy with ileal digestibility, what
550 it is the case, especially in the chocolate group and the compote group for lysine only.

551 To resume, sunflower isolate has a relatively low digestibility and is limited in lysine but displays
552 a good postprandial utilization. Our study is the first attempt to validate the dual tracer method
553 against direct ileal digestibility determination. Overall, although lower, dual isotope results were
554 in correct adequacy with ileal digestibility except for phenylalanine and methionine, but the
555 interindividual variability was high. The use of ^{13}C free AA as the reference protein could be a
556 good methodological choice, but caution must be payed to the vector in which there they are
557 included. Further methodological investigation are necessary to validate the dual isotope
558 method.

559 **Acknowledgments**: We thank Aurélie Dinard and Francis Cacérés from Terres Inovia for their
560 participation in the labeling of sunflower seeds. We thank Marie Claude Amard from Avicenne
561 Hospital for recruiting the subjects and collecting the samples.

562 CG, DT, RB, OG: designed the research; RT, JC, NK, JP, GA: conducted the research; RK,
563 AQ, OG: provided essential materials; RT, CG: analyzed data; RT, CG: wrote the paper; RT,
564 CG: had primary responsibility for final content; and all authors: read and approved the final
565 manuscript.

Bibliography

1. Liu JD, Li QY, Zeng ZK, Li P, Xu X, Wang HL, Zhang S, Piao XS. Determination and Prediction of the Amino Acid Digestibility of Sunflower Seed Meals in Growing Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014;28:86–94.
2. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Bérot S, Evrard J, Fénart E, Tomé D, Gaudichon C. The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. *J Nutr.* 2007;137:594–600.
3. FAO Expert Consultation, editor. Dietary protein quality evaluation in human nutrition [Internet]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. 66 p. Available from: <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>
4. Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr.* 1994;71:29.
5. Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Daré S, Tomé D, Metges CC. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology.* 2002;123:50–9.
6. FAO Expert Working Group. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods [Internet]. 2014. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i4325e.pdf>
7. Devi S, Varkey A, Sheshshayee MS, Preston T, Kurpad AV. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *Am J Clin Nutr.* 2018;107:984–91.
8. Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, Duraisamy R, Thomas T, Preston T, Devi S, Kurpad AV. Ileal digestibility of intrinsically labeled hen's egg and meat protein determined with the dual stable isotope tracer method in Indian adults. *Am J Clin Nutr.* 2018;108:980–7.
9. Kashyap S, Varkey A, Shivakumar N, Devi S, Reddy B H R, Thomas T, Preston T, Sreeman S, Kurpad AV. True ileal digestibility of legumes determined by dual-isotope tracer method in Indian adults. *Am J Clin Nutr.* 2019;110:873–82.
10. Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, Preston T, Devi S, Kurpad AV. Co-ingestion of Black Tea Reduces the Indispensable Amino Acid Digestibility of Hens' Egg in Indian Adults. *J Nutr.* 2019;149:1363–8.
11. Devi S, Varkey A, Dharmar M, Holt RR, Allen LH, Sheshshayee MS, Preston T, Keen CL, Kurpad AV. Amino Acid Digestibility of Extruded Chickpea and Yellow Pea Protein is High and Comparable in Moderately Stunted South Indian Children with Use of a Dual Stable Isotope Tracer Method. *J Nutr.* 2020;nxaa004.
12. Shivakumar N, Kashyap S, Kishore S, Thomas T, Varkey A, Devi S, Preston T, Jahoor F, Sheshshayee M, Kurpad AV. Protein-quality evaluation of complementary foods in Indian children. *Am J Clin Nutr.* 2019;109:1319–27.
13. Nørgaard JV, Fernández JA, Jørgensen H. Ileal digestibility of sunflower meal, pea, rapeseed cake, and lupine in pigs. *J Anim Sci.* 2012;90:203–5.
14. Almeida FN, Htoo JK, Thomson J, Stein HH. Digestibility by growing pigs of amino acids in heat-damaged sunflower meal and cottonseed meal. *J Anim Sci.* 2014;92:585–93.
15. González-Vega JC, Stein HH. Amino acid digestibility in canola, cottonseed, and sunflower products fed to finishing pigs. *J Anim Sci.* 2012;90:4391–400.

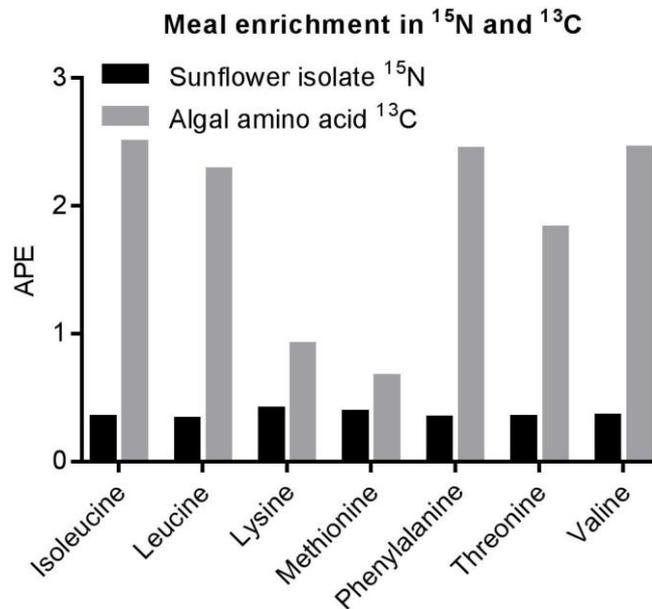
16. Tessier R, Khodorova N, Calvez J, Kapel R, Quinsac A, Piedcoq J, Tomé D, Gaudichon C. ^{15}N and ^2H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *J Nutr.* 2020;150:450–7.
17. Ovaskainen M-L, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *J Nutr.* 2008;138:562–6.
18. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr.* 2000;130:2073S-2085S.
19. Afssa. Apport en protéines: consommation, qualité, besoins et recommandations [Internet]. Agence française de sécurité sanitaire des aliments; 2007 p. 461. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-Proteines.pdf>
20. Russell RW, Mc Gilliard AD, Berger PJ, Young JW. Evaluation of Turbidimetric Determination of Polyethylene Glycol. *J Dairy Sci.* 1982;65:1798–803.
21. Fromentin C, Sanders P, Nau F, Anton M, Fromentin G, Tomé D, Thibault J-N, Gaudichon C. A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with ^{15}N and ^{13}C . *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26:43–8.
22. Rutherford SM, Dunn BM. Quantitative Amino Acid Analysis. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT, editors. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p. 3.2.1-3.2.6. <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps0302s63>
23. Barrett KE, Ganong WF. Ganong's review of medical physiology. New York: McGraw-Hill Medical; 2010. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10326225>
24. Deglaire A, Moughan PJ. Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. *Br J Nutr.* 2012;108:S273–81.
25. Wang Y, Wang J, Wang S, Guo J, Wang S. Modification of Glutenin and Associated Changes in Digestibility Due to Methylglyoxal during Heat Processing. *J Agric Food Chem.* 2019;67:10734–43.
26. Gaudichon C, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Daré S, Van Oycke M, Ferrière F, Rautureau J, Tomé D. Net Postprandial Utilization of [^{15}N]-Labeled Milk Protein Nitrogen Is Influenced by Diet Composition in Humans. *J Nutr.* 1999;129:890–5.
27. Oberli M, Marsset-Baglieri A, Airinei G, Santé-Lhoutellier V, Khodorova N, Rémond D, Foucault-Simonin A, Piedcoq J, Tomé D, Fromentin G, et al. High True Ileal Digestibility but Not Postprandial Utilization of Nitrogen from Bovine Meat Protein in Humans Is Moderately Decreased by High-Temperature, Long-Duration Cooking. *J Nutr.* 2015;145:2221–8.
28. Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Bérot S, Benamouzig R, Mahé S. The Influence of the Albumin Fraction on the Bioavailability and Postprandial Utilization of Pea Protein Given Selectively to Humans. *J Nutr.* 2001;131:1706–13.
29. Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Mahé S. The bioavailability and postprandial utilisation of sweet lupin (*Lupinus albus*)-flour protein is similar to that of purified soyabean protein in human subjects: a study using intrinsically N-labelled proteins. *Br J Nutr.* 2002;87:315.
30. Mariotti F, Tomé D, Mirand P. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008;48:177–84.
31. Mariotti F, Mahé S, Luengo C, Benamouzig R, Tomé D. Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen utilization by carbohydrates in humans. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:954–62.

32. 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;54:1508–17.
33. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O, Beaufrère B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2001;280:E340–8.
34. Gilani GS, Wu Xiao C, Cockell KA. Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *Br J Nutr*. 2012;108:S315–32.
35. Peace RW, Sarwar G, Touchburn SP, Botting HG. Effects of soybean trypsin inhibitors and dl-ethionine on growth and serum parameters in young rats. *Nutr Res*. 1991;11:1197–208.
36. Shahkhalili Y, Finot PA, Hurrell R, Fern E. Effects of Foods Rich in Polyphenols on Nitrogen Excretion in Rats. *J Nutr*. 1990;120:346–52.
37. Jansman AJ, Verstegen MW, Huisman J, van den Berg JW. Effects of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low or high content of condensed tannins on the apparent ileal and fecal digestibility of nutrients and the excretion of endogenous protein in ileal digesta and feces of pigs. *J Anim Sci*. 1995;73:118.
38. Engelen MPKJ, Com G, Anderson PJ, Deutz NEP. New stable isotope method to measure protein digestibility and response to pancreatic enzyme intake in cystic fibrosis. *Clin Nutr*. 2014;33:1024–32.
39. Tessier R, Calvez J, Khodorova N, Piedcoq J, Tomé D, Gaudichon C. Real protein and amino acid digestibility of ¹⁵N spirulina in rats. (*unpublished*). 2020;

566

Supplementary data

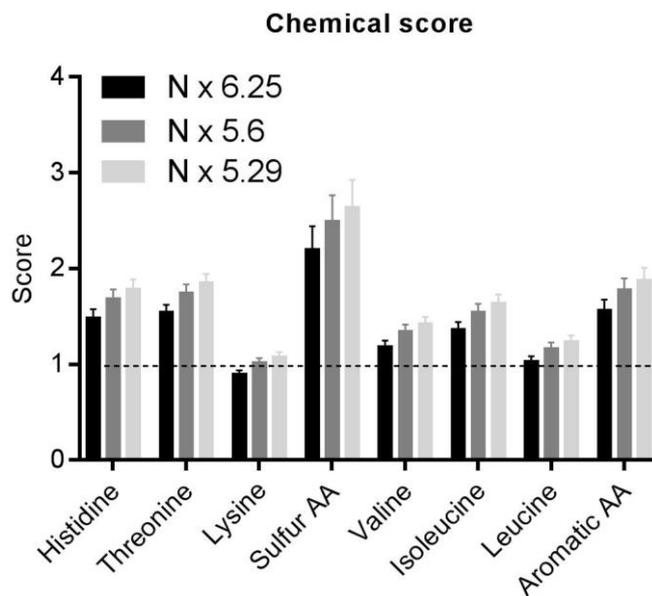
567 **Figure S1.** Meal enrichment in ^{15}N and ^{13}C after dilution



568

569 ^{15}N came from sunflower protein isolate and ^{13}C came from algal amino acid mixture.

570 **Figure S2.** Chemical score of sunflower protein isolate according to the nitrogen-to-protein-
571 conversion factor.



572

573 Values are means \pm SD and $n=10$. The amino acid scoring pattern was for older children, adolescents
574 and adults.

575 **Table S1.** Composition of sunflower biscuits

	% of DM
Wheat flour	31.4
Corn starch	21.5
Sunflower isolate	17.2
Sugar	9.7
Rapeseed oil	6.5
Chocolate chips	6.5
Butter	4.3
Others	3.0

576 Expressed in percentage of dry matter (DM).

577

578 **Table S2.** Amino acid composition of algal free amino acid mixture

Indispensable amino acid		Dispensable amino acid	
Histidine	1.1	Alanine	10.7
Isoleucine	9.0	Arginine	4.1
Leucine	13.3	Aspartate	5.7
Lysine	2.8	Glutamate	11.5
Methionine	1.6	Glycine	7.1
Phenylalanine	8.8	Proline	3.7
Threonine	5.9	Serine	2.9
Valine	10.5	Tyrosine	1.4

579 Expressed in percentage. IAA represented 53% of amino acid and DAA 47%.

580

Chapitre III

Discussion et conclusion

1. Discussion

1.1. Qualité protéique du tournesol

Le premier objectif de ce travail était d'étudier la qualité d'un isolat protéique de tournesol marqué, dans deux modèles d'études, au travers de plusieurs indicateurs : la digestibilité des protéines et des acides aminés, le DIAAS et le NPPU.

Dans un premier temps, la digestibilité fécale des protéines, la digestibilité caecale des acides aminés et le DIAAS du tournesol ont été déterminés chez le rat (**Article 1**). Les objectifs de cette étude étaient de déterminer la qualité protéique du tournesol avec deux marquages isotopiques différents (^{15}N et ^2H) et de la comparer à une protéine déjà connue, le lactosérum, lui aussi doublement marqué. Cette étude donnait une digestibilité fécale des protéines de $95,1 \pm 0,5\%$ avec le ^{15}N et de $94,2 \pm 0,5\%$ avec le ^2H . La digestibilité des acides aminés était plus élevée et était, respectivement, en moyenne de $96,3 \pm 0,2\%$ et de $97,8 \pm 0,3\%$ avec des valeurs allant de 95,5% (sérine) à 97,1% (méthionine) pour le ^{15}N et de 96,0% (phénylalanine) à 99,0% (sérine) pour le deutérium. Par conséquent, le DIAAS du tournesol était la lysine pour les deux isotopes (0,84 et 0,86 respectivement) en utilisant 6,25 comme facteur de conversion de l'azote.

Nous avons utilisé une méthode déjà éprouvée antérieurement pour la mesure de la digestibilité protéique globale après un temps de digestion de 5 h (141,202) ou 6h (140,143). Le temps de digestion de 6h semble être le meilleur compromis entre une digestion totale du repas et une limitation du temps de fermentation des protéines non digérées dans le caecum et le côlon. Comme on peut le voir dans les études **1** et **2**, après 6h de digestion, une faible fraction de l'azote alimentaire reste dans les parties proximales du système digestif (estomac, intestin grêle et iléon). Cela représente moins de 1% de l'azote ingéré pour le tournesol et le lactosérum et 1,7% pour la spiruline en moyenne. De plus, comme cela a été mentionné dans l'étude **3**, certains rats ayant ingéré de l'isolat de tournesol ont été euthanasiés seulement après 3 h de digestion. La digestibilité de l'azote et des acides aminés de tournesol de ce groupe sont présentés dans la **Table 16**. Dans ce groupe, l'azote alimentaire dans l'estomac, l'intestin grêle et l'iléon représentait 9,2% de l'azote ingéré, ce qui montre bien qu'à ce temps donné la digestion et l'absorption des protéines et acides aminés sont incomplètes. Il en résulte que la digestibilité de l'azote fécal et caecal de l'azote est nettement plus faible qu'à 6 h puisque nous ne comptons pas l'azote présent dans l'estomac et l'intestin grêle dans les pertes. La digestibilité caecale des acides aminés est aussi plus faible mais dans une moindre proportion, car elle n'est mesurée que dans un compartiment où la quantité d'azote résiduel est proche pour les deux temps (5,0% à 3 h et 3,4% à 6 h).

Isolat de tournesol ¹⁵ N		
	3 heures	6 heures
Digestibilité de l'azote (%)		
Dig _{féciale}	91,1 ± 0,9	95,1 ± 0,5
Dig ₂	90,6 ± 1,0	95,1 ± 0,6
Dig _{caecale}	91,3 ± 0,9	96,5 ± 0,3
Digestibilité des acides aminés indispensables (%)		
Valine	94,6 ± 0,7	95,8 ± 0,4
Leucine	94,5 ± 0,7	96,0 ± 0,3
Isoleucine	95,2 ± 0,6	96,3 ± 0,3
Thréonine	96,3 ± 0,9	96,3 ± 0,3
Phénylalanine	94,3 ± 0,7	96,1 ± 0,4
Lysine	96,4 ± 0,5	96,4 ± 0,2
Méthionine	96,8 ± 0,5	97,1 ± 0,2
Moyenne des AAI	95,5 ± 0,3	96,3 ± 0,2

Table 16. Comparaison de la digestibilité de l'azote et des acides aminés indispensables du tournesol après 3 h et 6 h de digestion. Les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes ± SEM. Avec Dig_{féciale} et Dig_{caecale} les digestibilités oro-fécales et oro-caecales et avec Dig₂, la digestibilité calculée avec la correction (voir en dessous). Les données à 6 h sont publiées (201) (**Article 1**) et les données à 3 h ne le sont pas.

Concernant le calcul de la digestibilité fécale, étant donné les quantités d'azote alimentaire résiduel dans l'estomac et l'intestin grêle nous avons décidé de ne pas les inclure dans l'équation afin de la simplifier. Pour rappel, la formule utilisée est la suivante :

$$Dig_{féciale} = \frac{\text{ingéré} - (\text{pertes})}{\text{ingéré}} \times 100$$

Les pertes correspondent à la somme des pertes en azote dans l'iléon, le caecum et le côlon.

Nous avons fait ce choix après avoir calculé la digestibilité en tenant compte de tous les compartiments avec la formule suivante :

$$Dig_2 = \frac{(\text{ingéré} - \text{pertes} - [(\text{pertes dans l'estomac} + \text{intestin grêle}) \times (100 - Dig_{féciale})]}{\text{ingéré}} \times 100$$

Dans cette seconde formule, la première digestibilité calculée permet de corriger l'azote restant dans l'estomac et l'intestin grêle en considérant que cet azote sera absorbé de la même façon que le reste. Etant donné que la différence entre ces deux calculs n'était que de 0,03% pour le tournesol et de 0,04% pour le lactosérum, nous avons choisi de garder la formule la plus simple. Cependant, lorsqu'il reste une quantité moins négligeable d'azote dans l'estomac, les valeurs obtenues avec les 2 méthodes de calcul ne sont pas similaires. C'est le cas si on calcule la digestibilité du tournesol à 3 heures avec les deux formules. Ainsi si l'écart entre les deux équations est de 0,5% à 3 heures soit 17 fois l'écart observé entre les deux formules à 6 heures (**Table 16**).

L'objectif secondaire de cette étude chez le rat était de valider l'utilisation du deutérium dans les études de digestibilité étant donné qu'en raison des transaminations, l'utilisation du ¹⁵N n'était pas initialement recommandée pour la méthode double traceur. Les valeurs de

digestibilité caecale des acides aminés et des protéines étaient cohérentes pour le ^{15}N , alors que la digestibilité caecale des acides aminés ^2H était supérieure à celle des protéines. Cela pourrait indiquer que le ^2H ne se trouvait pas que sous forme d'acide aminé dans le caecum, avec possiblement la formation de métabolites ensuite absorbés. Malgré des différences significatives entre traceurs, les valeurs de digestibilités étaient suffisamment proches pour considérer le ^2H comme un traceur fiable. Cependant, comme nous avons étudié des protéines très digestibles, et il faudrait aussi pouvoir s'assurer que les performances du ^{15}N et ^2H sont similaires pour des protéines moins digestibles. Les réactions de transaminations seront évoquées plus en détails dans la seconde partie de cette discussion.

La deuxième étude (**Article 4**) avait pour but principal d'évaluer la qualité des protéines et acides aminés du tournesol chez l'Homme. La digestibilité réelle de l'azote était $86,0 \pm 4,0\%$ dans le groupe chocolat et de $88,9 \pm 5,2\%$ dans le groupe compote, sans différence significative entre les deux. La digestibilité moyenne était donc de $87,2 \pm 4,6\%$. Pour la digestibilité iléale des acides aminés, il n'y avait pas de différence entre les groupes sauf pour la moyenne des acides aminés indispensables qui était plus importante dans le groupe compote. La moyenne de digestibilité de tous les acides aminés était de $83,1 \pm 5,6\%$ pour le groupe chocolat et $85,3 \pm 8,6\%$ pour le groupe compote, mais sans différence significative. Les écarts entre les différents acides aminés étaient plus importants pour les acides aminés non indispensables (plus de 20%) que pour les indispensables (environ 6%).

L'isolat était incorporé dans des biscuits et afin de développer la méthode double traceur (voir plus loin), les acides aminés ^{13}C provenant d'algues, servant de référence, ont été inclus dans des vecteurs séparés des biscuits de tournesol. En effet, les acides aminés libres sont très sensibles à la réaction de Maillard pendant une cuisson à haute température en présence de molécules de sucre (203), probablement plus que lorsque les acides aminés sont liés dans une chaîne polypeptidique. La première option choisie a été des morceaux de chocolat noir car la fabrication ne nécessite pas une haute température de cuisson, et parce que c'est un aliment solide dont on estimait que la vitesse de digestion et d'absorption ne serait pas trop différente de celle du biscuit. Mais les résultats de digestibilité de l'azote montraient une digestibilité plus faible qu'attendue (voir plus haut), et nous avons posé l'hypothèse que cela pouvait être lié aux polyphénols présents dans le chocolat. En effet le chocolat noir en contient, selon les études, entre 280 et 840 mg pour 100 g (154,155), et il a déjà été prouvé que les polyphénols avaient un impact négatif sur la digestion et la digestibilité des protéines (78,142). Il a été montré chez le rat et chez le porc qu'un aliment riche en polyphénols augmentait les pertes endogènes (204,205). Ainsi, chez le porc, les pertes iléales endogènes augmentaient de 45% quand les animaux étaient nourris avec des fèves d'une variété riche en tannins par rapport à une autre variété pauvre en tannins. Il a donc été décidé de créer un second groupe de volontaires pour lesquels les acides aminés ^{13}C ont été mélangés à une cuillère de compote de pomme. Si cet aliment contient aussi des polyphénols, mais dans des proportions bien moins importantes que celles du chocolat noir, l'homogénéisation et le mélange des acides aminés

¹³C sont faciles. Une autre différence entre ces deux vecteurs est l'énergie apportée ce qui a eu pour conséquence d'augmenter de façon plus importante la glycémie chez les sujets ayant consommé du chocolat par rapport à ceux ayant consommé de la compote et d'augmenter leur réponse insulinémique (données non montrées dans l'étude). Il a été prouvé chez l'Homme, que l'UPPN, mais pas la digestibilité, de protéines de lait était augmentée de 5% par une supplémentation en sucres (l'appart calorique passait de 120 à 514 kcal) (95). La supplémentation en gras n'avait aucun effet sur l'UPPN et la digestibilité.

Si l'on compare les résultats de digestibilité entre les deux études, on peut voir que la digestibilité de l'azote est 10% plus grande dans le modèle rat que chez l'Homme et que l'écart est de 5,1% pour la digestibilité moyenne des acides aminés indispensables. Ces différences peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. D'abord, les digestibilités obtenues chez le rat sont supérieures à celles obtenues chez l'Homme, comme cela a été montré au niveau fécal, mais pas au niveau iléal par Deglaire et Moughan (134). Ensuite, la mesure chez le rat est faite au niveau du caecum pour les acides aminés et au niveau du côlon et des fèces pour les protéines alors que la mesure chez l'Homme est iléale. Or à cause de l'activité du microbiote du gros intestin, l'azote non absorbé par l'intestin grêle subit des transformations et est métabolisé (27). Ainsi une partie des acides aminés exogènes non absorbés peut perdre le marquage isotopique qui pourra être absorbé par les colonocytes sous forme de métabolites bactériens azotés, menant à une surestimation de la digestibilité fécale et/ou caecale comparée à la digestibilité iléale. Plusieurs études ont estimé que la surestimation était de l'ordre de 5% pour l'Homme et le rat (29,160). Ces deux paramètres peuvent expliquer ces différences de digestibilité entre les deux études. Pour deux études similaires aux nôtres portant sur la digestibilité d'un isolat de colza, l'écart entre valeur iléale chez l'Homme (54) et valeur fécale chez le rat (141) était de 11,1%, une valeur cohérente avec celle que nous avons obtenue. Il convient aussi de noter que la variabilité interindividuelle est bien plus élevée chez l'Homme que chez le rat. Les différences peuvent aussi s'expliquer par la nature du repas donné, les rats recevaient l'isolat cru dans un repas complet semi-solide quand les volontaires devaient ingérer un produit solide cuit contenant l'isolat protéique. En cohérence avec la différence de digestibilité obtenue entre les deux études, le DIAAS diffère de 6%, l'acide aminé le plus limitant étant la lysine dans les deux cas.

Il n'existe pas à ce jour d'études portant sur la qualité d'un isolat de tournesol quel que soit le modèle utilisé. Les seules études existant portent sur le modèle porc et la digestibilité iléale de graines ou de tourteaux de tournesol, d'une pureté inférieure à celle d'un isolat protéique (14–17). Dans ces études, la digestibilité iléale standardisée du tournesol allait de 72,6% pour des graines (14) à 82,7% pour du tourteau (17). La digestibilité des acides aminés indispensables était supérieure à celle des protéines et allait de 74,1% pour du tourteau décortiqué (15) à 88,5% pour un tourteau entier (17). A noter que l'on retrouve cet écart entre acides aminés indispensables et protéines pour l'étude clinique mais pas pour l'étude animale. Toutes ces études déterminaient les pertes endogènes par utilisation d'un groupe protéoprive ce qui tend

à les sous-estimer et donc à sous-estimer la digestibilité (170). La meilleure digestibilité des isolats par rapport aux aliments protéiques non purifiés peut être due à une moindre accessibilité des protéines aux enzymes et la présence de composés antinutritionnels en partie éliminés lors des processus de purification des protéines (142). Enfin, si l'on compare le tournesol à d'autres sources de protéines, il convient de séparer les résultats des deux études. Pour le rat, la digestibilité fécale de l'azote est proche de celle trouvée, avec la même méthode pour la viande (97%) (143) ou le lait (96%) (140) et proche de celles trouvées avec d'autres méthodes pour l'isolat de colza (134) ou un concentré de pois (99%) (112). Chez l'Homme, la digestibilité peut être considérée comme faible, étant inférieure à la fois à des produits animaux comme la viande cuite (94) ou le lait (95,184) (94-96%) et à la fois à des sources végétales comme le pois (96), le soja (98) ou le blé (97) (90-92%). Dans nos études, les acides aminés indispensables les plus digestibles sont la méthionine, et le moins digestible est la lysine dans l'étude clinique. Dans les études porcines, ce sont les mêmes acides aminés que l'on retrouve comme étant les plus et les moins digestibles, sans tenir compte toutefois des acides aminés que nous n'avons pas pu mesurer (arginine, cystéine, tryptophane, histidine). La seule exception est l'étude Liu *et al.* où l'acide aminé le moins digestible est la thréonine (14).

La faible digestibilité observée par rapport à l'étude animale peut aussi provenir d'une modification des protéines avec la cuisson. Lors de la cuisson d'aliments en général et de produits contenant du gluten en particulier, plusieurs réactions peuvent se produire. Ainsi, le méthylglyoxal, un produit de la réaction de Maillard peut interagir avec la gluténine, la principale protéine de la farine de blé (206). Cette réaction, qui se produit dès 100°C, conduit à la formation de complexes et d'agrégats qui diminuent la digestibilité *in vitro* intestinale d'environ 1/3. Une autre étude, a montré que si la digestibilité *in vitro* du gluten diminuait avec la température de cuisson, la présence d'amidon avait un effet inverse et augmentait la digestibilité du complexe formé (207). L'amidon empêcherait la formation d'agrégats et détruirait la structure tertiaire du gluten la rendant plus digestible. L'isolat de tournesol étant cuit en présence de farine de blé et donc de gluten, on peut supposer que la formation d'agrégats protéiques explique en partie la faible digestibilité constatée par rapport à l'étude chez le rat.

A partir de ces données de digestibilité, le score chimique et le DIAAS ont été calculés avec plusieurs facteurs de conversion. En effet, le facteur de conversion de l'azote en protéines est un facteur important du calcul du score chimique. Pour la composition en acides aminés, nous nous basons sur les concentrations déterminées par l'UHPLC, mais celles-ci sont rapportées à la quantité d'isolat. Or le profil de la protéine idéale au regard des besoins en acides aminés indispensables est exprimé en mg par gramme de protéine « pure ». Le passage du gramme d'isolat au gramme de protéine dépend donc du contenu en protéines de l'isolat. Celui-ci peut être déterminé de deux façons, en faisant la somme des acides aminés ou en utilisant un facteur de conversion de l'azote en protéines. Dans ce travail, nous n'avons pas déterminé les concentrations de tous les acides aminés. L'hydrolyse acide nécessaire à la séparation des

acides aminés des protéines dégrade totalement ou en partie certains acides aminés. Les conséquences d'une hydrolyse acide sur les acides aminés sont décrit en détails dans une revue de Rutherford et Gilani publiée en 2009 (199). Ils considèrent que sur les 20 acides aminés protéinogènes, seuls 9 peuvent être quantifiés correctement après une hydrolyse acide (alanine, arginine, aspartate, glutamate, glycine, histidine, leucine, phenylalanine et proline). L'asparagine et la glutamine sont désaminées pendant l'hydrolyse et sont donc comptabilisées avec l'aspartate et le glutamate, mais cela n'est pas un problème pour l'aminogramme. La cystéine est grandement détruite par l'hydrolyse et la méthionine peut être transformée en méthionine sulfoxyde et sulfone par oxydation. Ces acides aminés peuvent nécessiter une étape préalable d'oxydation à l'acide performique pour être quantifiés. Si la cystéine apparaît sur le chromatogramme d'UHPLC, son rendement est très faible (de l'ordre de 20%) et sa quantification non fiable. En revanche, la méthionine présente un très bon rendement (90%), probablement dû à l'absence d'oxygène dans le tube d'hydrolyse. En effet, avant de placer les tubes dans le four sec, l'air est chassé du tube et remplacé par du diazote afin de se prévenir de réactions d'oxydation pendant l'hydrolyse. Dans la mesure où la composition en acides aminés soufrés du tournesol est bien supérieure au besoin (52), nous n'avons pas jugé utile de doser séparément la cystéine et la méthionine. Cette étape supplémentaire d'oxydation à l'acide performique est nécessaire pour des protéines plus pauvres en acides aminés soufrés. Le tryptophane est complètement détruit par l'hydrolyse acide et n'apparaît donc pas dans la composition en acides aminés. Un des moyens de doser cet acide aminé est de réaliser une hydrolyse basique mais ce protocole n'était pas encore au point au laboratoire et n'a pu être réalisé au cours cette thèse. Les autres acides aminés (sérine, thréonine, tyrosine, valine, lysine et isoleucine) sont partiellement détruits ou modifiés par l'hydrolyse acide. Cependant, nous avons utilisé un standard externe, dont la composition en acide aminé est connue, l'albumine de sérum bovin, qui permet de calculer le rendement de l'hydrolyse pour tous les acides aminés. Ce rendement correspond au rapport entre la quantité d'acide aminé mesuré et théorique. Ce rendement est autour de 90% pour tous les acides aminés mesurés, sauf la cystéine comme vu plus haut, et est utilisé pour corriger les concentrations d'acides aminés. Si le standard externe est utilisé à chaque hydrolyse, la correction appliquée correspond à la moyenne des rendements mesurés sur toutes les hydrolyses réalisées. L'histidine n'apparaît pas dans nos calculs de DIAAS car si elle est quantifiable par UHPLC, son enrichissement n'est pas mesurable par GC-C-IRMS. Mais son score chimique est suffisamment élevé dans les protéines étudiées pour supposer que son score corrigé par la digestibilité ne serait pas inférieur à celui de la lysine. Le score chimique, avec 6,25 comme facteur de conversion, est de 1,51 pour l'isolat de l'étude clinique et de 1,82 pour l'isolat de l'étude animale.

Une autre problématique liée aux concentrations des acides aminés est le poids moléculaire à utiliser dans les calculs. Les concentrations déterminées par l'UHPLC sont exprimées en mmol/g d'échantillon et il faut les convertir en g d'acide d'aminé pour 100 g d'échantillon puis 100 g de protéines. Le passage de mmol/g à g/100g se fait en utilisant le poids moléculaire de l'acide aminé. Or le poids moléculaire d'un acide aminé lié dans une protéine est différent de celui

d'un acide aminé libre. En effet au moment de la rupture des liaisons peptidiques, une molécule d'eau se lie à l'acide aminé libéré (208). Par conséquent, dans le cas de la détermination du contenu en protéine par l'aminogramme, la conversion entre mmol/g et g/100g doit se faire en utilisant le poids moléculaire de chaque acide aminé minoré par le poids moléculaire d'une molécule d'eau (18 g/mol). Cet ajustement peut mener à une différence de contenu protéine compris entre 9 et 20% selon les acides aminés contenus dans la protéine (208). Dans nos études nous n'avons pas utilisé l'aminogramme pour la détermination du contenu protéique en acide aminé, mais la question se pose tout de même de l'utilisation de cette correction pour la détermination du score chimique. Dans la détermination du score chimique, par rapport au profil des besoins, faut-il considérer les acides aminés « en chaîne » ou « libres » ? Plusieurs études ont utilisé le poids moléculaire des acides aminés libres (67,112,146). Parfois, ce n'est pas précisé (193) mais on suppose que par défaut les auteurs utilisent le poids moléculaire « libre ». Dans les études présentées dans ce manuscrit, nous avons aussi utilisé les poids moléculaires « libres ». Dans la **Figure 22**, est présentée la comparaison des scores de DIAAS pour trois facteurs de conversion de l'azote en protéines et pour les deux méthodes de calcul des compositions en acides aminés. On peut voir que le score est plus élevé sans la correction qu'avec. Si la lysine reste l'acide aminé le plus limitant dans tous les cas, sa valeur diminue de 0,78 à 0,68 pour le facteur 6,25, le score de la leucine devient limitant pour les trois facteurs de conversion ainsi que la valine pour le facteur 6,25.

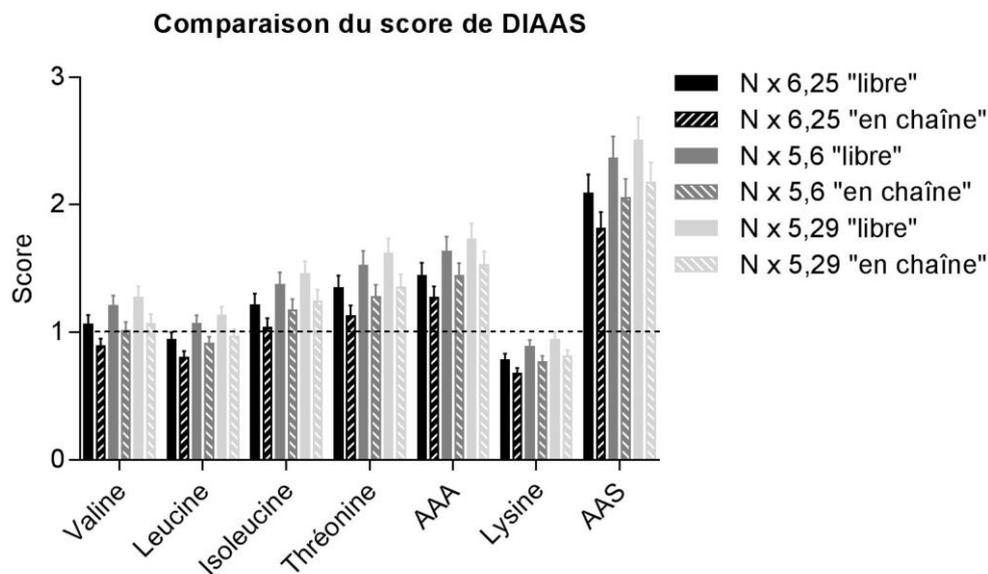


Figure 22. Comparaison des scores d'acides aminés digestibles du tournesol, chez l'Homme, en fonction de trois facteurs de conversion de l'azote et de l'utilisation du poids moléculaire « en chaîne » ou « libre ». Les valeurs sont des moyennes \pm écart-type, n = 12. Les valeurs « libres » sont tirées de l'**Article 4**, les valeurs « en chaîne » ne sont pas publiées.

Etant donné que nous ne pouvions déterminer la quantité de protéines via l'aminogramme, il a fallu utiliser un facteur de conversion de l'azote en protéines. Le facteur utilisé par défaut est 6,25 qui provient de l'hypothèse selon laquelle les protéines contiennent 16% d'azote. Mais il est acté que les protéines n'ont pas le même pourcentage d'azote selon leur composition en

acides aminés, étant donné que tous les acides aminés n'ont pas le même nombre d'atomes d'azote (51,69). En plus de la composition en acides aminés, il faut aussi prendre en considération l'azote non protéique et les groupements prosthétiques. L'azote non protéique correspond à l'azote non inclus dans les protéines, comme les phospholipides, les alcaloïdes, l'urée ou les vitamines (69). Selon les définitions, on peut y inclure les acides aminés libres ou les petits peptides. En comptabilisant les acides aminés libres, l'azote non protéique représente environ 5% de l'azote total dans le lait de vache (209). Les groupements prosthétiques sont des groupements ajoutés après la transcription comme la méthylation ou la glycosylation. Il existe plusieurs façons de mesurer le facteur de conversion d'une protéine, certaines tiennent compte des groupements prosthétiques, d'autres non. Une revue (68) a comparé les données de plusieurs études et de plusieurs sources protéiques. Dans cette revue, la valeur du tournesol décortiqué était 5,29 et il n'existe pas à ce jour de valeur pour l'isolat de tournesol, c'est pourquoi nous avons utilisé cette valeur dans nos calculs. Le facteur moyen selon cette étude était 5,6, que nous avons aussi utilisé. Mais le facteur 6,25 reste encore majoritairement utilisé, notamment dans les textes réglementaires pour les ingrédients et produits alimentaires protéiques. Avec 6,25, le DIAAS de l'isolat de tournesol était de 0,78, avec 5,6 il était de 0,89 et avec 5,29 il était de 0,94. De la même façon, le DIAAS calculé chez le rat va de 0,84 avec 6,25 à 0,99 avec 5,29. On voit donc ici l'importance du choix du facteur de conversion dans ce calcul. Dans tous les cas, celui-ci devrait être clairement explicité dans les publications.

L'utilisation post prandiale nette des protéines a été déterminée à partir du dosage de l'azote alimentaire dans les pertes digestives et dans les pools de désamination des acides aminés, c'est-à-dire dans notre étude, dans les pools d'urée plasmatique et urinaire. Malgré des différences de cinétiques entre les deux groupes ayant ingéré de la compote ou du chocolat, avec notamment une apparition plus rapide et plus importante de l'azote alimentaire dans les acides aminés plasmatiques et dans l'urée plasmatique, il n'y avait pas de différences de NPPU entre les groupes. La valeur moyenne était $72,4 \pm 3,8\%$. Cette valeur d'UPPN, comparée à celle d'autres protéines déterminées par utilisation de sondes naso-iléales et de protéines marquées au ^{15}N , est similaire à celles trouvées pour la viande (94), le soja (98), le colza (54) mais inférieure à celle du lait (95). Cependant, l'étalement des repas sur 4 heures a un effet direct sur le métabolisme postprandial des acides aminés. Il a été démontré que l'ingestion de repas « lents » sous la forme de repas répétés, comparée à l'ingestion du même repas en bolus, avait un effet positif significatif sur le bilan de leucine, c'est-à-dire de la différence entre apport et oxydation de cet acide aminé (210). Étant donné que l'apport était identique pour les deux groupes, cela signifiait que l'oxydation de la leucine était moins importante après plusieurs repas étalés. Le même effet avait été constaté, dans une moindre mesure, en comparant un repas contenant de la caséine (« lent ») ou des acides aminés libres (« rapide »). Il a aussi été montré chez l'Homme que la désamination du lait était plus importante pour la fraction soluble (lactosérum) que pour la caséine (211). Ces résultats amènent à relativiser l'UPPN obtenue lors de notre étude. S'il a déjà été observé, chez l'Homme, une digestibilité faible et une utilisation métabolique élevée avec le colza (54), il est possible que notre UPPN soit surestimé par l'étalement des repas. En effet, le colza ne présente pas de déficience en acides aminés, alors

que la lysine est limitante dans le tournesol, ce qui est susceptible d'augmenter la désamination postprandiale, comme cela a été montré pour le blé (97) . Il est aussi possible que l'étalement des repas ait un impact sur la digestibilité des protéines. On pourrait par exemple s'attendre à une meilleure digestibilité, à la fois de façon artéfactuelle car la vidange ne serait pas complète au bout de 8 h ou du fait d'une meilleure digestion par les enzymes digestives grâce à l'arrivée progressive de petites quantités de bol alimentaire dans le duodénum. Mais ce sont des hypothèses et il serait intéressant de vérifier l'influence d'un repas étalé et d'un repas en bolus sur la digestibilité d'une protéine.

Dans l'étude animale, en raison de la faible quantité disponible de protéine, les rats ne consommaient la protéine testée qu'une fois avant le jour de l'expérience. Ce premier repas proposé quelques jours avant l'euthanasie permettait aux rats d'appréhender les protéines testées qui pouvaient avoir des aspects ou odeurs différentes que celles du régime standard auquel ils étaient habitués. La question de l'habituation des rats à une protéine et son influence sur la digestibilité peut se poser. L'adaptation à un régime est importante dans la détermination de la balance azotée chez l'Homme (32). Mais il ne semble pas que cela ait un impact sur la digestibilité des protéines. Si une étude de 1995 a montré que la digestibilité apparente chez le rat dépendait de la période d'adaptation au repas (entre 4 jours et 8 semaines) (212), une adaptation de 15 jours n'avait pas d'effet sur la digestibilité iléale de rats consommant un isolat protéique de colza ou de lait (141). Dans cette dernière étude utilisant des protéines marquées au ¹⁵N, il n'y avait pas d'effets significatifs d'une adaptation sauf pour la récupération d'azote alimentaire dans le côlon proximal et de façon modérée pour l'accrétion protéique dans le muscle.

Il existe aussi des limites inhérentes à l'utilisation de sondes intestinales. Les volontaires doivent rester allongés ou en position semi-assise pendant plus de 8 h, entre la prise des prélèvements basaux et le retrait de la sonde. C'est une position qui n'est pas physiologique et qui a un effet sur le métabolisme postprandial. Il a été montré, par ingestion de phénylalanine ¹³C, qu'une position couchée ralentissait l'absorption des acides aminés, entre autres, par un ralentissement de la vidange gastrique (213). La présence d'une sonde entre l'œsophage et la fin de l'intestin grêle peut aussi avoir un effet sur la digestion d'un point de vue physiologique et anatomique. On estime que la longueur de l'intestin grêle est entre 3 et 5 mètres chez l'Homme adulte, or la longueur moyenne de l'intubation, entre l'entrée du nez et le bout de la sonde était entre 1,9 et 2 mètres. La vérification anatomique et du pH permettent d'affirmer que l'extrémité de la sonde était au niveau de l'iléon terminal, il est possible que l'intestin grêle se « retrousse » autour de la sonde, réduisant ainsi sa longueur. Les conséquences d'un tel phénomène sont à encore à explorer.

Points-clés :

- **La digestibilité de l'isolat de tournesol est élevée chez le rat mais plus faible chez l'Homme**
- **Le DIAAS de la protéine de tournesol est inférieur à 1 en raison de sa teneur en lysine**
- **Le DIAAS varie entre 0,78 et 0,99 selon le modèle utilisé mais aussi le facteur de conversion**
- **La protéine de tournesol a une bonne utilisation postprandiale**

1.2. Méthode double traceur

Le second objectif de ce travail de thèse était de développer et étudier la méthode double traceur à la fois dans un modèle de rat et chez l'Homme. En effet, nous avons pu dans ces deux modèles confronter les résultats de cette méthode à ceux de la méthode de référence par mesure directe dans les digestas. Ainsi, j'ai pu au cours de mon travail de thèse explorer certaines questions que nous nous sommes posées quant à l'utilisation de cette méthode. L'utilisation de la spiruline comme protéine de référence est-elle acceptable ? Les protéines à tester doivent-elle impérativement être marquées au deutérium ou le ^{15}N est-il aussi utilisable ? Est-il préférable d'utiliser les mesures moyennes d'enrichissement au plateau isotopique ou d'utiliser les aires sous courbes ? La méthode est-elle adaptable chez le rat ?

1.2.1. Utilisation de la spiruline comme protéine de référence

La première étape a été de choisir et caractériser la protéine de référence utilisée dans cette nouvelle méthode. Pour rappel, le rapport FAO exposant l'idée de méthode double traceur décrivait la protéine de référence comme une protéine issue d'organismes unicellulaires, disponible commercialement, hautement enrichie en isotope stable (^{13}C), hautement digestible et acceptable d'un point de vue culturel (42). Il y est aussi dit que les protéines de micro-algues, répondent à tous ces critères. Le choix qui a été fait par l'équipe d'Anura Kurpad à Bangalore en Inde, qui a été la première équipe à publier spécifiquement sur la méthode double traceur chez l'Homme en utilisant tous les acides aminés indispensables, a été d'utiliser de la spiruline intrinsèquement marquée au ^{13}C (185). En effet, la spiruline répond à plusieurs des critères développés plus haut, elle est disponible commercialement sous forme enrichie en ^{13}C , et elle est acceptable d'un point de vue culturel étant consommée historiquement sur plusieurs continents et comme complément alimentaire d'une façon plus récente (81).

Cependant, le critère de « haute digestibilité » est discutable. Il existe peu d'études portant sur la digestibilité ou la qualité protéique de la spiruline. Les données existantes portent sur des mesures plasmatiques chez l'Homme (185,188), dans un modèle *in vitro* (214) ou dans un modèle de nutrition animale, le poulet (215). La digestibilité de la spiruline était de 50% environ *in vitro* et de 80% environ en utilisant la méthode double traceur sur un seul acide aminé, la phénylalanine (188). La digestibilité iléale standardisée des acides aminés de spiruline chez le poulet était 79,4% en moyenne avec des valeurs allant de 74,0% pour l'aspartate à 86,4% pour la proline. Enfin, dans l'étude de Devi *et al.*, la digestibilité des acides aminés indispensables en utilisant la méthode double traceur était de 79,8% en moyenne et de 41,4% pour la proline. On peut donc voir que la digestibilité de la spiruline est à priori assez faible et relativement variable selon les modèles et les études. De plus, nous avons fait l'hypothèse que cette faible digestibilité pouvait être liée à la présence de parois végétales dans la spiruline, qui rendrait les protéines moins accessibles aux enzymes digestives. Il a déjà été montré que l'ultrasonication de la *Chlorella*, une micro algue verte, était associée avec une augmentation de l'utilisation post prandiale et de la valeur biologique chez le rat (216).

C'est dans ce contexte que nous avons voulu déterminer la digestibilité des protéines et acides aminés de la spiruline ¹⁵N chez le rat et tester l'effet de la sonication sur cette digestibilité (**Article 2**). Nous avons montré que la digestibilité fécale de la spiruline était de $86,0 \pm 0,7\%$ en moyenne. La digestibilité caecale moyenne des acides aminés était de $83,0 \pm 0,3\%$ avec un écart de 11% entre l'acide aminé le moins digestible (sérine) et le plus digestible (méthionine). Ces valeurs de digestibilité sont faibles, d'autant plus que les digestibilités fécales ou caecales surestiment la digestibilité iléale (112). La digestibilité est bien plus faible que celle trouvée, avec la même méthode et le même modèle, avec le lait (96%) (140) ou la viande (97%) (143). Néanmoins, comparé à la digestibilité fécale d'autres sources de protéines, déterminées par utilisation d'un groupe protéoprive, la spiruline a une digestibilité protéique fécale supérieure à celle des haricots rouges cuits ou celle du son de blé (112). Pour rappel, la méthode protéoprive tend à surestimer la digestibilité. En gardant à l'esprit que les comparaisons entre modèles sont complexes, on constate que les valeurs de digestibilité que nous avons rapportées sont dans des ordres de grandeurs proches de celles trouvées dans les études citées précédemment, autour de 80%.

La digestibilité caecale des protéines de spiruline était de $90,1 \pm 0,6\%$ soit près de 7% de plus que la digestibilité caecale des acides aminés. Cette différence importante interpelle. Elle peut s'expliquer par la présence d'azote non protéique lié aux protéines dans la spiruline. La fiche technique du fournisseur (Cambridge Isotope Laboratories) sur le lot de spiruline utilisé, montre que si le taux de protéine de la spiruline est de 60,9% en utilisant le dosage de l'azote de Kejhdaal, il n'est que de 43% en se basant sur le dosage des acides aminés. Cela voudrait dire que 28% de l'azote contenu dans la spiruline n'est pas de nature protéique. Le DIAAS était de 0,9 pour la lysine en utilisant 6,25 comme facteur de conversion, mais vraisemblablement de l'ordre de 0,8 pour l'histidine. En raison de l'importante proportion d'azote non protéique, la

détermination du facteur de conversion azote-protéine de la spiruline est compliqué. Il est de 6,27 chez Safi *et al.* (217) pour *A. platensis*. Dans l'étude de Teuling, selon la méthode de calcul, le facteur de conversion est de 5,08 ou compris entre 5,37 et 6,35 pour *A. maxima* (218). Cette incertitude a un impact important sur la qualité protéique de la spiruline, en utilisant une valeur moyenne de 5,7, la spiruline n'est plus limitée en lysine.

Nous n'avons pu mettre en évidence aucun effet de la sonication sur la digestibilité des protéines et acides aminés de spiruline. Contrairement, à l'étude de Janczyk *et al.* qui observait une augmentation (mais non significative) de 10% de la digestibilité vraie après ultrasonication (216), la digestibilité de l'azote n'était que 1,3% plus haute après sonication dans notre étude. La digestibilité des acides aminés était même plus élevée dans le groupe contrôle que dans le groupe avec spiruline soniquée. La question se pose de l'efficacité de notre procédé de sonication. Nous avons utilisé un bain de sonication plutôt qu'une sonde à ultrason, qui est certes plus puissante mais entraîne un échauffement de l'échantillon et donc potentiellement une dégradation des protéines. Il faut aussi reconnaître que la vérification de la rupture des parois cellulaires n'a pas été effectuée après sonication et avant de donner la spiruline aux rats. L'hypothèse selon laquelle la faible digestibilité serait due aux parois végétales reste donc encore en suspens.

Après avoir caractérisé la qualité protéique de la spiruline en utilisant le traceur classique ^{15}N , nous avons étudié celle de la spiruline ^{13}C (**Article 3**). En effet le comportement et le suivi des acides aminés marqués peuvent varier selon l'isotope étudié, le ^{13}C , notamment, n'étant pas spécifique des protéines et acides aminés contrairement au ^{15}N . Pour cela, tous les rats utilisés dans les **articles 2 et 3** ont reçu en parallèle de leur protéine marquée au ^{15}N (et ^2H pour certains) une dose traceur de spiruline intrinsèquement marquée au carbone 13. Le but de cette étude était de comparer la digestibilité de la spiruline ^{13}C en fonction de différents repas contenant différentes sources de protéines. Il n'y avait pas de différence de digestibilité fécale du carbone entre les groupes. La digestibilité fécale du carbone 13 était, tous groupes confondus, de $89,4 \pm 0,3\%$. En revanche, la digestibilité caecale des acides aminés de spiruline ^{13}C variait selon les groupes. Elle était toujours plus faible avec les repas spiruline qu'avec les repas contenant du lactosérum ou du tournesol. La moyenne pour le groupe spiruline était de $82,8 \pm 1,7\%$ alors qu'elle était de $89,8 \pm 1,0\%$ pour le lactosérum et de $90,4 \pm 0,4\%$ pour le tournesol. Au contraire, la digestibilité caecale de la spiruline ^{13}C était plus importante dans le groupe spiruline que dans les autres groupes (plus de 3% d'écart). Ce résultat paradoxal, s'explique par le fait qu'une plus grande quantité de carbone 13 était retrouvée dans le côlon, et donc moins dans le caecum, comparé aux autres groupes. Cela pourrait être lié à une cinétique de digestion différente du repas spiruline comparé aux autres repas. L'utilisation de deux isolats dans un cas et de cellules entières dans l'autre cas pourrait expliquer ce résultat. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait tester la digestibilité d'un extrait de protéines de spiruline, mais il n'existe pas encore de tel produit marqué sur le marché.

La différence de digestibilité des protéines de spiruline selon l'isotope stable utilisé (**Article 2** : Digestibilité réelle des protéines et acides aminés de la spiruline ¹⁵N dans un modèle de rat et **Article 3** : Mise à l'épreuve de l'utilisation de la spiruline ¹³C comme protéine de référence dans la méthode double traceur afin de déterminer la digestibilité des acides aminés de plusieurs sources protéiques chez le rat) était de 3,4% pour les protéines, mais il n'y avait pas de différences pour les acides aminés. Par contre, lorsque la spiruline ¹³C a été associée à du lactosérum ou du tournesol, la digestibilité de ses acides aminés était plus élevée avec un écart de 7% environ. Une explication possible à ces résultats est la disparité d'ingestion du repas. En effet, il a été constaté que les rats devant ingérer le repas spiruline avaient plus de difficulté à le manger en 30 minutes. Ainsi, les rats du « Spiruline » ont ingéré trois quart de leur repas test en moyenne quand les rats « Tournesol » et « Lactosérum » en ingéraient plus de 90% (P < 0,001), et ce malgré le fait que les repas tests leur avaient été présentés une première fois, en amont du jour d'euthanasie pour les habituer. L'odeur et le goût de la spiruline, administrée à hauteur de 14 % du régime, a conduit à des comportements de rejet par certains animaux. Bien que l'utilisation de traceurs isotopiques permette de normaliser les calculs par rapport à la quantité consommée, il est envisageable que le repas n'ait pas été suffisamment homogène et que l'ingestion de la dose traceur par les rats ne soit pas représentative de l'ensemble du repas. En effet, le repas consiste en un mélange de 4 g de poudres incluant seulement 10 mg de cette dose traceur, incorporée manuellement avant le test.

Au final, la spiruline a une digestibilité plutôt modérée et par ailleurs, la lysine et surtout l'histidine sont limitantes. De plus, la nature de l'azote présent dans les différents lots pose question et enfin, nous avons observé des disparités de digestibilité selon le type de protéine test à laquelle la dose traceur est associée. C'est pour toutes ces raisons que notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un mélange d'acides aminés libres, provenant d'algues, plutôt que sur la spiruline comme référence ¹³C dans la méthode double traceur chez l'Homme.

1.2.2. Mise en place de la méthode double traceur chez le rat

Nous avons évalué l'utilisation de la méthode double traceur dans le modèle rat en établissant les ratios isotopiques dans les acides aminés indispensables des protéines plasmatiques, les repas ainsi que dans les acides aminés des contenus caecaux (**Article 3**). Le choix des enrichissements isotopiques dans les protéines plasmatiques au lieu des AA libres a été guidé par l'impossibilité d'établir une cinétique d'enrichissement des acides aminés plasmatiques, le prélèvement de sang séquentiel à la queue ne permettant pas d'obtenir suffisamment de plasma. Nous avons fait l'hypothèse que les protéines plasmatiques seraient le reflet de la signature isotopique des intervalles précédents dans les AA libres. Afin de bien différencier ces valeurs de celles de digestibilité digestive (caecale chez le rat et iléale chez l'Homme) nous avons choisi de les appeler valeurs d'absorption ou indices d'absorption des acides aminés indispensables.

Dans le plasma, nous avons seulement calculé les ratios $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, l'enrichissement en ^2H des acides aminés des protéines plasmatiques a été mesuré pour 16 rats euthanasiés après 6 h de digestion (8 lactosérum et 8 tournesol). Les pics correspondant aux acides aminés étaient bien présents sur les chromatogrammes du GC-C-IRMS mais les enrichissements étaient très faibles voire nuls. Dans ces conditions, le reste des plasmas n'a pas été analysé en mode hydrogène.

Les valeurs obtenues d'absorption à 6h pour les groupes « Tournesol » et « Lactosérum » sont supérieures à 100% pour tous les acides aminés indispensables sauf la thréonine et sont donc considérées aberrantes et non physiologiques. Cette spécificité de la thréonine peut s'expliquer par la fréquence des coélutions entre cet acide aminé et la sérine. Sur les chromatogrammes en mode ^{15}N , ces deux acides aminés ont des temps d'élution très rapprochés et il arrive souvent qu'ils coéluent, ce qui fausse l'enrichissement de la thréonine. Dans le cas de la spiruline, seule la valeur de la phénylalanine dépasse les 100% mais les valeurs restent différentes de celles de digestibilité caecale, sauf pour l'isoleucine. Pour expliquer cette différence entre groupes, il faut à nouveau envisager une différence de cinétique d'absorption des acides aminés de la spiruline, du tournesol et du lactosérum. Pour étayer cette hypothèse, il faut regarder la répartition de l'azote et du carbone alimentaire dans le tube digestif à 6 heures. Ainsi, si environ 9,5% de l'azote alimentaire est dans le caecum des rats « Spiruline », il n'y en a que 3% dans le groupe « Tournesol » et 2% dans le groupe « Lactosérum ». Exprimé en pourcentage restant dans le tube digestif à 6 h, l'azote alimentaire dans le caecum représente 53,1% pour la spiruline, 60,5% pour le tournesol et 61,7% pour le lactosérum. Pour le ^{13}C de la spiruline, cela représentait respectivement, 54,0%, 70,2% et 70,8%. Ces pourcentages montrent qu'il existe un déphasage entre protéine ^{15}N et spiruline ^{13}C , dans le caecum, pour les rats ayant ingéré l'isolat de tournesol et le lactosérum de chèvre. Au sein du groupe Tournesol ayant été euthanasié à 3 h, les valeurs d'absorption se rapprochent de celles de digestibilité caecale mais restent significativement différentes. Ainsi la valeur moyenne de l'indice d'absorption est de $82,9 \pm 4,1\%$ dans ce groupe alors que la digestibilité caecale moyenne des acides aminés indispensables à 6h, est de $96,3 \pm 0,1\%$ soit près de 13 points d'écart. Comme cela a été évoqué plus haut, on considère que la digestion et l'absorption des protéines est complète à 6 heures. C'est pourquoi, l'indice d'absorption du groupe euthanasié à 3 h est comparé à la digestibilité caecale à 6 h. Dans tous les groupes, la variabilité est bien plus importante que pour la mesure de la digestibilité caecale. La méthode double traceur, associe quatre mesures isotopiques, deux pour les protéines plasmatiques et deux pour le repas, ce qui multiplie d'autant l'incertitude des mesures. De plus, les données plasmatiques reflètent un ensemble de processus tels que l'absorption, l'entrée dans les voies de synthèses ou dans les voies d'oxydation. Pour chacune de ces étapes, il existe une variabilité entre individus, et ce qui peut expliquer des dispersions plus élevées que celles obtenues par mesure par mesure d'acides aminés alimentaires présents dans les digestas. La question se pose des mesures isotopiques dans les acides aminés libres ou les protéines plasmatiques dans la méthode double traceur sachant que le protocole proposé par la FAO recommande d'utiliser les acides aminés libres (42). Il est certain que les cinétiques d'apparition des acides aminés

alimentaires dans les acides aminés libres et les protéines plasmatiques ne sont pas les mêmes et que notre mesure à un seul temps donné ne se situe peut-être pas dans la fenêtre qui permettrait d'obtenir un résultat cohérent. Nous avons déterminé les enrichissements dans les protéines plasmatiques car le protocole analytique est moins demandeur en plasma que celui de mesure dans les acides aminés libres plasmatiques. En effet, la préparation à partir des protéines plasmatiques demande moins de 1 mL de plasma alors que le protocole pour les acides aminés libres demande au moins 1 mL, voire plus pour la mesure du ^{15}N . La mesure dans les acides aminés libres a été faite sur quelques animaux, mais les hauteurs de pics des chromatogrammes étaient relativement faibles et il y avait un certain nombre de pics parasites.

Une difficulté de la méthode double traceur est aussi la détermination des ratios d'enrichissements dans le repas, résultant du mélange de plusieurs centaines de grammes de repas avec une très petite quantité de protéine de référence. La détermination analytique de ce mélange difficilement homogène peut être une source d'erreur importante. On peut aussi calculer les enrichissements dans les repas par un calcul théorique se basant sur les enrichissements des deux protéines, à tester et de référence, et leurs compositions en acides aminés. Pour la spiruline ^{13}C , nous avons essayé avec les deux méthodes. La mesure de l'enrichissement dans les restes de repas induisait une variabilité importante interindividuelle et intergroupe, probablement due à des problèmes d'échantillonnages, une petite quantité (10 mg) étant mélangée dans 4 g de repas sec.

En résumé, la méthode double traceur est difficilement utilisable chez le rat, principalement à cause de l'impossibilité de prélever suffisamment de sang en cinétique. Par ailleurs, il faudrait faire des repas en doses répétées, comme cela a été fait par (67) mais cette procédure est particulièrement lourde. En se plaçant à un seul temps donné de digestion, il est très difficile d'être sûr d'être dans le bon créneau, surtout que celui-ci peut dépendre de la protéine étudiée et de l'animal. Dans notre cas, il semblerait que 3 h soit un temps trop court pour la mesure plasmatique et que 6h soit un temps trop long. On peut faire l'hypothèse que le temps idéal se situe entre ces deux points.

Nous avons aussi voulu évaluer l'utilisation de la méthode double traceur au niveau intestinal en mesurant les ratios isotopiques dans la fraction non absorbée, c'est-à-dire dans le contenu caecal. La formule utilisée (**Article 3**) a donc été adaptée en conséquence. La méthode classique de détermination de la digestibilité est quantitative et est dépendante de la récupération totale des contenus digestifs. L'idée est donc de s'affranchir de cette quantification en utilisant la méthode double traceur qui est qualitative. La détermination des indices d'absorption caeaux s'est faite en utilisant l'azote 15 pour tous les groupes, et le deutérium pour le tournesol et le lactosérum de chèvre. Tout comme pour le plasma, les indices d'absorption des acides aminés indispensables ont été comparés aux valeurs de digestibilité caecale décrites dans l'**Article 2** pour la spiruline et l'**Article 1** pour le lactosérum et le tournesol. Pour le lactosérum de chèvre, on observe une bonne corrélation avec la digestibilité, sauf pour la thréonine. Les différences entre digestibilité et indices d'absorption caeaux sont

plus marquées avec le deutérium qu'avec le ^{15}N . En moyenne la différence entre digestibilité et indices d'absorption était de 0,1% avec le ^{15}N et de 0,7% avec le ^2H . Avec la spiruline, les valeurs obtenues avec la méthode double traceur sont bien plus faibles que celles de digestibilité. Les écarts entre indice d'absorption et digestibilité dans le caecum sont variables selon les acides aminés (entre 6,8 et 26,4% d'écart) et sont élevés en moyenne (15,4%). Pour l'isolat de tournesol, les valeurs de digestibilité caecale sont proches des valeurs d'indices d'absorption caecale, que ce soit à 3 h ou à 6 h. L'écart moyen entre les 2 modes de détermination est de 0,6% en ^{15}N et de 0,3% en ^2H à 6 h. De façon surprenante, avec l'azote 15, les valeurs d'absorption à 3h sont légèrement supérieures à celles à 6 h, alors qu'avec le deutérium l'inverse est observable. On constate que les indices d'absorption caecaux à 3 h sont équivalents à ceux à 6 h alors que la digestion est incomplète.

La variabilité interindividuelle est plus faible avec la mesure caecale qu'avec la mesure plasmatique. La thréonine sort encore une fois du lot, comme dans le plasma, et probablement pour les mêmes raisons analytiques que celles déjà évoquées. Néanmoins, les différences entre digestibilité caecale et indices d'absorption caecaux sont considérées comme acceptables d'un point de vue physiologique. La détermination de la digestibilité par la méthode double traceur pourrait être intéressante dans les contenus digestifs, notamment pour mesurer une digestibilité iléale et non caecale. Mais il n'en demeure pas moins que la quantité de contenu iléal est limitante chez le rat pour les mesures isotopiques et qu'un certain nombre d'expériences complémentaires seraient nécessaires pour mieux apprécier ce potentiel.

1.2.3. Utilisation de la méthode double traceur chez l'Homme

Enfin, la troisième étape a été d'utiliser la méthode double traceur chez l'Homme et de la comparer à la mesure directe de la digestibilité. Nous avons choisi d'utiliser comme protéine de référence un mélange d'acides aminés libres marqués au ^{13}C et non de la spiruline en raison des questionnements sur sa digestibilité et la reproductibilité des mesures. Comme vu plus haut, les acides aminés ^{13}C ont été inclus dans deux vecteurs différents, du chocolat noir et de la compote de pomme. Les chocolats enrichis en acides aminés ^{13}C ont été produits par FoodInnov alors que nous avons incorporé manuellement le traceur à chaque cuillère de compote. La texture plus liquide de la compote a entraîné une différence de vitesse d'apparition des acides aminés ^{13}C dans le plasma comme on le discutera par la suite.

Afin d'éviter les décalages isotopiques entre ^{15}N et ^{13}C , et afin d'obtenir des plateaux d'enrichissements, les repas ont été fractionnés douze doses et données en neuf repas. Une dose équivaut à un biscuit de tournesol de 13 g associé à un chocolat de 5 g ou une cuillère à soupe de compote. Le premier repas correspond à 4 doses de biscuit et de vecteur de ^{13}C et les huit repas suivant correspondent à une dose. Les repas étaient donnés toutes les demi-heures pendant 4h. Au total les volontaires devaient ingérer l'équivalent de 20,7 g de protéines de tournesol ^{15}N et 400 mg d'acide aminés ^{13}C . La FAO préconisait de faire l'étude sur 8 h mais

ne parlait pas de fractionner les repas (42). Devi *et al.*, ont divisé les repas en dix doses, le premier repas correspondait à 3 doses, puis les 7 autres repas étaient donnés toutes les heures jusqu'à 7h (185). Il est possible que leur protocole produise un plateau isotopique plus stable dans le temps mais il est incompatible avec notre mesure en parallèle de la digestibilité iléale. On a déjà vu qu'il restait une certaine quantité d'azote alimentaire dans l'iléon après 8 h, étaler les repas sur toute la durée de l'expérience pourrait entraîner une digestion incomplète après 8 h et donc une impossibilité de mesurer correctement la digestibilité. Concernant les prélèvements de sang, le rapport FAO préconisait de prélever du sang toutes les 20 minutes pendant 4 heures puis toutes les heures jusqu'à la fin (42). Etant donné qu'en une journée d'exploration nous avons deux volontaires décalés de 30 minutes, il était difficile de prélever du sang 3 fois par heure, par conséquent nous avons adapté le protocole pour prélever du sang toutes les demi-heures pendant 4 heures puis toutes les heures jusque 8 h. Devi *et al.*, ont prélevé du sang toutes les demi-heures uniquement entre 5 h et 8 h, excluant ainsi la possibilité d'utiliser l'AUC dans leur calculs (185). Au vu des résultats d'enrichissement dans les acides aminés plasmatiques, il aurait peut-être été utile de continuer des prélèvements toutes les demi-heures pour obtenir des valeurs de plateaux plus robustes.

Les indices d'absorption des acides aminés ont été calculés en utilisant deux méthodes, la mesure des aires sous courbe des deux isotopes dans le plasma telle que préconisée dans le rapport FAO et la moyenne de l'enrichissement du plateau isotopique de chaque isotope comme utilisé par l'étude de Devi *et al.* Comme on pouvait s'y attendre, les profils d'enrichissement des acides aminés plasmatiques en ^{15}N et ^{13}C ne sont pas les mêmes pour les deux isotopes ; quel que soit le vecteur, le ^{13}C apparaît plus rapidement dans le plasma que le ^{15}N . L'enrichissement des acides aminés plasmatiques est plus homogène pour le ^{15}N que pour le ^{13}C ; en effet avec le ^{13}C certains acides aminés, comme la méthionine et la lysine, s'enrichissent très peu au cours du temps. Au contraire, la méthionine est l'acide aminé le plus enrichi en ^{15}N dans le plasma pour les deux groupes. Ces éléments interrogent surtout sur le calcul des moyennes des plateaux isotopiques. Etant donné les différences, entre groupes, entre volontaires et entre isotopes, faut-il prendre des bornes identiques aux deux groupes et/ou aux deux isotopes ? Nous avons fait le choix de prendre, pour chaque groupe, les temps de plateau communs aux deux isotopes. Ainsi, pour le groupe chocolat, le plateau isotopique était situé entre 3,5 h et 7 h pour le ^{15}N et entre 2,5 h et 5 h pour le ^{13}C , nous avons donc calculé les moyennes pour les deux isotopes entre 3,5 h et 5 h. Dans les faits, l'utilisation des deux calculs, AUC et plateau, produit des résultats similaires (**Table 17**), surtout dans le groupe chocolat même si dans le groupe compote, il y a une tendance à ce que l'absorption soit plus importante avec l'AUC qu'avec le plateau. D'emblée, on remarque que les valeurs sont aberrantes pour la méthionine et la phénylalanine avec des valeurs supérieures à 100% ou au contraire très faibles. Pour les autres acides aminés, les valeurs sont relativement éloignées de celles de digestibilité iléales, même si les p_{values} n'indiquent pas de différence. Cela est dû à la très grande variabilité interindividuelle des valeurs plasmatiques.

	Indice d'absorption des AAI dans le plasma			Digestibilité iléale des AAI	Indice d'absorption vs digestibilité	
	AUC	Plateau	P _{value}		AUC	Plateau
Groupe chocolat (n = 7)						
Valine	71,9 ± 5,9	69,6 ± 8,8	0,18	86,7 ± 5,8	<0,001	<0,001
Leucine	65,5 ± 6,9	66,2 ± 10,3	0,77	88,5 ± 5,5	<0,001	<0,001
Isoleucine	65,9 ± 5,8	67,6 ± 10,5	0,55	85,9 ± 6,1	<0,001	<0,001
Thréonine	77,7 ± 5,4	74,6 ± 2,9	0,33	83,8 ± 6,0	0,13	<0,01
Méthionine	130,3 ± 77,5	173,6 ± 110,2	0,21	89,3 ± 7,8	0,19	0,08
Phénylalanine	119,5 ± 40,5	126,9 ± 48,5	0,38	88,9 ± 6,2	0,07	0,06
Lysine	94,9 ± 32,5	92,1 ± 30,9	0,59	84,4 ± 5,0	0,40	0,49
Groupe compote (n = 5)						
Valine	80,8 ± 9,2	79,9 ± 16,2	0,13	91,0 ± 5,4	0,11	0,10
Leucine	77,8 ± 11,5	69,3 ± 17,8	0,06	92,5 ± 5,4	0,06	0,06
Isoleucine	78,9 ± 10,3	67,2 ± 15,8	0,08	90,4 ± 6,4	0,05	0,05
Thréonine	73,7 ± 7,0	66,7 ± 12,7	0,09	88,8 ± 6,2	0,04	0,04
Méthionine	64,8 ± 26,4	54,3 ± 22,6	0,02	95,0 ± 3,1	0,08	0,02
Phénylalanine	107,3 ± 23,0	99,5 ± 37,8	0,38	92,6 ± 6,8	0,33	0,74
Lysine	83,6 ± 16,3	73,9 ± 21,1	0,09	87,7 ± 5,7	0,66	0,29

Table 17. Indices d'absorption plasmatiques calculés avec les aires sous courbes (AUC) et la moyenne du plateau isotopie (Plateau) et digestibilité iléale des acides aminés indispensables. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type, n = 12. Les différences entre méthodes de calcul et les différences entre absorption et digestibilité sont testées avec des t-test appariés. Toutes les valeurs sont issues de l'**Article 4**.

Ces résultats montrent des résultats satisfaisants pour certains acides aminés, mais ne permettent pas à ce stade de valider l'utilisation de la méthode double traceur, en tout cas pas dans nos conditions méthodologiques. La première limite de cette étude est l'utilisation de l'azote 15. Nous avons initialement pour objectif de comparer l'utilisation du ¹⁵N et du ²H étant donné qu'il y avait peu de recul sur l'utilisation du deutérium dans les études de digestibilité. Mais en raison des conditions d'administration de l'eau deutérée en plein champ (Chapitre II - section 2.1) le marquage était insuffisant pour l'étudier *in vivo*. La transamination est une réaction entre un acide aminé et un cétoacide catalysée par une transaminase (219). Ces réactions entraînent des échanges d'atomes d'azote qui perturbent le suivi des acides aminés alimentaires. Les transaminations concernent tous les acides aminés sauf la lysine, la thréonine et la proline (220). Les transaminations sont fréquentes dans le foie, or le prélèvement de sang se fait après passage dans cet organe. Une façon de limiter les transaminations serait de prélever le sang au niveau de la veine porte, ce qui n'est bien sûr pas possible chez l'Homme sain. La transamination affecte aussi, mais dans une moindre mesure, le marquage au

deutérium, un hydrogène des acides aminés étant aussi transféré lors de la réaction. Pour pallier ce problème, Devi *et al.* (185) ont déterminé par l'analyse en LC-MS un facteur de correction de transamination pour chaque acide aminé indispensable, qui est utilisé pour corriger les valeurs de digestibilité obtenues ultérieurement avec la méthode double traceur. Cet indice repose sur la quantité d'hydrogène ^2H dans l'acide aminé et le ratio entre la quantité de cet acide aminé transaminé et non transaminé. Les indices sont cohérents avec l'absence de transaminations de la thréonine, la lysine et la proline, mais la méthode de calcul n'est pas explicitée et donc difficilement reproductible. Néanmoins, il serait intéressant de mesurer un indice similaire pour le ^{15}N afin de pouvoir corriger nos valeurs. Une autre limite de cette étude est l'utilisation d'un vecteur ^{13}C séparé du biscuit. Il aurait été intéressant de regarder les résultats obtenus avec un seul aliment contenant les deux marqueurs. Un défaut inhérent à la méthode double traceur est de multiplier les incertitudes de mesures en multipliant le nombre d'analyses nécessaires. Il serait envisageable de faire des réplicats des analyses plasmatiques mais c'est une méthode qui est déjà lourde d'un point de vue analytique et augmenter encore le nombre d'analyses serait compliqué à mettre en place. En vue de la généralisation de la méthode double traceur, il semble préférable d'utiliser les AUC qui donnent des résultats plus en adéquation avec la mesure directe iléale.

Au regard des résultats publiés sur la méthode double traceur, on peut remarquer deux choses. Premièrement, pour les protéines animales les résultats obtenus avec cette méthode semblent cohérents avec ceux obtenus chez l'Homme par d'autres méthodes. Ainsi la digestibilité de l'œuf entier était de 89,4% avec la méthode double traceur (190) alors qu'elle était d'environ 90-91% avec des mesures directes de digestibilité (164,221). La même chose était observée pour la viande (94,190,222). En revanche, la corrélation était moins bonne pour les protéines végétales, les valeurs obtenues avec la méthode double traceur (191) étaient faibles et bien inférieures à celles obtenues avec des mesures digestives. Ainsi, la digestibilité du pois jaune était de 71,6% avec la méthode double traceur alors que la digestibilité iléale vraie du pois est de 89,4% par mesure directe (163,196). Deuxièmement, les données de digestibilité pour une même protéine ne sont pas tous répétables. Parmi les différentes études, certaines protéines ont été étudiées plusieurs fois, et si les moyennes sont proches pour l'œuf (2,9%), la spiruline (2,7%) et les haricots mungo entiers (4%), il existe de grandes disparités entre les acides aminés. Ainsi par exemple, pour l'œuf entier (190,192), l'écart de valeur entre les études va de 0,4% pour la phénylalanine à 13,3% pour la thréonine. Pour les pois chiches et les haricots mungo décortiqués, les écarts moyens sont encore plus importants, 14,4% et 9,7% respectivement.

Tout comme dans les études chez le rat, nous avons aussi utilisé le principe de cette méthode des ratios pour recalculer les indices d'absorption des acides aminés indispensables dans l'iléon par mesure des enrichissements isotopiques dans les contenus iléaux. Avec le ^{15}N , l'enrichissement des acides aminés dans les contenus iléaux apparaît rapidement dans les deux groupes (**Figure 23A et B**). Le plateau est atteint à 3 h et dure jusque 7 h avant une légère diminution dans la dernière heure. De façon logique, les enrichissements sont supérieurs à ceux

mesurés dans les acides aminés libres plasmatiques et ils sont les mêmes pour tous les acides aminés indispensables, hormis la méthionine dont l'enrichissement est le plus important à la fois dans le plasma et dans le contenu iléal. Il n'y a pas de différences entre les deux groupes. En revanche, avec le ^{13}C , l'enrichissement des acides aminés augmente de façon continue pendant toute l'expérience (**Figure 23C et D**). Il n'y a pas de plateau, sauf pour quelques acides aminés dans le groupe compote (méthionine, thréonine et lysine). A 8 h, l'enrichissement en ^{13}C est en moyenne plus élevé dans le groupe compote que dans le groupe chocolat, ce qui témoigne encore de l'effet du vecteur sur les résultats. En l'absence de plateau, nous avons seulement utilisé la mesure de l'aire sous la courbe pour les ratios isotopiques iléaux.

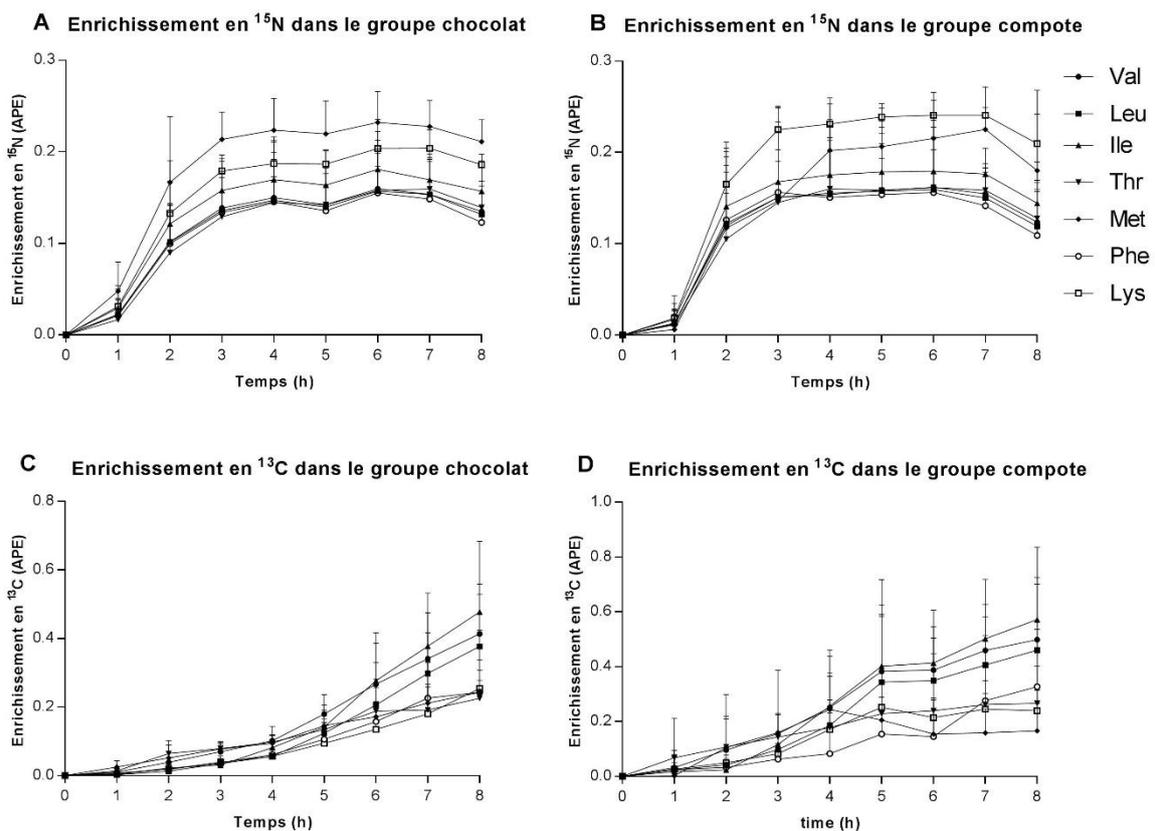


Figure 23. Cinétique d'enrichissement des acides aminés indispensables. (A) dans le groupe chocolat avec le ^{15}N . (B) dans le groupe compote avec le ^{15}N . (C) dans le groupe chocolat avec le ^{13}C . (D) dans le groupe compote avec le ^{13}C . Les valeurs sont des moyennes \pm écart-type, $n = 7$ pour le groupe chocolat et $n = 5$ pour le groupe compote. Les enrichissements sont exprimés en APE.

Il n'y a pas de différences d'AUC en ^{15}N entre les deux vecteurs, sauf pour la lysine (**Table 18**). En revanche, il y a plus de différences entre les deux vecteurs pour les AUC en ^{13}C , ce qui était attendu au vue des courbes d'enrichissement.

Aire sous la courbe dans l'iléon						
	Isolat de tournesol ¹⁵ N			Acides aminés ¹³ C		
	Chocolat	Compote	P _{value}	Chocolat	Compote	P _{value}
Valine	0,94 ± 0,17	0,98 ± 0,34	0,79	1,22 ± 0,40	2,02 ± 0,78	0,04
Leucine	0,92 ± 0,15	0,97 ± 0,30	0,74	0,92 ± 0,31	1,68 ± 0,76	0,04
Isoleucine	1,07 ± 0,17	1,11 ± 0,31	0,79	1,17 ± 0,42	2,02 ± 1,03	0,07
Thréonine	0,91 ± 0,06	0,97 ± 0,20	0,51	0,88 ± 0,27	1,36 ± 0,39	0,08
Méthionine	1,44 ± 0,15	1,21 ± 0,24	0,07	0,90 ± 0,16	1,11 ± 0,66	0,42
Phénylalanine	0,90 ± 0,26	0,95 ± 0,42	0,80	0,74 ± 0,33	0,94 ± 0,47	0,40
Lysine	1,22 ± 0,04	1,47 ± 0,08	<0,001	0,66 ± 0,22	1,16 ± 1,15	0,27
Moyenne	1,06 ± 0,24	1,09 ± 0,32	0,56	0,93 ± 0,36	1,47 ± 0,83	<0,001

Table 18. Aires sous la courbe des acides aminés indispensables ¹⁵N et ¹³C dans l'iléon. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type, n = 7 pour le groupe chocolat et n = 5 pour le groupe compote. Les différences entre groupes sont testées avec des t-test non appariés.

Tout comme pour les valeurs d'absorption dans le plasma, les valeurs iléales ont été comparées à celles de digestibilité des acides aminés (**Table 19** et **Figure 24**). De même que pour la digestibilité iléale, il n'y a pas de différences statistiques entre les deux groupes malgré une tendance à une digestibilité supérieure dans le groupe compote. L'écart moyen entre les deux groupes est de 5,0% pour l'absorption et de 4,4% pour la digestibilité. Il n'y a pas non plus de différences entre les valeurs d'absorption et de digestibilité iléales, et ce pour les deux groupes, mais nous observons une variabilité interindividuelle plus importante avec l'absorption qu'avec la digestibilité. L'écart entre les deux indices est de 0,59% pour le groupe chocolat et de 0,06% pour le groupe compote.

	Absorption des AAI dans l'iléon			Digestibilité des AAI dans l'iléon			Absorption vs digestibilité	
	Chocolat	Compote	P _{value}	Chocolat	Compote	P _{value}	Chocolat	Compote
Valine	86,6 ± 7,6	91,4 ± 6,6	0,28	86,7 ± 5,8	91,0 ± 5,4	0,25	0,90	0,52
Leucine	88,3 ± 7,5	92,8 ± 5,5	0,28	88,5 ± 5,5	92,5 ± 5,4	0,24	0,88	0,43
Isoleucine	85,4 ± 8,8	90,8 ± 6,6	0,27	85,9 ± 6,1	90,4 ± 6,4	0,24	0,74	0,53
Thréonine	85,0 ± 6,0	88,9 ± 6,8	0,39	83,8 ± 6,0	88,8 ± 6,2	0,19	0,77	0,89
Méthionine	89,5 ± 7,8	94,9 ± 3,4	0,18	89,3 ± 7,8	95,0 ± 3,1	0,16	0,84	0,58
Phénylalanine	88,6 ± 7,5	92,8 ± 5,8	0,32	88,9 ± 6,2	92,6 ± 6,8	0,35	0,79	0,87
Lysine	81,3 ± 9,1	87,0 ± 6,8	0,27	84,4 ± 5,0	87,7 ± 5,7	0,31	0,14	0,40
Moyenne	86,2 ± 7,5	91,2 ± 5,7	0,24	86,8 ± 6,1	91,2 ± 5,8	<0,01	0,64	0,90

Table 19. Indices d'absorption et digestibilité iléale des acides aminés indispensables. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type, n = 7 pour le groupe chocolat et n = 5 pour le groupe compote. Les différences entre groupes sont testées avec des t-test non appariés et les différences entre absorption et digestibilité sont testées avec des t-test appariés. Les valeurs de digestibilité iléale sont tirées de l'**Article 4**.

Comme pour les données caecales chez le rat, on peut considérer que la méthode double traceur appliquée aux digestas donne un bon proxy de la digestibilité iléale. Cette méthode a le même avantage que celui décrit chez le rat précédemment, c'est-à-dire de s'affranchir de la quantification précise de la quantité d'effluents digestifs (et donc de l'utilisation d'un marqueur non absorbable) mais elle n'en est pas moins invasive puisqu'il faut recueillir des digestas iléaux.

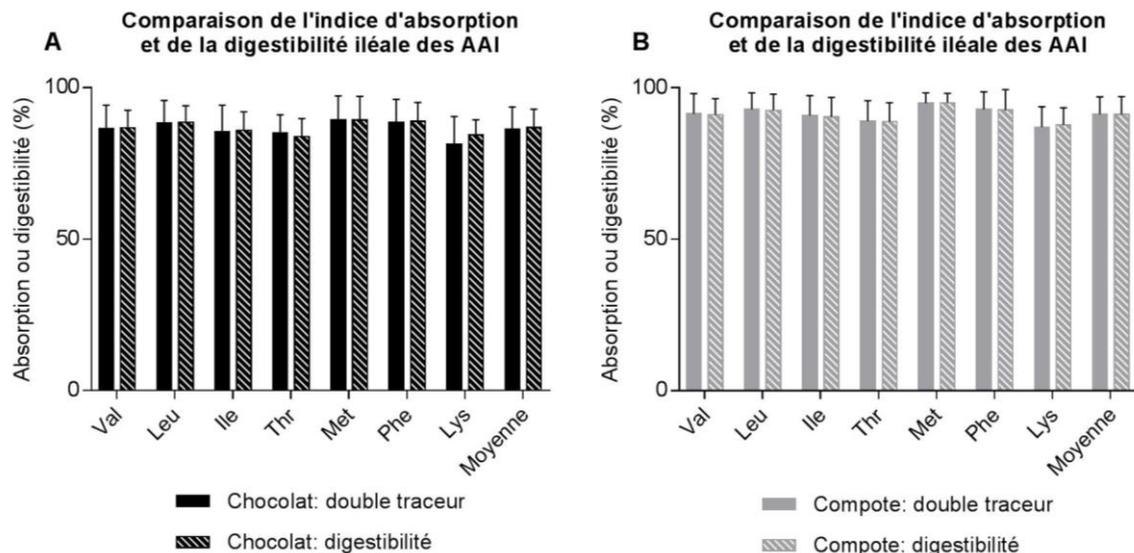


Figure 24. Indices d'absorption des acides aminés indispensables dans l'iléon calculés en utilisant la méthode double traceur et comparaison avec les valeurs de digestibilité iléale dans le groupe chocolat (A) et compote (B). Les valeurs sont des moyennes \pm écart-type, n = 7 pour le groupe chocolat et n = 5 pour le groupe compote. Les différences entre groupes sont testées avec des t-test non appariés et les différences entre absorption et digestibilité sont testées avec des t-test appariés.

Points-clés :

- Ces données sont les premières à comparer la méthode double traceur avec la mesure directe de la digestibilité
- Ce travail a permis de cerner les limites méthodologiques inhérentes à cette méthode
- La spiruline n'est pas la meilleure protéine de référence utilisable pour la méthode double traceur dans l'état actuel des connaissances sur sa qualité protéique
- Le rat n'est pas un bon modèle pour la mise en place de la méthode double traceur
- La méthode double traceur $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ chez l'Homme demande encore des développements et sa comparaison avec la méthode de mesure directe dans l'iléon ne permet pas de la valider en l'état actuel
- L'utilisation de la méthode double traceur dans les effluents est valable chez le rat et l'Homme, et est intéressante en vue de la mesure de la digestibilité iléale chez le rat

2. Conclusion

Pour conclure, ce travail de thèse a permis d'évaluer la qualité protéique d'un isolat de tournesol et d'explorer les conditions de mise en œuvre de la méthode double traceur. Toutes les expériences menées se sont basées sur l'utilisation de protéines marquées avec des isotopes stables (^{15}N , ^2H , ^{13}C) pour mesurer la digestibilité digestive des protéines et acides aminés alimentaires, ainsi que pour suivre leur devenir postprandial.

S'il existe un certain nombre d'études sur la digestibilité de graines ou de tourteaux de tournesol dans des modèles porcins, ces travaux sont les premiers à fournir des données de digestibilité d'isolat de tournesol chez le rat et chez l'Homme.

Cette thèse est l'aboutissement d'un long travail collaboratif, regroupant des compétences variées, allant de la culture des plantes et du marquage des protéines à la production de biscuits contenant l'isolat de tournesol, et en passant par l'extraction et la purification des protéines. Ainsi, la culture inédite d'une plante doublement marquée a commencé un an avant le début de cette thèse. Tout ce travail a été ponctué de réussites, comme l'obtention d'isolats suffisamment enrichis, et de difficultés, comme l'échec du marquage au deutérium en plein champ.

L'étude pilote chez le rat nous a permis de montrer que l'isolat de tournesol cru avait une très bonne digestibilité (95,1%), proche de celle obtenue pour le lait ou la viande. En revanche la digestibilité iléale de l'isolat contenu dans des biscuits était plus faible (87,2%) ce qui, outre le passage du rat à l'Homme, est probablement lié à l'utilisation d'un aliment complexe et cuit. Les protéines de tournesol sont limitées en lysine et nous avons montré que le DIAAS dépendait du facteur de conversion de l'azote en protéines choisi. Si 6,25 permet une comparaison directe entre les protéines, il est reconnu que ce facteur n'est pas adapté à toutes les protéines. De ce fait, le DIAAS varie entre 0,78 ($\text{N} \times 6,25$) et 0,94 ($\text{N} \times 5,29$) chez l'Homme. Ainsi, en utilisant des facteurs de conversions plus adaptés aux protéolégumineux, le tournesol reste limité en lysine mais de façon plus marginale. La détermination précise d'un facteur de conversion pour l'isolat de tournesol permettrait d'affiner ces résultats. L'utilisation postprandiale nette du tournesol chez l'Homme s'est révélée bonne mais pourrait être surestimée du fait du protocole de repas mis en place pendant l'étude, l'étalement des repas réduisant les pertes métaboliques. Les différents indices de qualité obtenus dans mon travail et résumés dans le tableau ci-dessous indiquent que l'isolat de tournesol s'avère modérément limitant en lysine et est intéressant pour participer à l'apport protéique en alimentation humaine (**Table 20**).

Indices de qualité des protéines de tournesol				
Isolat	Cru		Cuit dans un biscuit	
Modèle	Rat		Homme	
Digestibilité des protéines (%)				
Fécale	95,1 ± 0,5		/	
Iléale	/		87,2 ± 4,6	
Digestibilité moyenne des acides aminés (%)				
Indispensables	96,1 ± 0,1		88,6 ± 6,3	
Tous AA confondus	96,3 ± 0,2		84,0 ± 6,7	
Autres indices de qualité protéique				
UPPN (%)				
	/		72,4 ± 3,8	
DIAAS				
Facteur de conversion	N x 6,25	Nx 5,29	N x 6,25	Nx 5,29
Acide aminé limitant	Lysine	Lysine	Lysine	Lysine
Score	0,84	0,99	0,78	0,94

Table 20. Récapitulatif des résultats de qualité protéique du tournesol obtenus. Les valeurs sont des moyennes ± écart-type, n = 8 pour les valeurs chez le rat et n = 12 pour les valeurs chez l'homme. Le DIAAS est exprimé en fonction de deux facteurs de conversions de l'azote en protéines.

Concernant la méthode double traceur, ce travail a permis de lever un certain nombre d'incertitudes, tout en ajoutant d'autres pistes de réflexion. Le rapport FAO proposant cette méthode préconisait d'utiliser le marquage au deutérium pour la protéine testée afin d'éviter les transferts des marquages par transamination. La première étape a donc été de valider l'utilisation de ce marqueur pour les études de digestibilité, ce qui n'avait jamais été fait. En utilisant des protéines doublement marquées nous avons pu montrer, pour le lactosérum de chèvre et le tournesol, que le marquage au ^2H donnait des résultats similaires au ^{15}N chez le rat. Initialement, l'isolat utilisé dans l'étude clinique devait aussi être doublement marqué mais le marquage au ^2H s'est avéré insuffisant. Le travail d'experts FAO préconisait la spiruline comme protéine de référence pour la méthode double traceur, mais il existait peu de données sur la digestibilité de ses acides aminés, un des critères pour le choix de la protéine de référence qui doit être hautement digestible, selon le rapport. Nous avons exploré en détail chez le rat la digestibilité de la spiruline dans différentes conditions, avec différents traceurs, ^{15}N ou ^{13}C , en dose normale ou en dose traceur et dans ce dernier cas, incorporée dans différents repas. Ce travail de thèse a montré que la digestibilité des acides aminés de spiruline est modérée (86%), probablement à cause de l'utilisation de cellules entières et non de protéines purifiées, et que la digestibilité pouvait dépendre des conditions expérimentales. Ces éléments nous ont confortés dans le choix d'un mélange d'acides aminés libres ^{13}C au lieu de la spiruline comme protéine de référence pour l'étude clinique. Cependant, cela nous a amenés à utiliser un vecteur séparé du biscuit pour leur ingestion, ce qui a posé des problèmes, tels qu'un déphasage entre

les marqueurs isotopiques. L'utilisation d'un seul aliment contenant toutes les protéines et acides aminés marqués serait préférable pour améliorer les résultats obtenus.

Nous avons aussi voulu évaluer la faisabilité de la méthode double traceur chez le rat, car il n'existe pas de méthode standardisée de digestibilité iléale dans ce modèle. Cette méthode pourrait donc être une solution. Malheureusement, nous avons rencontré des verrous majeurs, notamment en raison de l'impossibilité de prélever suffisamment de sang en séquentiel pour mesurer les enrichissements plasmatiques. Nous avons obtenu des résultats plus ou moins compatibles avec des valeurs physiologiques, variables selon la protéine étudiée et le temps de prélèvement. Un temps de prélèvement proche de 3 h semble plus adéquat que 6 h, mais des études supplémentaires seraient nécessaires. En revanche, nous avons éprouvé la méthode des ratios isotopiques dans les contenus digestifs et nous avons montré une bonne corrélation avec la mesure directe de la digestibilité, ce qui ouvre un champ potentiel d'application pour la mesure iléale chez le rat. Enfin, ces travaux sont les premiers à comparer les résultats obtenus avec la méthode double traceur à la digestibilité iléale chez l'Homme, les premières études publiées sur cette méthode n'utilisant pas de mesure digestive pour valider les valeurs obtenues. Nos résultats ont montré, malgré des valeurs inférieures, une assez bonne correspondance entre la méthode double traceur et la digestibilité iléale, à l'exception de la méthionine et de la phénylalanine dont les valeurs étaient physiologiquement aberrantes. Il serait intéressant de réaliser une étude similaire avec le ^2H plutôt que le ^{15}N qui intervient massivement dans les processus de transaminations.

Malgré quelques freins, comme le déséquilibre en lysine ou le coût d'obtention d'isolats, on peut considérer que les protéines de tournesol sont intéressantes pour une valorisation en nutrition humaine sous forme de produits hyperprotéinés. Dans le cadre du projet ProDige ce travail sera poursuivi par l'étude de deux autres sources de protéagineux, le colza et le lin. Le colza sera incorporé dans des biscuits sous forme de concentrat et le lin sous forme d'isolat.

Bibliographie

1. United Nations - Departement of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019 [Internet]. 2019. Available from: <https://population.un.org/wpp/>
2. Camilleri GM, Verger EO, Huneau J-F, Carpentier F, Dubuisson C, Mariotti F. Plant and Animal Protein Intakes Are Differently Associated with Nutrient Adequacy of the Diet of French Adults. *The Journal of Nutrition*. 2013;143:1466–73.
3. FAO. FAOSTAT - Food and agriculture data [Internet]. 2020. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
4. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, et al. Meat, Fish, and Colorectal Cancer Risk: The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97:906–16.
5. Diallo A, Deschasaux M, Latino-Martel P, Hercberg S, Galan P, Fassier P, Allès B, Guéraud F, Pierre FH, Touvier M. Red and processed meat intake and cancer risk: Results from the prospective NutriNet-Santé cohort study: Red and processed meat intake and cancer risk. *Int J Cancer*. 2018;142:230–7.
6. Abete I, Romaguera D, Vieira AR, Lopez de Munain A, Norat T. Association between total, processed, red and white meat consumption and all-cause, CVD and IHD mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Nutr*. 2014;112:762–75.
7. Foley JA, Ramankutty N, Brauman KA, Cassidy ES, Gerber JS, Johnston M, Mueller ND, O'Connell C, Ray DK, West PC, et al. Solutions for a cultivated planet. *Nature*. 2011;478:337–42.
8. Agreste. Carte interactive - superficie agricole utilisée [Internet]. 2020. Available from: <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/Carte-RA-sauaa/detail/>
9. Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2013. 115 p.
10. Colomb V, Colsaet A, Basset-Mens C, Fosse J, Gac A, Mevel G, Mousset J, Tailleur A, Van der Werf H. Analyses du Cycle de Vie en agriculture: enseignements du programme AGRIBALYSE®. *Agronomie, Environnement & Sociétés*. 2015;117–31.
11. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Infographie - Le secteur des terres et les gaz à effet de serre en France [Internet]. 2017. Available from: <https://agriculture.gouv.fr/infographie-le-secteur-des-terres-et-les-gaz-effet-de-serre-en-france>

12. U.S. Department of Agriculture. FoodData Central [Internet]. 2019. Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/>
13. Terres Univia. Tournesol - Les espèces cultivées - Cultures & utilisation [Internet]. 2018. <http://www.terresunivia.fr/cultures-utilisation/les-especes-cultivees/tournesol>
14. Liu JD, Li QY, Zeng ZK, Li P, Xu X, Wang HL, Zhang S, Piao XS. Determination and Prediction of the Amino Acid Digestibility of Sunflower Seed Meals in Growing Pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014;28:86–94.
15. González-Vega JC, Stein HH. Amino acid digestibility in canola, cottonseed, and sunflower products fed to finishing pigs. *J Anim Sci.* 2012;90:4391–400.
16. Nørgaard JV, Fernández JA, Jørgensen H. Ileal digestibility of sunflower meal, pea, rapeseed cake, and lupine in pigs. *J Anim Sci.* 2012;90:203–5.
17. Almeida FN, Htoo JK, Thomson J, Stein HH. Digestibility by growing pigs of amino acids in heat-damaged sunflower meal and cottonseed meal. *J Anim Sci.* 2014;92:585–93.
18. Albe Slabi S, Mathe C, Basselin M, Framboisier X, Ndiaye M, Galet O, Kapel R. Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal. *Food Chemistry.* 2020;317:126423.
19. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *J Oral Rehabil.* 2018;45:730–46.
20. Goodman BE. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education.* 2010;34:44–53.
21. Spanier B, Rohm F. Proton Coupled Oligopeptide Transporter 1 (PepT1) Function, Regulation, and Influence on the Intestinal Homeostasis. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2018. p. 843–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c170038>
22. Bröer S. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiological Reviews.* 2008;88:249–86.
23. Grala W, Buraczewska L, Wasilewko J, Verstegen M, Tamminga S, Jansman A, Huisman J, Korczyński W. Flow of endogenous and exogenous nitrogen indifferent segments of the small intestine in pigs fed diets with soyabean concentrate, soyabean meal or rapeseed cake. *J Anim Feed Sci.* 1998;7:1–20.
24. Gibson SA, McFarlan C, Hay S, MacFarlane GT. Significance of microflora in proteolysis in the colon. *Applied and Environmental Microbiology.* 1989;55:679–83.
25. Bergen WG, Wu G. Intestinal Nitrogen Recycling and Utilization in Health and Disease. *The Journal of Nutrition.* 2009;139:821–5.

26. van der Wielen N, Moughan PJ, Mensink M. Amino Acid Absorption in the Large Intestine of Humans and Porcine Models. *J Nutr.* 2017;147:1493–8.
27. Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti P-H, Sanz Y, Tomé D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacological Research.* 2013;68:95–107.
28. Raj T, Dileep U, Vaz M, Fuller MF, Kurpad AV. Intestinal Microbial Contribution to Metabolic Leucine Input in Adult Men. *The Journal of Nutrition.* 2008;138:2217–21.
29. Hendriks WH, van Baal J, Bosch G. Ileal and faecal protein digestibility measurement in humans and other non-ruminants – a comparative species view. *British Journal of Nutrition.* 2012;108:S247–57.
30. Wuensch T, Schulz S, Ullrich S, Lill N, Stelzl T, Rubio-Aliaga I, Loh G, Chamaillard M, Haller D, Daniel H. The peptide transporter PEPT1 is expressed in distal colon in rodents and humans and contributes to water absorption. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2013;305:G66–73.
31. Bröer S, Fairweather SJ. Amino acid transport across the mammalian intestine. *Compr Physiol.* 2018;9:343–73.
32. WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. Geneva: WHO; 2007. 265 p.
33. Rand WM, Pellett PL, Young VR. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2003;77:109–27.
34. Weijs PJM, Wolfe RR. Exploration of the protein requirement during weight loss in obese older adults. *Clinical Nutrition.* 2016;35:394–8.
35. Reeds PJ. Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. *The Journal of Nutrition.* 2000;130:1835S-1840S.
36. Boutry C, Bos C, Tomé D. Les besoins en acides aminés. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* 2008;22:151–60.
37. FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Energy and protein requirements. Geneva; 1985. 112 p. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39527/WHO_TRS_724_\(chp1-chp6\).pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39527/WHO_TRS_724_(chp1-chp6).pdf?sequence=1)
38. Kurpad AV, Regan MM, Raj T, Gnanou JV. Branched-Chain Amino Acid Requirements in Healthy Adult Human Subjects. *J Nutr.* 2006;136:256S-263S.
39. Moehn S, Bertolo RFP, Pencharz PB, Ball RO. Development of the Indicator Amino Acid Oxidation Technique to Determine the Availability of Amino Acids from Dietary Protein in Pigs. *J Nutr.* 2005;135:2866–70.

40. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Indicator Amino Acid Oxidation: Concept and Application. *J Nutr.* 2008;138:243–6.
41. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino Acids.* 2009;37:19–27.
42. FAO Expert Working Group. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods. 2014. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i4325e.pdf>
43. Pencharz PB, Ball RO. Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu Rev Nutr.* 2003;23:101–16.
44. FAO Expert Consultation, editor. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. 66 p. <http://www.fao.org/ag/humannutrition/35978-02317b979a686a57aa4593304ffc17f06.pdf>
45. Pillai RR, Kurpad AV. Amino acid requirements in children and the elderly population. *Br J Nutr.* 2012;108:S44–9.
46. Elango R, Ball RO. Protein and Amino Acid Requirements during Pregnancy. *Advances in Nutrition: An International Review Journal.* 2016;7:839S-844S.
47. Kuriyan R, Kurpad AV, Uauy R. Protein Requirements of Pregnant and Lactating Women. *Sight and Life.* 2016;30:6.
48. Short KR, Nair KS. The effect of age on protein metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2000;3:39–44.
49. Courtney-Martin G, Ball RO, Pencharz P, Elango R. Protein Requirements during Aging. *Nutrients.* 2016;8:492.
50. Nowson C, O'Connell S. Protein Requirements and Recommendations for Older People: A Review. *Nutrients.* 2015;7:6874–99.
51. Afssa. Apport en protéines: consommation, qualité, besoins et recommandations. Agence française de sécurité sanitaire des aliments; 2007 p. 461. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-Proteines.pdf>
52. Janicki J, Sobkowska E, Warchalewski J, Nowakowska K, Chełkowski J, Stasińska B. Amino Acid Composition of Cereal and Oilseed. *Food / Nahrung.* 1973;17:359–65.
53. Leterme P, Monmart T, Baudart E. Amino acid composition of pea (*Pisum sativum*) proteins and protein profile of pea flour. *J Sci Food Agric.* 1990;53:107–10.
54. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Bérot S, Evrard J, Fénart E, Tomé D, Gaudichon C. The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. *The Journal of Nutrition.* 2007;137:594–600.

55. Naves MMV, Castro MVL de, Mendonça AL de, Santos GG, Silva MS. Corn germ with pericarp in relation to whole corn: nutrient contents, food and protein efficiency, and protein digestibility-corrected amino acid score. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2011;31:264–9.
56. Hood-Niefer SD, Warkentin TD, Chibbar RN, Vandenberg A, Tyler RT. Effect of genotype and environment on the concentrations of starch and protein in, and the physicochemical properties of starch from, field pea and fababean. *J Sci Food Agric*. 2012;92:141–50.
57. Chung KH, Shin KO, Hwang HJ, Choi K-S. Chemical composition of nuts and seeds sold in Korea. *Nutr Res Pract*. 2013;7:82.
58. Magliano PN, Prystupa P, Gutiérrez-Boem FH. Protein content of grains of different size fractions in malting barley: Protein content and grain size in malting barley. *J Inst Brew*. 2014;120:347–52.
59. Mota C, Santos M, Mauro R, Samman N, Matos AS, Torres D, Castanheira I. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*. 2016;193:55–61.
60. Wu G, Cross HR, Gehring KB, Savell JW, Arnold AN, McNeill SH. Composition of free and peptide-bound amino acids in beef chuck, loin, and round cuts. *Journal of Animal Science*. 2016;94:2603–13.
61. Appenroth K-J, Sree KS, Böhm V, Hammann S, Vetter W, Leiterer M, Jahreis G. Nutritional value of duckweeds (*Lemnaceae*) as human food. *Food Chemistry*. 2017;217:266–73.
62. Churchward-Venne TA, Pinckaers PJM, van Loon JJA, van Loon LJC. Consideration of insects as a source of dietary protein for human consumption. *Nutrition Reviews*. 2017;75:1035–45.
63. Hulshof TG, van der Poel AFB, Hendriks WH, Bikker P. Amino acid utilization and body composition of growing pigs fed processed soybean meal or rapeseed meal with or without amino acid supplementation. *Animal*. 2017;11:1125–35.
64. Mathai JK, Liu Y, Stein HH. Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *British Journal of Nutrition*. 2017;117:490–9.
65. Kaewtapee C, Mosenthin R, Nenning S, Wiltafsky M, Schäffler M, Eklund M, Rosenfelder-Kuon P. Standardized ileal digestibility of amino acids in European soya bean and rapeseed products fed to growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2018;102:695–705.
66. Fond Français pour l'Alimentation & la Santé. Les protéines dans l'alimentation: vers un équilibre animal-végétal. Fond Français pour l'Alimentation & la Santé; 2019. Available from: <https://alimentation-sante.org/2019/10/le-ffas-publie-un-etat-des-lieux-sur-les-proteines-dans-l'alimentation-vers-un-equilibre-animal-vegetal/>

67. Han F, Han F, Wang Y, Fan L, Song G, Chen X, Jiang P, Miao H, Han Y. Digestible indispensable amino acid scores of nine cooked cereal grains. *British Journal of Nutrition*. 2019;121:30–41.
68. Mariotti F, Tomé D, Mirand P. Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008;48:177–84.
69. Tomé D, Cordella C, Dib O, Péron C. Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis. FAO/WHO; 2019. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331206>
70. Oh M, Kim E-K, Jeon B-T, Tang Y, Kim MS, Seong H-J, Moon S-H. Chemical compositions, free amino acid contents and antioxidant activities of Hanwoo (*Bos taurus coreanae*) beef by cut. *Meat Science*. 2016;119:16–21.
71. Réhault-Godbert S, Guyot N, Nys Y. The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*. 2019;11:684.
72. Áli-Khan ST, Youngs CG. Variation in protein content of field peas. *Can J Plant Sci*. 1973;53:37–41.
73. Vollmann J, Fritz CN, Wagentristl H, Ruckenbauer P. Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European growing conditions. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1300–6.
74. Anses. Ciqual - Table de composition nutritionnelle des aliments. 2020. Available from: <https://ciqual.anses.fr/>
75. Guéguen J, Walrand S, Bourgeois O. Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2016;51:177–85.
76. Mariotti F. Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality. *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*. Elsevier; 2017. p. 621–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128039687000356>
77. Gorissen SHM, Crombag JJR, Senden JMG, Waterval WAH, Bierau J, Verdijk LB, van Loon LJC. Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino Acids*. 2018;50:1685–95.
78. Gilani GS, Wu Xiao C, Cockell KA. 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:S315–32.
79. Hoseini SM, Khosravi-Darani K, Mozafari MR. Nutritional and Medical Applications of *Spirulina Microalgae*. *MRMCM*. 2013;13:1231–7.

80. Lupatini AL, Colla LM, Canan C, Colla E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017;97:724–32.
81. Habib MAB. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008. 33 p. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i0424e.pdf>
82. Huis A van, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. Edible insects: future prospects for food and feed security. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013. 187 p.
83. Nowak V, Persijn D, Rittenschober D, Charrondiere UR. Review of food composition data for edible insects. *Food Chemistry*. 2016;193:39–46.
84. Verkerk MC, Tramper J, van Trijp JCM, Martens DE. Insect cells for human food. *Biotechnology Advances*. 2007;25:198–202.
85. Rumpold BA, Schlüter OK. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol Nutr Food Res*. 2013;57:802–23.
86. Rusoff LL, Blakeney EW, Culley DD. Duckweeds (*Lemnaceae* family): a potential source of protein and amino acids. *J Agric Food Chem*. 1980;28:848–50.
87. Boye J, Wijesinha-Bettoni R, Burlingame B. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br J Nutr*. 2012;108:S183–211.
88. FAO/WHO Expert Consultation, editor. Protein quality evaluation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1991. 66 p.
89. Chapman DG, Castillo R, Campbell JA. Evaluation of protein in food: 1. a method for the determination of protein efficiency ratios. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1959;37:679–86.
90. Sarwar G. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats. *The Journal of Nutrition*. 1997;127:758–64.
91. Millward DJ. Human Amino Acid Requirements. *J Nutr*. 1997;127:1842–6.
92. Sarwar G, Peace RW. The Protein Quality of Some Enterai Products Is Inferior to That of Casein as Assessed by Rat Growth Methods and Digestibility-Corrected Amino Acid Scores. *J Nutr*. 1994;124:2223–32.
93. Pai MP, Paloucek FP. The Origin of the “Ideal” Body Weight Equations. *Ann Pharmacother*. 2000;34:1066–9.

94. Oberli M, Marsset-Baglieri A, Airinei G, Santé-Lhoutellier V, Khodorova N, Rémond D, Foucault-Simonin A, Piedcoq J, Tomé D, Fromentin G, et al. High True Ileal Digestibility but Not Postprandial Utilization of Nitrogen from Bovine Meat Protein in Humans Is Moderately Decreased by High-Temperature, Long-Duration Cooking. *J Nutr.* 2015;145:2221–8.
95. Gaudichon C, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Daré S, Van Oycke M, Ferrière F, Rautureau J, Tomé D. Net Postprandial Utilization of [¹⁵N]-Labeled Milk Protein Nitrogen Is Influenced by Diet Composition in Humans. *J Nutr.* 1999;129:890–5.
96. Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Bérot S, Benamouzig R, Mahé S. The Influence of the Albumin Fraction on the Bioavailability and Postprandial Utilization of Pea Protein Given Selectively to Humans. *The Journal of Nutrition.* 2001;131:1706–13.
97. Bos C, Juillet B, Fouillet H, Turlan L, Daré S, Luengo C, N'tounda R, Benamouzig R, Gausserès N, Tomé D, et al. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:87–94.
98. Mariotti F, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Daré S, Gaudichon C, Tomé D. Nutritional Value of [¹⁵N]-Soy Protein Isolate Assessed from Ileal Digestibility and Postprandial Protein Utilization in Humans. *J Nutr.* 1999;129:1992–7.
99. Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Mahé S. The bioavailability and postprandial utilisation of sweet lupin (*Lupinus albus*)-flour protein is similar to that of purified soyabean protein in human subjects: a study using intrinsically N-labelled proteins. *British Journal of Nutrition.* 2002;87:315.
100. Hoffman JR, Falvo MJ. Protein - Which is best? *J Sports Sci Med.* 2004;3:118–30.
101. Srikantia SG. The use of biological value of a protein. Roma: FAO/WHO/UNU; 1981 Aug. Available from: <http://www.fao.org/3/M2835E/M2835E00.htm>
102. Rérat A, Nunes CS, Mendy F, Roger L. Amino acid absorption and production of pancreatic hormones in non-anaesthetized pigs after duodenal infusions of a milk enzymic hydrolysate or of free amino acids. *Br J Nutr.* 1988;60:121–36.
103. Stein HH, Fuller MF, Moughan PJ, Sève B, Mosenthin R, Jansman AJM, Fernández JA, de Lange CFM. Definition of apparent, true, and standardized ileal digestibility of amino acids in pigs. *Livestock Science.* 2007;109:282–5.
104. Fan MZ, Sauer WC, Hardin RT, Lien KA. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in pigs: effect of dietary amino acid level. *Journal of Animal Science.* 1994;72:2851–9.
105. Jansman AJM, Smink W, van Leeuwen P, Rademacher M. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. *Animal Feed Science and Technology.* 2002;98:49–60.

106. Huisman J, Heinz T, Van Der Poel AFB, Van Leeuwen P, Souffrant WB, Verstegen MWA. True protein digestibility and amounts of endogenous protein measured with the N-dilution technique in piglets fed on peas (*Pisum sativum*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*). *British Journal of Nutrition*. 1992;68:101.
107. Stein HH, Trottier NL, Bellaver C, Easter RA. The effect of feeding level and physiological status on total flow and amino acid composition of endogenous protein at the distal ileum in swine. *Journal of Animal Science*. 1999;77:1180.
108. Schulze H, van Leeuwen P, Verstegen MWA, Van Den Berg JWO. Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous nitrogen flow in pigs. *J Anim Sci*. 1995;73:441–8.
109. Stein HH, Sève B, Fuller MF, Moughan PJ, de Lange CFM. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. *Journal of Animal Science*. 2007;85:172–80.
110. Schaafsma G. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score. *The Journal of Nutrition*. 2000;130:1865S-1867S.
111. Schaafsma G. Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. *British Journal of Nutrition*. 2012;108:S333–6.
112. Rutherfurd SM, Fanning AC, Miller BJ, Moughan PJ. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *J Nutr*. 2015;145:372–9.
113. Wolfe RR, Rutherfurd SM, Kim I-Y, Moughan PJ. Protein quality as determined by the Digestible Indispensable Amino Acid Score: evaluation of factors underlying the calculation: Table 1. *Nutrition Reviews*. 2016;74:584–99.
114. Lucas-González R, Viuda-Martos M, Pérez-Alvarez JA, Fernández-López J. *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*. 2018;107:423–36.
115. Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carrière F, Boutrou R, Corredig M, Dupont D, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct*. 2014;5:1113–24.
116. Krul C, Luiten-Schuite A, Baan R, Verhagen H, Mohn G, Feron V, Havenaar R. Application of a dynamic *in vitro* gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38:783–92.
117. Dupont D, Alric M, Blanquet-Diot S, Bornhorst G, Cueva C, Deglaire A, Denis S, Ferrua M, Havenaar R, Lelieveld J, et al. Can dynamic *in vitro* digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59:1546–62.

118. Egger L, Schlegel P, Baumann C, Stoffers H, Guggisberg D, Brügger C, Dürr D, Stoll P, Vergères G, Portmann R. Physiological comparability of the harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method to *in vivo* pig digestion. *Food Research International*. 2017;102:567–74.
119. Egger L, Ménard O, Baumann C, Duerr D, Schlegel P, Stoll P, Vergères G, Dupont D, Portmann R. Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic *in vitro* digestion systems with *in vivo* data. *Food Research International*. 2019;118:32–9.
120. Rozan P, Lamghari R, Linder M, Villaume C, Fanni J, Parmentier M, Méjean L. *In Vivo* and *In Vitro* Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes. *J Agric Food Chem*. 1997;45:1762–9.
121. Cho JH, Kim IH. Evaluation of the Apparent Ileal Digestibility (AID) of Protein and Amino Acids in Nursery Diets by *In vitro* and *In vivo* Methods. *Asian Australas J Anim Sci*. 2011;24:1007–10.
122. Savoie L, Agudelo R, Gauthier S, Marin J, Pouliot Y. *In vitro* determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins. *Journal of AOAC International*. 2005;88:935–48.
123. Butts CA, Monro JA, Moughan PJ. *In vitro* determination of dietary protein and amino acid digestibility for humans. *British Journal of Nutrition*. 2012;108:S282–7.
124. Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *Br J Nutr*. 1994;71:29.
125. Chung YC, Kim YS, Shadchehr A, Garrido A, Macgregor IL, Sleisenger MH. Protein Digestion and Absorption in Human Small Intestine. *Gastroenterology*. 1979;76:1415–21.
126. Mahé S, Huneau J-F, Marteau P, Thuillier F, Tomé D. Gastroileal nitrogen and electrolyte movements after bovine milk ingestion in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1992;56:410–6.
127. Moughan PJ, Butts CA, van Wijk H, Rowan AM, Reynolds GW. An Acute Ileal Amino Acid Digestibility Assay Is a Valid Procedure for Use in Human Ileostomates. *The Journal of Nutrition*. 2005;135:404–9.
128. Harb WJ. Crohn's Disease of the Colon, Rectum, and Anus. *Surgical Clinics of North America*. 2015;95:1195–210.
129. Gibson JA, Sladen GE, Dawson AM. Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *Br J Nutr*. 1976;35:61–5.
130. Köhler T, Mosenthin R, Verstegen MW, Huisman J, den Hartog LA, Ahrens F. Effect of ileo-rectal anastomosis and post-valve T-caecum cannulation on growing pigs. 1. Growth performance, N-balance and intestinal adaptation. *Br J Nutr*. 1992;68:293–303.

131. Metges CC, Petzke KJ, El-Khoury AE, Henneman L, Grant I, Bedri S, Regan MM, Fuller MF, Young VR. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1999;70:1046–58.
132. Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. *British Journal of Nutrition*. 2012;108:S238–46.
133. Miller ER, Ullrey DE. The Pig as a Model for Human Nutrition. *Ann Rev Nutr*. 1987;7:361–82.
134. Deglaire A, Moughan PJ. Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. *Br J Nutr*. 2012;108:S273–81.
135. Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract. *Microbes and environments*. 2017;32:300–13.
136. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2001;39:20.
137. Deglaire A, Bos C, Tomé D, Moughan PJ. Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *Br J Nutr*. 2009;102:1752.
138. Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Daré S, Tomé D, Metges CC. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology*. 2002;123:50–9.
139. Rutherford SM, Moughan PJ. The rat as a model animal for the growing pig in determining ileal amino acid digestibility in soya and milk proteins. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2003;87:292–300.
140. 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;54:1508–17.
141. Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, Blachier F, Tomé D, Bos C. Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2011;8:52.
142. Gilani GS, Cockell KA, Sepehr E. Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods. *J AOAC Int*. 2005;88:967–87.
143. Oberli M, Lan A, Khodorova N, Santé-Lhoutellier V, Walker F, Piedcoq J, Davila A-M, Blachier F, Tomé D, Fromentin G, et al. Compared with Raw Bovine Meat, Boiling but Not Grilling, Barbecuing, or Roasting Decreases Protein Digestibility without Any Major

- Consequences for Intestinal Mucosa in Rats, although the Daily Ingestion of Bovine Meat Induces Histologic Modifications in the Colon. *J Nutr.* 2016;146:1506–13.
144. Santé-Lhoutellier V, Astruc T, Marinova P, Greve E, Gatellier P. Effect of Meat Cooking on Physicochemical State and in Vitro Digestibility of Myofibrillar Proteins. *J Agric Food Chem.* 2008;56:1488–94.
 145. Bax M-L, Buffière C, Hafnaoui N, Gaudichon C, Savary-Auzeloux I, Dardevet D, Santé-Lhoutellier V, Rémond D. Effects of Meat Cooking, and of Ingested Amount, on Protein Digestion Speed and Entry of Residual Proteins into the Colon: A Study in Minipigs. *PLoS ONE.* 2013;8:e61252.
 146. Hodgkinson SM, Montoya CA, Scholten PT, Rutherford SM, Moughan PJ. Cooking Conditions Affect the True Ileal Digestible Amino Acid Content and Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) of Bovine Meat as Determined in Pigs. *The Journal of Nutrition.* 2018;148:1564–9.
 147. Gilani GS, Sepehr E. Protein Digestibility and Quality in Products Containing Antinutritional Factors Are Adversely Affected by Old Age in Rats. *The Journal of Nutrition.* 2003;133:220–5.
 148. Anderson RL, Wolf WJ. Compositional Changes in Trypsin Inhibitors, Phytic Acid, Saponins and Isoflavones Related to Soybean Processing. *J Nutr.* 1995;125:581s-588S.
 149. Giami SY. Chemical composition and nutritional attributes of selected newly developed lines of soybean (*Glycine max* (L) Merr). *J Sci Food Agric.* 2002;82:1735–9.
 150. Peace RW, Sarwar G, Touchburn SP, Botting HG. Effects of soybean trypsin inhibitors and dl-ethionine on growth and serum parameters in young rats. *Nutrition Research.* 1991;11:1197–208.
 151. Schlemmer U, Frølich W, Prieto RM, Grases F. Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:S330–75.
 152. Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, Bryden WL. Influence of Microbial Phytase on Apparent Ileal Amino Acid Digestibility of Feedstuffs for Broilers. *Poultry Science.* 1999;78:699–706.
 153. Selle PH, Ravindran V, Caldwell A, Bryden WL. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutr Res Rev.* 2000;13:255–78.
 154. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr.* 2000;130:2073S-2085S.
 155. Ovaskainen M-L, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary Intake and Major Food Sources of Polyphenols in Finnish Adults. *J Nutr.* 2008;138:562–6.

156. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010;2:1231–46.
157. Cirkovic Velickovic TD, Stanic-Vucinic DJ. The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties: Phenolic compounds in protein digestion.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2018;17:82–103.
158. Jansman AJM, Frohlich AA, Marquardt RR. Production of Proline-Rich Proteins by the Parotid Glands of Rats Is Enhanced by Feeding Diets Containing Tannins from Faba Beans (*Vicia faba* L.). *J Nutr*. 1994;124:249–58.
159. Ma N, Tian Y, Wu Y, Ma X. Contributions of the Interaction Between Dietary Protein and Gut Microbiota to Intestinal Health. *CPPS*. 2017;18. Available from: <http://www.eurekaselect.com/150179/article>
160. Darragh AJ, Hodgkinson SM. Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. *J Nutr*. 2000;130:1850S-1856S.
161. Libao-Mercado AJ, Yin Y, van Eys J, de Lange CFM. True ileal amino acid digestibility and endogenous ileal amino acid losses in growing pigs fed wheat shorts- or casein-based diets. *J Anim Sci*. 2006;84:1351–61.
162. Berrocoso JD, Rojas OJ, Liu Y, Shoulders J, González-Vega JC, Stein HH. Energy concentration and amino acid digestibility in high-protein canola meal, conventional canola meal, and soybean meal fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*. 2015;93:2208–17.
163. Gausserès N, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Ferriere F, Rautureau J, Tomé D. [¹⁵N]-Labeled Pea Flour Protein Nitrogen Exhibits Good Ileal Digestibility and Postprandial Retention in Humans. *The Journal of Nutrition*. 1997;127:1160–5.
164. Evenepoel P, Geypens B, Luybaerts A, Hiele M, Ghoo Y, Rutgeerts P. Digestibility of Cooked and Raw Egg Protein in Humans as Assessed by Stable Isotope Techniques. *J Nutr*. 1998;128:1716–22.
165. Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN. Endogenous amino acid flow at the terminal ileum of adult humans determined following the ingestion of a single protein-free meal. *J Sci Food Agric*. 1993;61:439–42.
166. Fuller MF, Milne A, Harris CI, Reid TM, Keenan R. Amino acid losses in ileostomy fluid on a protein-free diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1994;59:70–3.
167. Moughan PJ, Butts CA, Rowan AM, Deglaire A. Dietary peptides increase endogenous amino acid losses from the gut in adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;81:1359–65.
168. Cotten B, Ragland D, Thomson JE, Adeola O. Amino acid digestibility of plant protein feed ingredients for growing pigs. *J Anim Sci*. 2016;94:1073–82.

169. Low AG. Nutrient absorption in pigs. *J Sci Food Agric*. 1980;31:1087–130.
170. Moughan PJ, Souffrant WB, Hodgkinson SM. Physiological approaches to determining gut endogenous amino acid flows in the mammal. *Arch Tierernahr*. 1998;51:237–52.
171. Moughan PJ, Rutherfurd SM. Gut luminal endogenous protein: Implications for the determination of ileal amino acid digestibility in humans. *Br J Nutr*. 2012;108:S258–63.
172. Rutherfurd SM, Cui J, Goroncy AK, Moughan PJ. Dietary Protein Structure Affects Endogenous Ileal Amino Acids But Not True Ileal Amino Acid Digestibility in Growing Male Rats. *J Nutr*. 2015;145:193–8.
173. Gaudichon C, Laurent C, Mahé S, Marks L, Tomé D, Krempf M. Rate of [¹⁵N]leucine incorporation and determination of nitrogenous fractions from gastro-jejunal secretion in fasting humans. *Reprod Nutr Dev*. 1994;34:349–59.
174. Gaudichon C, Mahé S, Luengo C, Laurent C, Meaugeais P, Krempf M, Tomé D. A ¹⁵N-leucine-dilution method to measure endogenous contribution to luminal nitrogen in the human upper jejunum. *Eur J Clin Nutr*. 1996;50:261–8.
175. Hess V, Thibault J-N, Sève B. The ¹⁵N Amino Acid Dilution Method Allows the Determination of the Real Digestibility and of the Ileal Endogenous Losses of the Respective Amino Acid in Pigs. *J Nutr*. 1998;128:1969–77.
176. Hess V, Ganier P, Thibault J-N, Sève B. Comparison of the isotope dilution method for determination of the ileal endogenous amino acid losses with labelled diet and labelled pigs. *Br J Nutr*. 2000;83:123–30.
177. de Lange CFM, Souffrant WB, Sauer WC. Real ileal protein and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs as determined with the ¹⁵N-isotope dilution technique. *Journal of Animal Science*. 1990;68:409–18.
178. Yin J, Ren W, Hou Y, Wu M, Xiao H, Duan J, Zhao Y, Li T, Yin Y, Wu G, et al. Use of homoarginine for measuring true ileal digestibility of amino acids in food protein. *Amino Acids*. 2015;47:1795–803.
179. Nyachoti CM, McNeilage-Van de Wiele EM, de Lange CFM, Gabert VM. Evaluation of the homoarginine technique for measuring true ileal amino acid digestibilities in pigs fed a barley-canola meal-based diet. *J Anim Sci*. 2002;80:440–8.
180. Bos C, Metges CC, Gaudichon C, Petzke KJ, Pueyo ME, Morens C, Everwand J, Benamouzig R, Tomé D. Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans. *The Journal of Nutrition*. 2003;133:1308–15.
181. Wegner MI, Booth AN, Bohstedt G, Hart EB. The "*In Vitro*" Conversion of Inorganic Nitrogen to Protein by Microorganisms from the Cow's Rumen. *Journal of Dairy Science*. 1940;23:1123–9.

182. Mahé S, Fauquant J, Gaudichon C, Roos N, Maubois J-L, Tome D. ¹⁵N-Labeling and preparation of milk, casein and whey proteins. *Lait*. 1994;74:307–12.
183. Fromentin C, Sanders P, Nau F, Anton M, Fromentin G, Tomé D, Thibault J-N, Gaudichon C. A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with ¹⁵N and ¹³C. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2012;26:43–8.
184. Bos C, Mahé S, Gaudichon C, Benamouzig R, Gausserès N, Luengo C, Ferrière F, Rautureau J, Tomé D. Assessment of net postprandial protein utilization of ¹⁵N-labelled milk nitrogen in human subjects. *Br J Nutr*. 1999;81:221–6.
185. Devi S, Varkey A, Sheshshayee MS, Preston T, Kurpad AV. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2018;107:984–91.
186. Boirie Y, Fauquant J, Rulquin H, Maubois J-L, Beaufrère B. Production of Large Amounts of [¹³C]Leucine-Enriched Milk Proteins by Lactating Cows. *J Nutr*. 1995;125:92–8.
187. van Loon LJC, Boirie Y, Gijzen AP, Fauquant J, de Roos AL, Kies AK, Lemosquet S, Saris WHM, Koopman R. The production of intrinsically labeled milk protein provides a functional tool for human nutrition research. *Journal of Dairy Science*. 2009;92:4812–22.
188. Engelen MPKJ, Com G, Anderson PJ, Deutz NEP. New stable isotope method to measure protein digestibility and response to pancreatic enzyme intake in cystic fibrosis. *Clinical Nutrition*. 2014;33:1024–32.
189. Devi S, Varkey A, Dharmar M, Holt RR, Allen LH, Sheshshayee MS, Preston T, Keen CL, Kurpad AV. Amino Acid Digestibility of Extruded Chickpea and Yellow Pea Protein is High and Comparable in Moderately Stunted South Indian Children with Use of a Dual Stable Isotope Tracer Method. *J Nutr*. 2020;nxaa004.
190. Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, Duraisamy R, Thomas T, Preston T, Devi S, Kurpad AV. Ileal digestibility of intrinsically labeled hen's egg and meat protein determined with the dual stable isotope tracer method in Indian adults. *Am J Clin Nutr*. 2018;108:980–7.
191. Kashyap S, Varkey A, Shivakumar N, Devi S, Reddy B H R, Thomas T, Preston T, Sreeman S, Kurpad AV. True ileal digestibility of legumes determined by dual-isotope tracer method in Indian adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2019;110:873–82.
192. Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, Preston T, Devi S, Kurpad AV. Co-ingestion of Black Tea Reduces the Indispensable Amino Acid Digestibility of Hens' Egg in Indian Adults. *The Journal of Nutrition*. 2019;149:1363–8.
193. Shivakumar N, Kashyap S, Kishore S, Thomas T, Varkey A, Devi S, Preston T, Jahoor F, Sheshshayee M, Kurpad AV. Protein-quality evaluation of complementary foods in Indian children. *Am J Clin Nutr*. 2019;109:1319–27.
194. Martin-Monjaret C. Les stades repères du tournesol [Internet]. Terres Inovia. 2019. Available from: <https://www.terresinovia.fr/-/les-stades-reperes-du-tournesol>

195. Vdovíaková K, Petrovová E, Maloveská M, Krešáková L, Teleky J, Elias MZJ, Petrášová D. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterology Research and Practice*. 2016;2016:1–11.
196. 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. *Br J Nutr*. 1996;76:75–85.
197. Russell RW, Mc Gilliard AD, Berger PJ, Young JW. Evaluation of Turbidimetric Determination of Polyethylene Glycol. *Journal of Dairy Science*. 1982;65:1798–803.
198. Hušek P. Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBS Letters*. 1991;280:354–6.
199. Rutherford SM, Gilani GS. Amino Acid Analysis. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT, editors. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009. p. 11.9.1-11.9.37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps1109s58>
200. Waters Corporation. UPLC Amino Acid Analysis Solution [Internet]. 2007. Available from: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/71500129702rb.pdf>
201. Tessier R, Khodorova N, Calvez J, Kapel R, Quinsac A, Piedcoq J, Tomé D, Gaudichon C. ¹⁵N and ²H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *J Nutr*. 2020;150:450–7.
202. Oberli M, Douard V, Beaumont M, Jaoui D, Devime F, Laurent S, Chaumontet C, Mat D, Le Feunteun S, Michon C, et al. Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res*. 2018;62:1700570.
203. Aljhdali N, Carbonero F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59:474–87.
204. Shahkhalili Y, Finot PA, Hurrell R, Fern E. Effects of Foods Rich in Polyphenols on Nitrogen Excretion in Rats. *J Nutr. Oxford Academic*; 1990;120:346–52.
205. Jansman AJ, Verstegen MW, Huisman J, van den Berg JW. Effects of hulls of faba beans (*Vicia faba L.*) with a low or high content of condensed tannins on the apparent ileal and fecal digestibility of nutrients and the excretion of endogenous protein in ileal digesta and feces of pigs. *Journal of Animal Science*. 1995;73:118.
206. Wang Y, Wang J, Wang S, Guo J, Wang S. Modification of Glutenin and Associated Changes in Digestibility Due to Methylglyoxal during Heat Processing. *J Agric Food Chem*. 2019;67:10734–43.

207. Wen W, Li S, Gu Y, Wang S, Wang J. Effects of Starch on the Digestibility of Gluten under Different Thermal Processing Conditions. *J Agric Food Chem*. 2019;67:7120–7.
208. Rutherford SM, Dunn BM. Quantitative Amino Acid Analysis. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT, editors. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p. 3.2.1-3.2.6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps0302s63>
209. Maubois J-L, Lorient D. Dairy proteins and soy proteins in infant foods nitrogen-to-protein conversion factors. *Dairy Sci & Technol*. 2016;96:15–25.
210. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O, Beaufrère B. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2001;280:E340–8.
211. Lacroix M, Bos C, Léonil J, Airinei G, Luengo C, Daré S, Benamouzig R, Fouillet H, Fauquant J, Tomé D, et al. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:1070–9.
212. Brunsgaard G, Knudsen KEB, Eggum BO. The influence of the period of adaptation on the digestibility of diets containing different types of indigestible polysaccharides in rats. *Br J Nutr*. 1995;74:833–48.
213. Holwerda AM, Lenaerts K, Bierau J, Wodzig WKWH, van Loon LJC. Food ingestion in an upright sitting position increases post-prandial amino acid availability when compared to food ingestion in a lying down position. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42:738–43.
214. Kose A, Ozen MO, Elibol M, Oncel SS. Investigation of in vitro digestibility of dietary microalga *Chlorella vulgaris* and cyanobacterium *Spirulina platensis* as a nutritional supplement. *3 Biotech*. 2017;7:170.
215. Tavernari FDC, Roza LF, Surek D, Sordi C, Silva MLBD, Albino LFT, Migliorini MJ, Paiano D, Boiago MM. Apparent metabolisable energy and amino acid digestibility of microalgae *Spirulina platensis* as an ingredient in broiler chicken diets. *British Poultry Science*. 2018;59:562–7.
216. Janczyk P, Franke H, Souffrant WB. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*. Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology*. 2007;132:163–9.
217. Safi C, Charton M, Pignolet O, Silvestre F, Vaca-Garcia C, Pontalier P-Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J Appl Phycol*. 2013;25:523–9.
218. Teuling E, Wierenga PA, Schrama JW, Gruppen H. Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *J Agric Food Chem*. 2017;65:7989–8002.

219. Karmen A, Wróblewski F, LaDue JS. Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest.* 1955;34:126–33.
220. Bhagavan NV, Ha C-E. Chapter 15 Protein and Amino Acid Metabolism. *Essentials of Medical Biochemistry.* Elsevier; 2015. p. 227–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124166875000154>
221. Watts JH, Booker LK, McAfee JW, Graham DCW, Jones F. Biological Availability of Essential Amino Acids to Human SubjectsII. Whole Egg, Milk and Cottage Cheese. *J Nutr.* Oxford Academic; 1959;67:497–508.
222. Silvester KR, Cummings JH. Does digestibility of meat protein help explain large bowel cancer risk? *Nutr Cancer.* 1995;24:279–88.
223. Tessier R, Ribeiro-Parenti L, Bruneau O, Khodorova N, Cavin J-B, Bado A, Azzout-Marniche D, Calvez J, Le Gall M, Gaudichon C. Effect of different bariatric surgeries on dietary protein bioavailability in rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.* 2019;317:G592–601.

Annexe

Effet de différentes chirurgies bariatriques sur la biodisponibilité des protéines alimentaires chez le rat.

Article portant sur mes travaux de master 2 publié dans « American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology », le 16 octobre 2019. (223).

Résumé

Introduction et objectif :

La chirurgie bariatrique est un des traitements les plus efficaces de l'obésité morbide. Elle provoque une perte de poids importante et durable et améliore les co-morbidités associées (hypertension, diabète, syndrome métabolique). Il existe plusieurs types de chirurgies, les chirurgies restrictives comme la gastrectomie longitudinale (« vertical sleeve gastrectomy », VSG) qui reposent sur une réduction de la taille de l'estomac et les chirurgies restrictives et malabsorptives comme le court-circuit gastrique de Roux-en-Y (« Roux-en-Y gastric bypass », RYGB) qui associent une réduction de l'estomac et des dérivations de l'intestin grêle. Mais les chirurgies malabsorptives peuvent induire une malabsorption protéique même s'il existe peu de données. Si la malabsorption contribue à la perte de poids, elle peut aussi mener à des conséquences létales. Cette étude vise à évaluer la biodisponibilité des protéines alimentaires après différentes chirurgies bariatriques dans un modèle de rat.

Matériel et méthodes :

Des rats rendus obèses par consommation d'un régime riche en lipides ont été opérés d'une VSG ou d'un RYGB. Le groupe contrôle était composé de rats obèses qui avaient subi une chirurgie placebo (Sham). Les rats Sham recevaient une quantité de nourriture correspondant à la consommation des rats opérés (pair-feeding). Deux semaines après les opérations, après une période d'adaptation, les rats recevaient un repas contenant des protéines de lait intrinsèquement marquées au ^{15}N . La prise alimentaire et la perte de poids étaient mesurées quotidiennement. L'azote 15 dans les contenus digestifs et dans les organes était mesuré 6h après l'ingestion du repas, pour déterminer la biodisponibilité des protéines alimentaires. Le taux de synthèse protéique fractionnelle (FSR) dans plusieurs organes était déterminé par injection d'une dose de valine marquée au carbone 13 une demi-heure avant l'euthanasie.

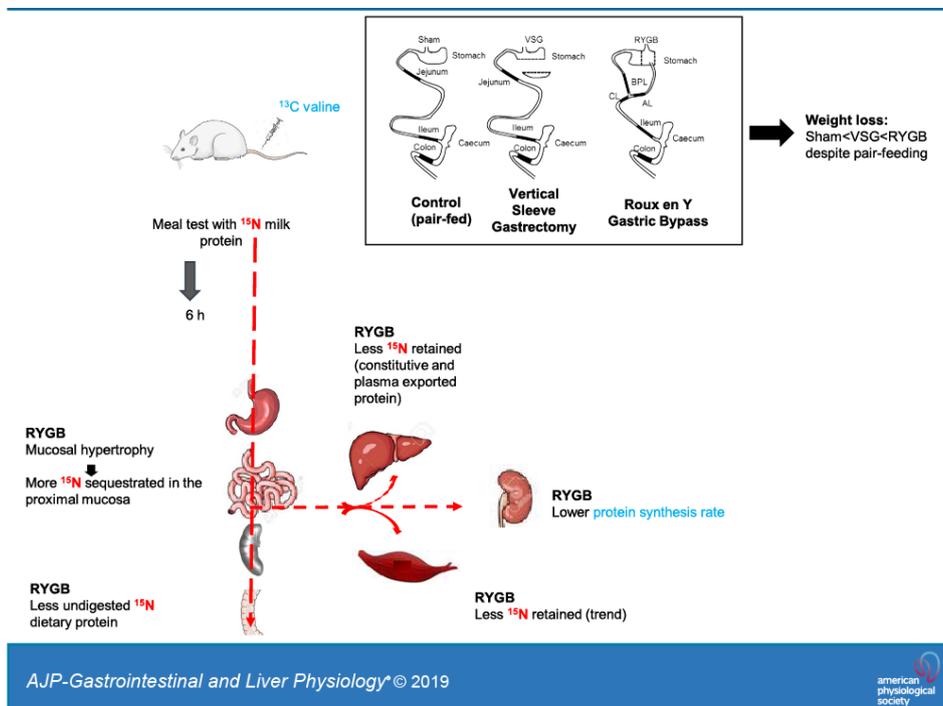
Résultats :

Les rats RYGB et VSG perdaient plus de poids que les Sham mais la perte de poids était plus importante chez les RYGB. De façon surprenante, la digestibilité fécale des protéines était plus élevée ($P = 0,045$) dans le groupe RYGB que dans le groupe Sham ($93,5 \pm 0,5\%$) et VSG ($93,8 \pm 0,6\%$). L'azote ^{15}N retenu dans le foie ($P = 0,001$) et les protéines plasmatiques ($P = 0,037$) était plus faible dans le groupe Sham et la tendance était la même dans le muscle ($P = 0,052$). La synthèse protéique était peu affectée par la chirurgie bariatrique, excepté dans le rein, où elle était diminuée chez les rats RYGB ($P = 0,02$). La distribution de ^{15}N le long de l'intestin grêle suggère que l'azote alimentaire était retenu dans la muqueuse remodelée des RYGB comparé aux Sham. La muqueuse de l'intestin grêle est hypertrophiée chez les rats RYGB. Ce remodelage est associé à une augmentation de l'azote ^{15}N retenue dans les tissus intestinaux de l'anse alimentaire et l'anse contournée.

Conclusion :

Cette étude révèle que contrairement à la gastrectomie verticale, le court-circuit gastrique en Roux-en-Y augmente légèrement la digestibilité protéique mais altère la biodisponibilité des protéines au niveau périphérique. Cet effet peut être dû à une plus grande absorption d'acides aminés alimentaires par l'intestin fin d'aider à son remodelage et à son fonctionnement.

Graphical Abstract



Effect of different bariatric surgeries on dietary protein bioavailability in rats

Romain Tessier^{1,2}, Lara Ribeiro-Parenti^{2,3}, Ouafa Bruneau^{1,2}, Nadezda Khodorova¹, Jean-Baptiste Cavin², André Bado², Dalila Azzout-Marniche¹, Juliane Calvez¹, Maude Le Gall^{2*}, Claire Gaudichon^{1*}

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

² Inserm UMRS 1149, UFR de Médecine Paris Diderot, Université de Paris, AP-HP, 75018 Paris, France

³ Department of General and Digestive Surgery, Bichat Hospital, AP-HP, 75018 Paris, France.

*These authors contributed equally to this manuscript.

Address all correspondence and reprint requests to:

Claire Gaudichon, Ph.D.

Mailing address: INRA-AgroParisTech UMR914 PNCA, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Email: claire.gaudichon@agroparistech.fr

Phone: +33 1 44 08 18 29

Fax: +33 1 44 08 18 56

Running Title: Bariatric surgery and protein bioavailability

Keywords: Gastric Bypass; Sleeve gastrectomy; Protein digestibility; Protein retention; ¹⁵N test meal

Abbreviations: ASR: absolute synthesis rate; BPL, bilio-pancreatic limb; FSR, fractional synthesis rate; GC, gas chromatography; HFD, high fat diet; IRMS, isotopic ratio mass spectrometry; MS, mass spectrometry; NAFLD, non-alcoholic fat liver disease; RFD, real fecal digestibility; RYGB, Roux-en-Y gastric bypass ; VSG, vertical sleeve gastrectomy;

1 **Abstract**

2 Bariatric surgery may induce protein malabsorption, although data are scarce. This study aims
3 at evaluating dietary protein bioavailability after different bariatric surgeries in rats.

4 Diet-induced, obese Wistar rats were operated for vertical sleeve gastrectomy (VSG), Roux-
5 en-Y gastric bypass (RYGB). The control group was composed of pair-fed, sham-operated rats
6 (Sham). Two weeks after surgery, rats were fed a ^{15}N protein meal. Protein bioavailability was
7 assessed by determination of ^{15}N recovery in the gastrointestinal tract and organs 6 h after the
8 meal. Fractional protein synthesis rate (FSR) was assessed using a flooding dose of ^{13}C valine.

9 Weight loss was the highest in RYGB and the lowest in Sham. Surprisingly, RYGB ($95.6 \pm$
10 0.7%) improved protein digestibility ($P=0.045$) compared to Sham ($93.5 \pm 0.5\%$) and VSG (93.8
11 $\pm 0.6\%$). In contrast, ^{15}N retained in the liver ($P=0.001$) and plasma protein ($P=0.037$) was
12 lower than in Sham, with a similar trend in muscle ($P=0.052$). FSR was little altered by bariatric
13 surgery except for a decrease in the kidney of RYGB ($P = 0.02$). The ^{15}N distribution along the
14 small intestinal tissue suggests that dietary nitrogen was considerably retained in the
15 remodeled mucosa of RYGB compared to Sham.

16 This study revealed that in contrast to VSG, RYGB slightly improved protein digestibility but
17 altered peripheral protein bioavailability. This effect may be ascribed to a higher uptake of
18 dietary amino acids by the remodeled intestine.

19 **New and Notheworthy**

20 Using a sensitive ^{15}N meal test, we found that gastric bypass slightly improved protein
21 digestibility compared to sleeve gastrectomy or control but in contrast, lowered protein
22 retention in the liver and muscles. This paradox can be due to a higher uptake of dietary
23 nitrogen by the intestinal mucosa that was hypertrophied. This study provides new insight on
24 the digestive and metabolic fate of dietary protein in different models of bariatric surgery in
25 rats.

26 **Introduction**

27 Bariatric surgery is one of the most efficient treatments of morbid obesity, inducing sustainable
28 weight loss (11, 28, 47) and improvement of associated comorbidities (19). Historically,
29 literature distinguished two kinds of bariatric surgeries: purely restrictive versus restrictive and
30 malabsorptive. Food intake restriction was supposed to be induced by a reduction of stomach
31 size, whereas malabsorption may result from the derivation of the proximal small intestine from
32 the alimentary tract, therefore theoretically reducing nutrient absorption. The purely restrictive
33 vertical sleeve gastrectomy (VSG) and the restrictive and malabsorptive Roux-en-Y gastric
34 bypass (RYGB) are the most performed bariatric surgeries worldwide (4). VSG and RYGB
35 procedures limit the gastric volume and thereby reduce food intake during a single meal but
36 this mechanical restriction cannot fully explain the reported reduction of energy intake as
37 subjects could compensate by calorie dense food or multiple meals. The stomach is also a
38 main source of hormones and peptides such as the orexigenic hormone, ghrelin. The latter
39 has reported to be reduced after VSG (3, 35) which can contribute to the anorexigenic effects
40 of this procedure. RYGB has also been associated with reduced ghrelin (20) but this remains
41 disputed (7). Moreover, RYGB was associated with increases in glucagon-like peptide-1 (GLP-
42 1) and peptide YY (PYY 3–36) that contribute to reduction of food intake (50). Additionally, as
43 the stomach secretes hydrochloric acid and pepsinogen that are implicated in the early steps
44 of protein digestion, VSG and RYGB could also lead to a protein maldigestion.

45 RYGB has been shown to induce nutrient malabsorption (33, 48) associated with the length of
46 the bypassed limb. Whereas carbohydrate and lipid malabsorption may contribute to the
47 positive effects of bariatric surgery, protein malabsorption (6, 25) can be the cause of a large
48 range of clinical consequences, from severe undernutrition leading to parenteral nutrition to
49 death (30). Low albumin levels and excessive weight loss are signs of protein wasting after
50 bariatric surgery (26). It has been shown that severe protein malnutrition occurred in 4.7% of
51 patients who underwent RYGB surgery (25).

52 The degree of protein malabsorption after bariatric surgery has not been well established.
53 Using intrinsically ¹³C labeled casein, Bosjen-Møller et al. (9) showed accelerated blood
54 appearance of dietary amino acids in patients operated for RYGB. In the absence of any
55 digesta collection, it is not known whether this paradoxical effect is only due to a faster
56 digestion kinetic or also to a higher protein bioavailability. In contrast, other studies reported a
57 higher fecal output of nitrogen in rats after RYGB and biliopancreatic diversion (14, 42) and in
58 humans after RYGB (48). Overall, none of these studies determined the real digestibility of
59 dietary proteins and their postprandial retention in organs.

60 This study aimed to characterize digestive and metabolic protein bioavailability by using a test
61 meal containing ¹⁵N labeled proteins. For this purpose, VSG and RYGB rats were compared
62 with pair-fed Sham rats for weight loss, energy intake, body composition, protein real
63 digestibility, dietary protein retention in tissues and protein synthesis rate.

64

65 **Materials and Methods**

66 **Animal and diets**

67 All animal studies comply with the ARRIVE guidelines. They were conducted in compliance
68 with EU directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the Institutional Animal
69 Care and Use Committee (Comité d'éthique en expérimentation animale N° 121) and the
70 Ministry of Higher Education and Research (Ref #02285.03). Male Wistar rats (Janvier Labs,
71 Le Genest-St-Isle, France) (n = 42) weighing 275-280 g were housed in standard
72 environmental conditions (temperature 21-22 °C, 12/12 h light/dark cycle, tap water and food
73 *ad libitum*). Before surgery, they were fed a high fat diet (HFD) (Altromin, Genestil, Royancourt,
74 France) for 4 months. The composition is detailed in Supplemental Table 1
75 (https://figshare.com/articles/Bariatric_surgery/8964152). The experimental design of the study is
76 detailed in Supplemental Fig. 1 (https://figshare.com/articles/Bariatric_surgery/8964152).

77 **Surgical Procedures**

78 After 4 months of HFD, animals were randomly divided into 3 groups: Roux-en-Y gastric
79 bypass (RYGB, n = 18), vertical sleeve gastrectomy (VSG, n = 7) and sham-operated (Sham,
80 n = 16). Initially, two different Sham procedures were performed to match with sleeve and
81 gastric bypasses but rats were then pooled together without any differences in principal criteria.
82 The rats were fasted the night before surgery. Anesthesia was induced and maintained by
83 gaseous inhalation of isoflurane (Vetflurane, Virbac, France). Procedures were carried out as
84 previously described (5, 13, 14, 24, 52). After laparotomy, the stomach was isolated outside of
85 the abdominal cavity. Gastric connections to the spleen and liver were severed along the
86 greater curvature, and the suspensory ligament supporting the upper fundus was dissociated.
87 The surgical procedures are depicted in Fig. 1.

88 **VSG**

89 The non-glandular part of the stomach was removed by application of an ETS-Flex 35 mm
90 staple line (Ethicon, Issy les Moulineaux, France). Then, the procedure was to resect 80% of
91 gastric fundus stomach by application of a second ETS-Flex 35 mm staple line, leaving a thin
92 gastric tube in continuity with the esophagus.

93 **RYGB**

94 The non-glandular part of the stomach (forestomach) was resected using an ETS-Flex 35 mm
95 staple line (Ethicon, Issy les Moulineaux, France). A second staple line (Proximate TX30V 30
96 mm, Ethicon, Issy les Moulineaux, France), parallel to the first one, was applied to delimit a
97 gastric pouch that represented 20% of the initial stomach size while preserving the arterial and
98 venous supply. The jejunum was transected 20 cm after the pylorus. The alimentary limb was
99 anastomosed to the gastric pouch and the biliopancreatic limb was anastomosed 15 cm distally
100 to gastrojejunal anastomosis. Sutures were made by a 7-0 Prolene wire (Ethicon, Issy les
101 Moulineaux, France).

102 *Sham*

103 To simulate surgery the stomach was pinched with an unarmed staple gun, and for bypass
104 sham-operated rats the jejunum was incised and stitched immediately after.

105 All operations ended with 4-0 vicryl and 3-0 vicryl (Ethicon, Issy les Moulineaux, France)
106 sutures to sew up the abdominal wall and the skin, respectively.

107 **Post-surgery care**

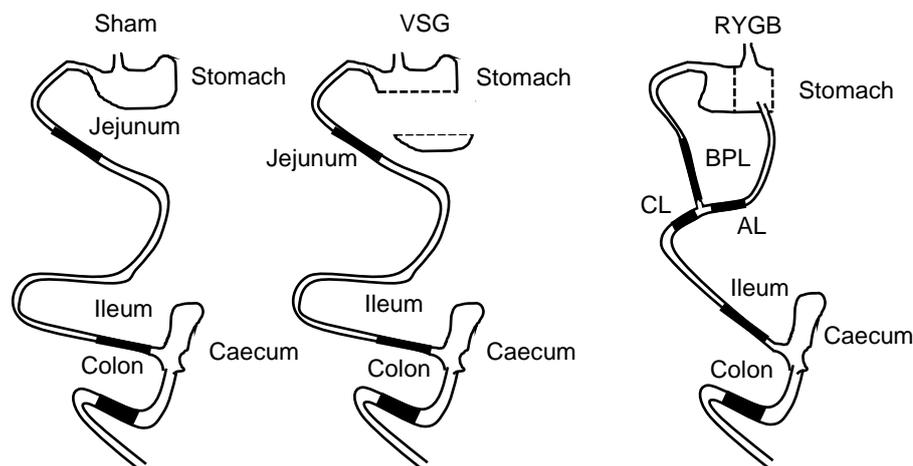
108 Animals received an analgesic (Xylocaine, Astra, 10 mg/kg) and an antibiotic (Penicillin,
109 20 000 units/kg, PanPharma, Boulogne Billancourt, France) after surgery. They were placed
110 in individual cages with a reversed light/dark cycle with lights on from 8.00 P.M. to 8.00 A.M.
111 For two days following the surgery, rats were injected subcutaneously with 12 ml/day of an
112 isotonic polyionic solution (Bionolyte G5, Baxter, Guyancourt, France). Between day 3 and day
113 10, they were refed a hydrated standard diet *ad libitum* (Supplemental Table 1). Sham animals
114 were pair-fed with operated animals.

115 **Habituation to consumption of a single test meal**

116 From day 11 to day 19, rats were accustomed to rapid consumption of a single meal in the
117 morning. For this purpose they received 4 g of standard diet between 8.30 A.M. and 9.00 A.M.,
118 followed by free access to the diet between noon and 6.30 P.M. Between those two periods
119 rats were fasted with free access to water. Sham rats were pair-fed with operated rats. On day
120 19, rats were fed a single test meal of the same composition as the standard diet, but in which
121 proteins were intrinsically labeled with ¹⁵N, as described previously (36). Thirty minutes before
122 being euthanized, rats were injected in the lateral tail vein with 150 µmol/100 g of body weight
123 of 1-¹³C-Valine (Eurisotop, Saint Aubin, France) under gaseous anesthesia. Six hours after the
124 meal, rats were injected intraperitoneally with a lethal dose of pentobarbital sodium (100
125 mg/kg) and exsanguinated. Whole blood was collected and plasma was isolated and stored at
126 -20°C after centrifugation. Different intestinal segments were identified depending on the
127 surgery procedure: stomach, jejunum, ileum, caecum, and colon. The feces emitted during the

128 postprandial period were pooled with colon content. For RYGB the biliopancreatic, alimentary
129 and common limbs were collected (Fig. 1). The ileum was defined as the 10 cm before the
130 caecum to recover sufficient amount of samples, although ileum might be shorter accordingly
131 to Vdoviaková et al. (58) . Segments were rinsed with NaCl solution (9‰), and the contents
132 were collected in their entirety, weighed and stored at -20°C. A sample of each intestinal wall
133 was collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Liver, kidney, extensor digitorum
134 longus muscle and skin were also sampled, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -
135 80°C.

136 **Figure 1:** Schematic representations of normal (Sham) and remodeled gastrointestinal tract
137 after VSG and RYGB procedures.



138 BPL: biliopancreatic limb, AL: alimentary limb CL: common limb.

139 **Measurement of food intake, body weight and whole body composition**

140 Body weight and food intake were assessed daily. Whole body composition was measured 7
141 days before surgery and 15 days after with an Echo Medical systems EchoMRI 900 (Whole
142 Body Composition Analyzers, Houston, USA). For technical reasons related to the device,
143 body composition was assessed before surgery in only 18 animals.

144 **Analytical methods**

145 Protein bioavailability was assessed by following the ¹⁵N recovery in digestive contents and
146 organs. Digestive contents were freeze-dried. Intestine, kidney, liver, muscle and skin were
147 cold-grinded with liquid nitrogen and freeze-dried. Plasma protein extraction was performed by
148 precipitation with 5-sulfosalicylic acid (100%).

149 Nitrogen percentage and ¹⁵N enrichment in digestive samples, organs and plasma proteins
150 were determined by an elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France)
151 coupled with isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) (Isoprime, GV Instrument, Manchester,
152 UK). Atropine (Thermo Electron, Milano, Italy) and L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich,
153 Saint-Louis, USA) were used as elemental and isotopic standards, respectively.

154 *In vivo* protein synthesis rate in liver, kidney, skin and muscle was assessed using the ¹³C-
155 valine flooding dose method, as described previously (18, 45). After protein precipitation of the
156 different tissues, amino acids and protein bound fractions were separated. Free amino acids
157 were derivatized with *N-tert*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide mixed with 1% *tert*-
158 butyldimethylchlorosilane and acetonitrile (Sigma Aldrich, St Louis, USA). ¹³C-valine
159 enrichment in free amino acids was analyzed by gas chromatography (GC 6890N, Agilent
160 Technologies, Les Ulis, France) coupled to mass spectrometry (MS 5973N, Agilent
161 Technologies, Les Ulis, France) (GC-MS) with electron impact ionization and selected ion
162 monitoring (ions *m/z* 288 and 289). After hydrolysis, protein bound amino acids were
163 derivatized with propanol and acetyl chloride (Sigma Aldrich, St Louis, USA). ¹³C-valine
164 enrichment in proteins was analyzed by GC-combustion-IRMS (Isoprime, GV Instrument,
165 Manchester, UK).

166 **Histology**

167 Intestinal segments were fixed overnight in formalin and embedded in paraffin. Three µm blank
168 slides were cut from each block to perform hematoxylin phloxine saffron (HPS) staining. Each
169 slide was scanned with an Aperio ScanScope® CS System (Leica Microsystems SAS,
170 Nanterre, France).

171 **Calculations**

172 The exogenous nitrogen (N_{exo}) in each tissue was determined as follows:

173
$$N_{\text{exo}} = N_{\text{tot}} \times \frac{APE_s}{APE_m}$$

174 where N_{exo} is exogenous nitrogen (mmol), N_{tot} is amount of nitrogen in the sample (mmol), and
175 $APE_{s/m}$ is enrichment excess in the sample (s) or the meal (m). ($APE_{s/m} = AP_{s/m} - \text{natural}$
176 enrichment). Natural enrichment values were determined in previous studies for digesta (26)
177 and tissues (49) in rats after adaptation to a milk protein diet.

178 Recovery of dietary nitrogen in plasma protein was related to the plasma volume in the rat
179 (3.5% of body weight)(63).

180

181 As amino acids and peptides are absorbed massively in the duodenum and jejunum, dietary
182 N losses were determined from the N recovery in the distal parts of the intestine (ileum and
183 large intestine, including feces). As digestion was almost complete after 6 h according to this
184 study and previous ones (36, 46), the losses due to residual N in the stomach and intestine
185 were considered as negligible. Accordingly, the real fecal protein digestibility (RFD, % of
186 nitrogen ingested) was calculated as follows:

187
$$\text{RFD} = \frac{N_{\text{ing}} - (N_{\text{exo ileum}} + N_{\text{exo caecum}} + N_{\text{exo fecal}})}{N_{\text{ing}}} \times 100$$

188 where N_{ing} is the amount of nitrogen ingested (mmol).

189 The fractional protein synthesis rate (FSR, in %/d) in each organ was calculated as follows:

$$190 \quad \text{FSR} = \frac{E_{\text{protein-bound valine}} - E_{\text{basal}}}{E_{\text{free valine}} \times t_{\text{inc}}} \times 24 \times 60 \times 100$$

191 where $E_{\text{free valine}}$ and $E_{\text{protein-bound valine}}$ are the ^{13}C valine enrichments in the free and protein-bound
192 amino acids, respectively. E_{basal} is the value of the non-enriched leucine in the same sample,
193 as a surrogate of basal valine enrichment (10). t_{inc} is the time of incorporation of ^{13}C -valine (in
194 min) between the injection and euthanasia (30 min in average). The factors 24 (h) and 60 (min)
195 were used to calculate the value in % per day (18).

196 The absolute synthesis rate (ASR, g/d) was calculated as:

$$197 \quad \text{ASR} = \text{FSR} \times P_{\text{content}}$$

198 where P_{content} is the protein content of the tissue ($P_{\text{content}} = \%N \times 6.25$).

199

200 **Statistical analysis**

201 All results are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). Follow-up data were
202 analyzed in a mixed model with group as a fixed factor and time as a repeated factor, using
203 SAS 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Otherwise, differences between groups were tested
204 using a one-way ANOVA with the group as a factor and post-hoc Bonferroni tests for pairwise
205 comparisons. Differences were considered statistically significant for a value of $P < 0.05$.

206 **Results**

207 **Follow up**

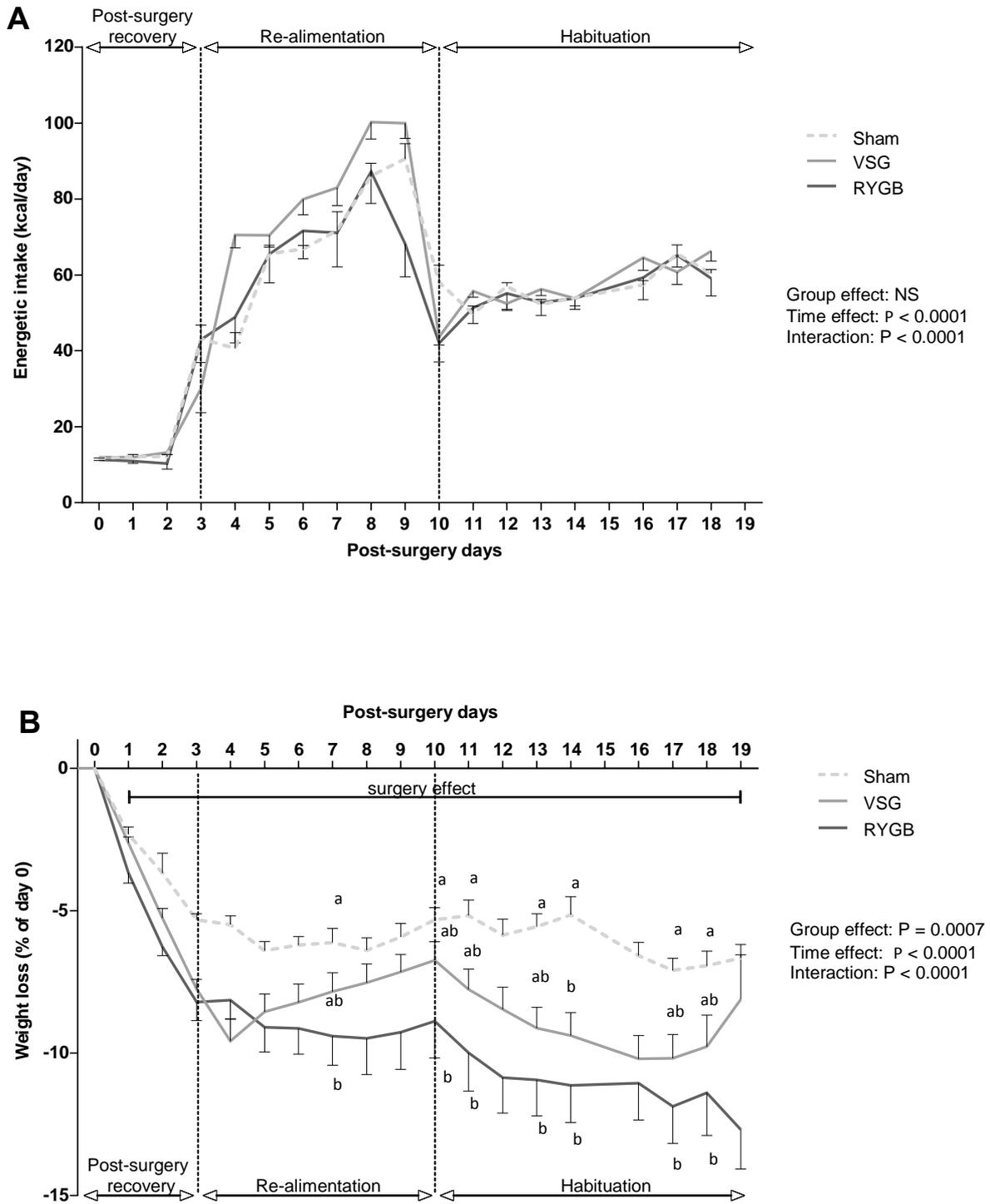
208 ***Survival rate***

209 Out of forty two rats, one died before surgery, without any explanation. For Sham, the survival
210 rate was 81.3% (13/16). Deaths occurred during anesthesia, sham surgery or the first hours
211 following surgery. The survival rate for RYGB was 50 % (9/18), due to the complexity of
212 surgical procedures in the context of the learning curve of a new surgeon. All deaths occurred
213 during the early post-surgery period. The survival rate of VSG rats was 100% (7/7).

214 ***Food intake, weight and body composition***

215 During the first two days, animals did not receive any solid food (Figure 2A), and they all lost
216 weight (Fig. 2B). When refeeding began on day 3, rats rapidly increased their energy intake.
217 After the beginning of refeeding, rats continued to lose weight for two days. Operated rats lost
218 between 7 and 9 % of their pre-operative weight. Sham tended to loose less weight than
219 operated animals during this period ($5.3 \pm 0.2\%$). From day 5, all groups stopped losing weight;
220 VSG regained weight whereas RYGB and pair-fed Sham did not. When habituation to
221 consumption of a single test meal in the morning started at day 10, energy intake dropped for
222 all groups. Subsequently, food consumption increased between day 11 and day 18, from 196.6
223 $\text{kJ} \pm 4.2 \text{ kJ/d}$ ($47.4 \pm 1.8 \text{ kcal/d}$) to $255.2 \pm 12.5 \text{ kJ/d}$ ($61.0 \pm 3.2 \text{ kcal/d}$). Whereas all operated
224 rats lost weight after the beginning of the protocol, Sham rats maintained their weight (about
225 1% loss in 9 days). The total mass loss was $44 \pm 3 \text{ g}$ in Sham, $64 \pm 5 \text{ g}$ in VSG and $73 \pm 8 \text{ g}$
226 in RYGB, with a significant effect of the group ($P = 0.002$), and a significant difference between
227 Sham and RYGB ($P = 0.002$) and a trend for a difference between Sham and VSG ($P=0.07$).
228 When pooled together, operated rats lost more weight than Sham rats ($P = 0.001$).

229 **Figure 2:** Energy intake (A) and weight loss (B) after bariatric surgery.



230 Refeeding begun 3 days after surgery. Habituation to a discontinuous food pattern begun at d10. Sham
 231 rats were pair-fed with operated rats. Values are means \pm SEM, $n = 13$ for Sham, $n = 7$ for VSG, $n = 9$
 232 for RYGB. Surgery and time effects were tested by a mixed model. Values with different letters at a
 233 given day are statistically different (post hoc Bonferroni's test).

234 The longitudinal follow up of body composition (Supplemental Table 2,
 235 https://figshare.com/articles/Bariatric_surgery/8964152) could be carried out in only some rats,
 236 leading to an insufficient number of observations. There was significantly ($P = 0.02$) more fat
 237 mass loss in RYGB (-48 ± 5 g) than in Sham rats (-27 ± 3 g). The fat mass loss observed in
 238 VSG (lost 43 ± 5 g) did not differ from the two other groups. The average lean mass loss
 239 was -27 ± 4 g, and we could not detect any differences between groups.

240 Dietary protein bioavailability

241 *Digestibility*

242 To assess dietary protein digestibility, dietary nitrogen in the lumen of the gastrointestinal tract
 243 was measured 6 h after ingestion of the test meal (Table 1). Most of the unabsorbed
 244 exogenous nitrogen was found in the caecum and the colon lumens. In the stomach, the small
 245 intestine, the ileum and the colon lumens there were no differences between groups. In the
 246 caecum, significantly less dietary nitrogen was recovered in RYGB rats than in VSG and Sham
 247 rats. Consequently, there was a significant effect of the group on RFD ($P = 0.045$), digestibility
 248 being higher in RYGB than in Sham ($P = 0.049$).

249 **Table 1:** Dietary nitrogen recovered in gastrointestinal tract contents (stomach, small intestine,
 250 ileum, caecum and colon) depending on the type of bariatric surgery.

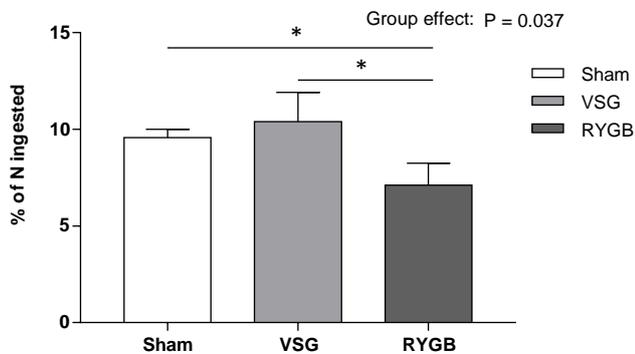
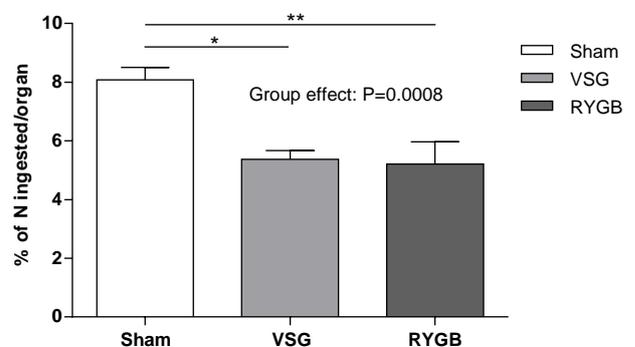
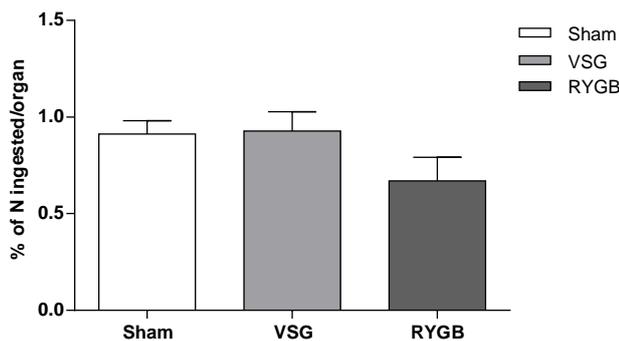
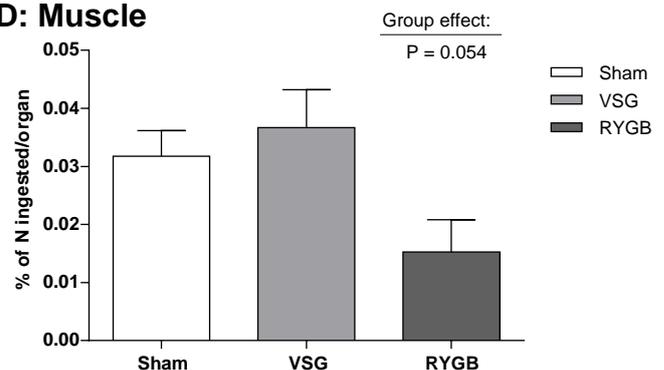
	Sham	VSG	RYGB	Group Effect
	% of N ingested			
Stomach	0.52 ± 0.11	0.10 ± 0.34	0.30 ± 0.15	0.066
Small intestine	0.69 ± 0.05	0.81 ± 0.21	0.65 ± 0.16	NS
Ileum	0.32 ± 0.07	0.69 ± 0.32	0.15 ± 0.05	0.078
Caecum	4.46 ± 0.33^a	4.45 ± 0.54^a	2.42 ± 0.43^b	0.002
Colon	1.76 ± 0.38	1.07 ± 0.21	1.85 ± 0.35	NS
RFD (%)	93.5 ± 0.5^a	93.8 ± 0.6^{ab}	95.6 ± 0.7^b	0.045

252 Values are means \pm SEM, $n = 13$ for Sham, $n = 7$ for VSG and $n = 9$ for RYGB. The effect of the group
 253 was tested with an ANOVA model and post hoc Bonferroni test for pairwise comparisons. Values with
 254 different letters within the same row are statistically different. RFD: real fecal digestibility.

Dietary nitrogen retention in tissues

256 To evaluate the metabolic bioavailability, we measured ^{15}N retention in the blood and different
 257 tissues (Fig. 3). There was an effect of the group ($P = 0.037$) on dietary nitrogen found in
 258 plasma protein (Figure 3A). It was similar in Sham ($9.6 \pm 0.4\%$ of N ingested) and VSG (10.4
 259 $\pm 1.5\%$ of N ingested) but was lower in RYGB ($6.7 \pm 1.2\%$).

260 **Figure 3:** Exogenous nitrogen recovered in plasma proteins (A), liver (B), kidney (C) and
 261 muscle (D) six hours after the meal, expressed in % nitrogen ingested for the whole organ.

A: Plasma proteins**B: Liver****C: Kidney****D: Muscle**

262 Values are means \pm SEM, $n = 12-13$ for Sham, $n = 5-7$ for VSG and $n = 8-9$ for RYGB. Surgery effect
 263 was tested in each organ by a one-way ANOVA and post hoc Bonferroni's test for multiple comparisons.
 264 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

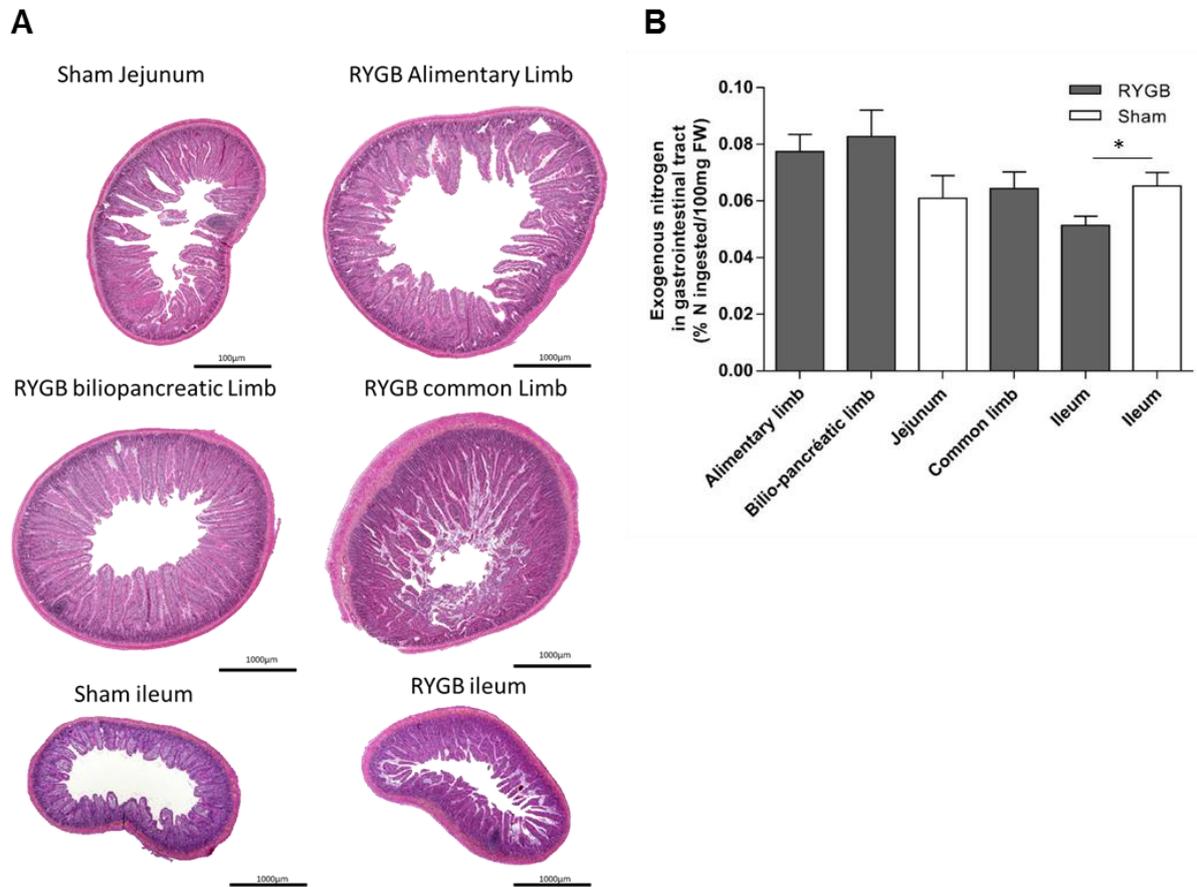
265 There was an effect of the group ($P = 0.017$) on liver weight, which was about 2 g higher in
 266 Sham than in the bariatric surgery groups (data not shown). As a consequence, the group
 267 influenced dietary nitrogen recovery in the liver ($P = 0.008$), with a lower value in the two
 268 operated groups than in Sham (Figure 3B). Independently of the liver weight, there was also

269 an effect of the group on dietary N retained per 100 mg of liver ($P=0.01$), that was $0.057 \pm$
270 0.002 % in Sham, 0.045 ± 0.009 % in VSG and 0.039 ± 0.006 % in RYGB, with a significant
271 difference between Sham and RYGB ($P=0.001$, data not shown).

272 Surgery had no effect on dietary nitrogen found in the kidney (Fig. 3C). In the muscle, there
273 was a trend for an effect of surgery ($P=0.054$), RYGB rats tending to have less exogenous
274 nitrogen than Sham ($P=0.07$) (Fig. 3D).

275 Following our observation that the alimentary limb and the ileum of RYGB were hypertrophied
276 compared to the corresponding segments in Sham (jejunum and ileum) (Fig. 4A), the amount
277 of dietary nitrogen in different locations of the intestinal tissue was determined for RYGB and
278 Sham groups (Fig. 4B). Surprisingly, there was as much dietary nitrogen in the bilio-pancreatic
279 limb (BPL) (0.083 ± 0.010 % of N ingested) than in the alimentary limb (0.078 ± 0.007 % of N
280 ingested). There were no differences between the jejunum of Sham rats and the common limb
281 of RYGB rats. In contrast, there was less nitrogen in the RYGB ileum (0.052 ± 0.004 % of N
282 ingested) than in Sham (0.065 ± 0.005 % of N ingested; $P = 0.04$).

283 **Figure 4:** Histology of intestine (A) and dietary nitrogen recovered in gastrointestinal tract
 284 tissues expressed in % of nitrogen ingested per 100 mg of fresh weight (B) of Sham and RYGB
 285 rats.



286 Values are means \pm SEM, n = 5 for Sham and n = 6 for RYGB. The differences between Sham and
 287 RYGB were tested in the ileum on one hand and in the jejunum and the common limb on the other hand.
 288 * P<0.05.
 289

290 Protein anabolism

291 The effect of surgery on protein anabolism was assessed by determining the protein synthesis
 292 rate in various organs. There was a group effect (P = 0.037) on the FSR in the kidney, with a
 293 significant decrease in RYGB compared to Sham and VSG (Table 2). There was also a similar
 294 effect on the ASR in the kidney (P=0.017) with a lower value in RYGB than in Sham (P=0.018).
 295 There was no effect of surgery on protein anabolism in the liver, muscle and skin, regardless
 296 of the parameter, FSR or ASR.

297 **Table 2:** Fractional synthesis rate and absolute synthesis rate in liver, kidney, muscle and skin,
 298 depending on the type of bariatric surgery.

	Sham	VSG	RYGB	Group Effect
FSR (%/d)				
Liver	122.7 ± 5.6	138.5 ± 8.9	122.5 ± 5.4	P = 0.10
Kidney	91.3 ± 3.5 ^a	79.8 ± 3.5 ^{ab}	73.3 ± 6.0 ^b	P = 0.02
Muscle	15.2 ± 2.1	15.3 ± 2.8	17.2 ± 1.9	P = 0.87
Skin	15.3 ± 1.1	16.3 ± 1.8	17.4 ± 1.6	P = 0.74
ASR (mg/d/100 mg)				
Liver	25.1 ± 1.8	26.2 ± 1.6	28.0 ± 3.1	P = 0.41
Kidney	15.9 ± 0.7	13.3 ± 0.7	12.8 ± 1.3	P = 0.04
Muscle	3.1 ± 0.4	3.2 ± 0.5	3.6 ± 0.4	P = 0.72
Skin	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.4	5.3 ± 0.5	P = 0.34

299
 300 Values are means ± SEM, n = 11-12 for Sham, n = 6-7 for VSG and n = 8 for RYGB. The effect of the
 301 group was tested with an ANOVA model and post hoc Bonferroni test for pairwise comparisons. Values
 302 with different letters within the same row are statistically different.

303 **Discussion**

304 In the present study, we assessed the consequences of different types of bariatric surgery on
305 protein bioavailability in diet-induced obese rats. For this purpose, we used a single ¹⁵N test
306 meal to determine dietary protein digestibility and its postprandial retention in tissues. We
307 observed that bypass surgery improved real protein digestibility, but that less dietary nitrogen
308 was retained in tissues, except for the hypertrophied intestine. According to our study, intestine
309 remodeling could trigger a preferential use of dietary amino acids by the intestinal mucosa at
310 the expense of other organs.

311 Concerning weight and food intake, our results are in accordance with other studies on the
312 effectiveness of bariatric surgery on weight loss in rat models (29, 32, 37). During the first days
313 after surgery, all animals experienced rapid weight loss due to substantial food restriction. After
314 refeeding, RYGB continued to lose weight but stabilized around six days after surgery,
315 whereas VSG tended to regain weight. Weight regain has been reported VSG (41), but only
316 after two weeks.

317 At day 10, we started a specific feeding schedule in order to implement the final ¹⁵N test meal.
318 This training implied reduced access time to food. This resulted in a substantial reduction of
319 food intake - almost halved - and therefore a recurrence of weight loss in operated rats,
320 particularly in RYGB. Surprisingly, Sham rats maintained their weight despite their being pair-
321 fed with operated rats. The observation that operated rats lose more weight than pair-fed Sham
322 rats has already been reported (1). This could be the consequence of intestinal remodeling
323 that has been described after bypass surgeries (13, 14, 31), resulting in a higher energy
324 demand. Total energy expenditure has consistently been reported to increase by 13% in RYGB
325 rats compared to body weight-matched Sham rats (12). Thereby, food intake during the
326 habituation protocol was enough for Sham to limit their weight loss in contrast to operated rats.
327 As previously described (27), malabsorptive bariatric surgery leads to a notable loss of fat as
328 well as lean mass. This loss of lean mass is an indication of protein imbalance (34). In human

329 subjects, protein deficiency after bariatric surgery has been reported to be more or less
330 prevalent, depending on the judgment criteria (albumin, lean mass loss) (6, 8, 25, 39, 59).

331 Using the ¹⁵N test meal, we aimed at clarifying whether an alteration of protein bioavailability
332 could contribute to the reported protein wasting and loss of lean mass. Nevertheless, due to
333 technical problems in the Eco-MRI follow-up, we could not evidence a lean mass loss after
334 surgery, although it has been shown in rats (55) and humans (27). Digestive bioavailability
335 was established using a standardized procedure to determine oro-fecal digestibility 6 h after
336 the test meal ingestion (10, 36, 44, 45), in the absence of any standardized method to
337 determine ileal digestibility in rats. We measured dietary nitrogen in all the distal segments,
338 including caecum, colon and feces. Amino acids that reach the caecum and colon are
339 metabolized by colonic bacteria, leading to the production of metabolites such as ammonia
340 and indole, which can be absorbed in the colon (23, 62). This results in a systematic
341 overestimation of protein nitrogen digestibility (22, 53). However, this error is acceptable,
342 especially in the case of highly digestible protein, for which the differences between ileal and
343 fecal digestibility have been shown to be of limited extent (53).

344 As expected, most of the dietary nitrogen was found in the caecum due to a mostly complete
345 digestion. Surprisingly, there was less dietary nitrogen in the caecum of RYGB than in VSG
346 and Sham rats. Consequently, RYGB rats showed a significant increase of protein digestibility
347 compared to Sham, while there was no difference for VSG rats compared to Sham. Although
348 there is no comparable data in the literature, this result concurs with a study on patients
349 operated with RYGB (9) that showed a faster blood appearance of amino acids from ¹³C casein
350 given as a meal, thus suggesting a faster absorption. In contrast, a diminution of the apparent
351 fecal protein digestibility was reported 5 and 14 months after RYGB in obese patients (48). Of
352 note in this last study, the reduced absorption of protein was mostly due to a reduced protein
353 intake rather than to protein malabsorption. Other studies reported an increase of fecal protein
354 output in a rat model of biliopancreatic diversion (42) or one anastomosis gastric bypass (14).
355 This seems to be in contradiction with our results. However, this nitrogen loss may not be the

356 result of lower digestibility of dietary proteins, but could arise from caecal bacterial overgrowth
357 and/or an increase of intestinal cell desquamation. Further characterization of these nitrogen
358 losses would be necessary.

359 The metabolic bioavailability was assessed by measuring ^{15}N retention in the blood and
360 different tissues. It was noticeable that in operated rats, the liver weighed less than in Sham
361 rats. A decrease in liver weight has already consistently been shown in rats after VSG (61) or
362 gastric bypass surgery (40). An interesting observation is that the ^{15}N distribution in the
363 splanchnic tissues was altered differently by surgery. In the liver, there was a clear decrease
364 of dietary N uptake regardless of the surgery. This effect can be partly ascribed to the lower
365 liver weight but when expression per unit of tissue weight, the ^{15}N retention was consistently
366 lower in RYGB. Moreover, incorporation in plasma proteins was altered only in RYGB. As
367 plasma proteins are mainly composed of exported liver proteins, this means that the early
368 postprandial incorporation of dietary amino acids in liver protein synthesis was altered due to
369 a deficit of precursor amino acids. In contrast, we found no difference in the liver protein
370 synthesis rate, as assayed by ^{13}C -valine incorporation. This, though, is not inconsistent
371 because it was measured 6 h after the meal, i.e. in the post-absorptive phase. One may
372 suppose that FSR would have been decreased in the bypass groups if measured just after the
373 meal.

374 In the peripheral organs, we also found a trend for a decreased retention of ^{15}N in the muscle
375 RYGB. Regarding protein anabolism, we evidenced little effect of surgery, except in the kidney
376 where FSR and ASR were lower in RYGB than in Sham. It is known that obesity is associated
377 with kidney disorders (60), and it has already been shown that bariatric surgery and
378 subsequent weight loss result in kidney function improvement (17, 21, 43). Our observation of
379 a lower FSR may have been related to a normalization of some biological parameters such as
380 inflammation proteins.

381 In the intestinal tissues, ^{15}N retention could only be measured in RYGB and in Sham animals.
382 ^{15}N recovery was similar in the common limb of RYGB and the jejunum in Sham, but lower in

383 the ileum of RYGB compared to Sham. The latter could be interpreted either as a lower
384 absorption of dietary AA in the distal portion of the ileum, or by a decrease of substrate
385 availability. The second interpretation is more probable considering that protein digestibility did
386 increase in RYGB. Surprisingly, we recovered some dietary nitrogen in the bilio-pancreatic
387 limb, as much as in the alimentary limb, although stomach chyme is not expected to transit
388 through the BPL. One hypothesis is that ¹⁵N amino acids, coming mainly from the mesenteric
389 arteria, were absorbed by the basolateral side of BPL enterocytes. It is possible that mucosa
390 remodeling enhanced this metabolic pathway. A similar observation has been made for
391 glucose, where GLUT1 has appeared to be over expressed at the basolateral membrane in
392 RYGB rats (13, 54). This has been linked to the hyperplasia of jejunal mucosa, reported in
393 several studies (12, 13, 57) including the present one, resulting in an increase of villi height in
394 the common and alimentary limbs (56) as well as mucosal volume and weight (12). This trophic
395 effect may be mediated by GLP-2 that has been reported to be over excreted in animal models
396 and in humans (15, 16). We also observed a hyperplasia in the common limb and even in the
397 ileum (Figure 4). We did not weigh the intestinal mucosa, but the gut weight has been shown
398 to be twofold heavier in gastric bypass than in Sham operated rats (12, 54). As we found a
399 similar amount of dietary N per g of intestine, we can suppose that the intestine sequestered
400 twice more dietary N in RYGB than in Sham. If we consider an average ¹⁵N retention of
401 0.06%/100 mg for the whole intestine and an intestinal weight of 20 g in RYGB and 10 g in
402 Sham as previously reported (12), this would result in an intestinal dietary N sequestration of
403 12% in RYGB vs. 6% in Sham rats. This would consistently explain why dietary AA were less
404 present in the peripheral area, whereas digestibility was improved. They were likely
405 preferentially used by the remodeled intestine in RYGB rats.

406 This study had some limitations, in particular, the number of animals in each group, which was
407 a consequence of the high mortality after RYGB procedure and which resulted in a lack of
408 statistical power. Moreover, we did not provide a complete understanding of dietary protein
409 metabolism after bariatric surgery due to missing measurements, such as initial body

410 composition, postprandial FSR measurements as well as FSR in the intestine. The latter was
411 not determined because we have chosen an incorporation time of the tracer (30 min) that
412 allowed to study several organs at once but that was too long for a very high turnover tissue
413 such as small intestine mucosa (2, 51). This study addressed the short-term consequences of
414 bariatric surgery; it would be useful to study these parameters in the long-term. Indeed,
415 alteration of protein bioavailability could be transitory, considering intestine remodeling and
416 adaptation. It would also be necessary to challenge these results in human studies using
417 convenient and poorly invasive procedures to assess dietary protein bioavailability.

418 In conclusion, this study provided the first data on dietary protein bioavailability after bariatric
419 surgery in rats. Unexpectedly, we reported a slight improvement of protein digestibility after
420 RYGB but not after VSG. In contrast, RYGB decreased dietary nitrogen retention in the
421 peripheral organs except in the intestine, due to a deficit of amino acid delivery. This strongly
422 suggests a higher uptake of amino acids by the remodeled intestine for its own needs.

423 **Acknowledgements: N/A**

424 **Conflict of interest statement:** The authors declare no conflict of interest.

425 **Author contributions to manuscript:** CG and MLG: study concept and design and study
426 supervision; RT, LRP, OB, JBC, NK, AB, MLG, CG: acquisition of data, analysis and
427 interpretation of data; RT, OB, MLG, CG: statistical analysis; RT, MLG and CG: drafting of the
428 manuscript; RT, CG, AB, DAM, JC, CG, MLG: critical revision of the manuscript for important
429 intellectual content; All authors: approval of the final version of the manuscript.

Bibliography

1. **Abegg K, Corteville C, Docherty NG, Boza C, Lutz TA, Muñoz R, le Roux CW.** Effect of bariatric surgery combined with medical therapy versus intensive medical therapy or calorie restriction and weight loss on glycemic control in Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 308: R321–R329, 2015.
2. **Adegoke OAJ, McBurney MI, Baracos VE.** Jejunal mucosal protein synthesis: validation of luminal flooding dose method and effect of luminal osmolarity. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 276: G14–G20, 1999.
3. **Alamuddin N, Vetter ML, Ahima RS, Hesson L, Ritter S, Minnick A, Faulconbridge LF, Allison KC, Sarwer DB, Chittams J, Williams NN, Hayes MR, Loughead JW, Gur R, Wadden TA.** Changes in Fasting and Prandial Gut and Adiposity Hormones Following Vertical Sleeve Gastrectomy or Roux-en-Y-Gastric Bypass: an 18-Month Prospective Study. *Obes Surg* 27: 1563–1572, 2017.
4. **Angrisani L, Santonicola A, Iovino P, Formisano G, Buchwald H, Scopinaro N.** Bariatric Surgery Worldwide 2013. *Obes Surg* 25: 1822–1832, 2015.
5. **Arapis K, Cavin JB, Gillard L, Cluzeaud F, Lettéron P, Ducroc R, Le Beyec J, Hourseau M, Couvelard A, Marmuse J-P, Le Gall M, Bado A.** Remodeling of the Residual Gastric Mucosa after Roux-En-Y Gastric Bypass or Vertical Sleeve Gastrectomy in Diet-Induced Obese Rats. *PLoS ONE* 10: e0121414, 2015.
6. **Aron-Wisnewsky J, Verger EO, Bounaix C, Dao MC, Oppert J-M, Bouillot J-L, Chevallier J-M, Clément K.** Nutritional and Protein Deficiencies in the Short Term following Both Gastric Bypass and Gastric Banding. *PLOS ONE* 11: e0149588, 2016.
7. **Barazzoni R, Zanetti M, Nagliati C, Cattin MR, Ferreira C, Giuricin M, Palmisano S, Edalucci E, Dore F, Guarnieri G, de Manzini N.** Gastric bypass does not normalize obesity-related changes in ghrelin profile and leads to higher acylated ghrelin fraction. *Obesity* 21: 718–722, 2013.
8. **Bloomberg RD, Fleishman A, Nalle JE, Herron DM, Kini S.** Nutritional Deficiencies following Bariatric Surgery: What Have We Learned? *Obes Surg* 15: 145–154, 2005.
9. **Bojsen-Møller KN, Jacobsen SH, Dirksen C, Jørgensen NB, Reitelseder S, Jensen J-EB, Kristiansen VB, Holst JJ, van Hall G, Madsbad S.** Accelerated protein digestion and amino acid absorption after Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr* 102: 600–607, 2015.
10. **Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, Blachier F, Tomé D, Bos C.** Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutr Metab* 8: 52, 2011.
11. **Brethauer SA, Hammel JP, Schauer PR.** Systematic review of sleeve gastrectomy as staging and primary bariatric procedure. *Surg Obes Relat Dis* 5: 469–475, 2009.
12. **Bueter M, Löwenstein C, Olbers T, Wang M, Cluny NL, Bloom SR, Sharkey KA, Lutz TA, le Roux CW.** Gastric Bypass Increases Energy Expenditure in Rats. *Gastroenterology* 138: 1845-1853.e1, 2010.

13. **Cavin J-B, Couvelard A, Lebtahi R, Ducroc R, Arapis K, Voitellier E, Cluzeaud F, Gillard L, Hourseau M, Mikail N, Ribeiro-Parenti L, Kapel N, Marmuse J-P, Bado A, Le Gall M.** Differences in Alimentary Glucose Absorption and Intestinal Disposal of Blood Glucose After Roux-en-Y Gastric Bypass vs Sleeve Gastrectomy. *Gastroenterology* 150: 454-464.e9, 2016.
14. **Cavin J-B, Voitellier E, Cluzeaud F, Kapel N, Marmuse J-P, Chevallier J-M, Msika S, Bado A, Le Gall M.** Malabsorption and intestinal adaptation after one anastomosis gastric bypass compared with Roux-en-Y gastric bypass in rats. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 311: G492–G500, 2016.
15. **Cazzo E, Gestic MA, Utrini MP, Chaim FDM, Geloneze B, Pareja JC, Chaim EA, Magro DO, Department of Surgery, Brazil, State University of Campinas, Brazil.** GLP-2: a poorly understood mediator enrolled in various bariatric/metabolic surgery-related pathophysiologic mechanisms. *ABCD Arq Bras Cir Dig São Paulo* 29: 272–275, 2016.
16. **Cazzo E, Gestic MA, Utrini MP, Pareja JC, Chaim EA, Geloneze B, Barreto MRL, Magro DO, Department of Surgery, Brazil, State University of Campinas, Brazil.** Correlation between pre and postoperative levels of GLP-1/GLP-2 and weight loss after Roux-en-Y Gastric Bypass: a Prospective study. *ABCD Arq Bras Cir Dig São Paulo* 29: 257–259, 2016.
17. **Chang AR, Chen Y, Still C, Wood GC, Kirchner HL, Lewis M, Kramer H, Hartle JE, Carey D, Appel LJ, Grams ME.** Bariatric surgery is associated with improvement in kidney outcomes. *Kidney Int* 90: 164–171, 2016.
18. **Chevalier L, Bos C, Gryson C, Luengo C, Walrand S, Tomé D, Boirie Y, Gaudichon C.** High-protein diets differentially modulate protein content and protein synthesis in visceral and peripheral tissues in rats. *Nutrition* 25: 932–939, 2009.
19. **Colquitt JL, Pickett K, Loveman E, Frampton GK.** Surgery for weight loss in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* (August 8, 2014). doi: 10.1002/14651858.CD003641.pub4.
20. **Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ.** Plasma Ghrelin Levels after Diet-Induced Weight Loss or Gastric Bypass Surgery. *N Engl J Med* 346: 1623–1630, 2002.
21. **Currie A, Chetwood A, Ahmed AR.** Bariatric Surgery and Renal Function. *Obes Surg* 21: 528–539, 2011.
22. **Darragh AJ, Hodgkinson SM.** Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. *J Nutr* 130: 1850S-1856S, 2000.
23. **Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti P-H, Sanz Y, Tomé D.** Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. *Pharmacol Res* 68: 95–107, 2013.
24. **Duboc H, Nguyen CC, Cavin J-B, Ribeiro-Parenti L, Jarry A-C, Rainteau D, Humbert L, Coffin B, Le Gall M, Bado A, Sokol H.** Roux-en-Y Gastric-Bypass and sleeve gastrectomy induces specific shifts of the gut microbiota without altering the metabolism of bile acids in the intestinal lumen. *Int J Obes* 43: 428–431, 2019.
25. **Faintuch J, Matsuda M, Cruz MELF, Silva MM, Teivelis MP, Garrido Jr AB, Gama-Rodrigues JJ.** Severe Protein-Calorie Malnutrition after Bariatric Procedures. *Obes Surg* 14: 175–181, 2004.

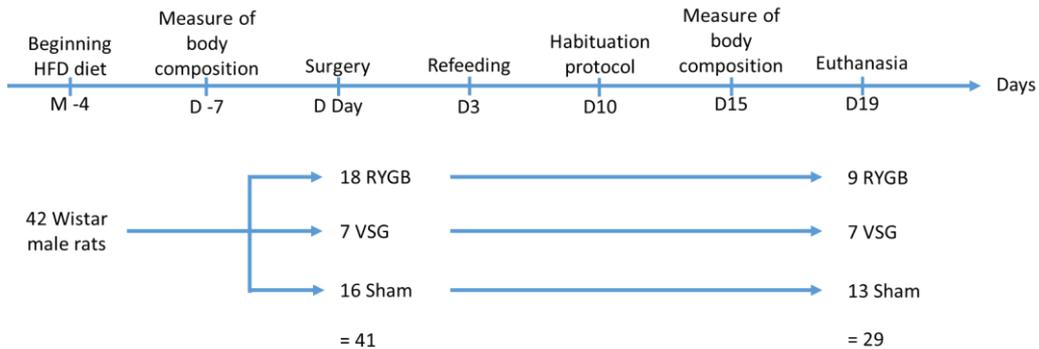
26. **Fromentin C, Azzout-Marniche D, Tomé D, Even P, Luengo C, Piedcoq J, Fromentin G, Gaudichon C.** The postprandial use of dietary amino acids as an energy substrate is delayed after the deamination process in rats adapted for 2 weeks to a high protein diet. *Amino Acids* 40: 1461–1472, 2011.
27. **Gene Carey D, Pliego G, Raymond R, Brooke Skau K.** Body Composition and Metabolic Changes Following Bariatric Surgery: Effects on Fat Mass, Lean Mass and Basal Metabolic Rate. *Obes Surg* 16: 469–477, 2006.
28. **Georgiadou D, Sergentanis TN, Nixon A, Diamantis T, Tsigris C, Psaltopoulou T.** Efficacy and safety of laparoscopic mini gastric bypass. A systematic review. *Surg Obes Relat Dis* 10: 984–991, 2014.
29. **Grayson BE, Hakala-Finch AP, Kekulawala M, Laub H, Egan AE, Ressler IB, Woods SC, Herman JP, Seeley RJ, Benoit SC, Ulrich-Lai YM.** Weight loss by calorie restriction versus bariatric surgery differentially regulates the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in male rats. *Stress* 17: 484–493, 2014.
30. **Grover Z, Ee LC.** Protein Energy Malnutrition. *Pediatr Clin North Am* 56: 1055–1068, 2009.
31. **Hansen CF, Bueter M, Theis N, Lutz T, Paulsen S, Dalbøge LS, Vrang N, Jelsing J.** Hypertrophy Dependent Doubling of L-Cells in Roux-en-Y Gastric Bypass Operated Rats. *PLoS ONE* 8: e65696, 2013.
32. **Hao Z, Townsend RL, Mumphrey MB, Patterson LM, Ye J, Berthoud H-R.** Vagal Innervation of Intestine Contributes to Weight Loss After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in Rats. *Obes Surg* 24: 2145–2151, 2014.
33. **Jammu GS, Sharma R.** A 7-Year Clinical Audit of 1107 Cases Comparing Sleeve Gastrectomy, Roux-En-Y Gastric Bypass, and Mini-Gastric Bypass, to Determine an Effective and Safe Bariatric and Metabolic Procedure. *Obes Surg* 26: 926–932, 2016.
34. **Jensen GL, Mirtallo J, Compher C, Dhaliwal R, Forbes A, Grijalba RF, Hardy G, Kondrup J, Labadarios D, Nyulasi I, Castillo Pineda JC, Waitzberg D.** Adult starvation and disease-related malnutrition: A proposal for etiology-based diagnosis in the clinical practice setting from the International Consensus Guideline Committee. *Clin Nutr* 29: 151–153, 2010.
35. **Kalinowski P, Paluszkiewicz R, Wróblewski T, Remiszewski P, Grodzicki M, Bartoszewicz Z, Krawczyk M.** Ghrelin, leptin, and glycemic control after sleeve gastrectomy versus Roux-en-Y gastric bypass—results of a randomized clinical trial. *Surg Obes Relat Dis* 13: 181–188, 2017.
36. **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* 54: 1508–1517, 2006.
37. **Lutz TA, Bueter M.** Physiological Mechanisms behind Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Dig Surg* 31: 13–24, 2014.
38. **Malinowski SS.** Nutritional and Metabolic Complications of Bariatric Surgery. *Am J Med Sci* 331: 219–225, 2006.
39. **Moizé V, Andreu A, Rodríguez L, Flores L, Ibarzabal A, Lacy A, Jiménez A, Vidal J.** Protein intake and lean tissue mass retention following bariatric surgery. *Clin Nutr* 32: 550–555, 2013.

40. **Mosinski JD, Pagadala MR, Mulya A, Huang H, Dan O, Shimizu H, Batayyah E, Pai RK, Schauer PR, Brethauer SA, Kirwan JP.** Gastric bypass surgery is protective from high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and hepatic endoplasmic reticulum stress. *Acta Physiol* 217: 141–151, 2016.
41. **Mumphrey MB, Hao Z, Townsend RL, Patterson LM, Berthoud H-R.** Sleeve Gastrectomy Does Not Cause Hypertrophy and Reprogramming of Intestinal Glucose Metabolism in Rats. *Obes Surg* 25: 1468–1473, 2015.
42. **Nadreau E, Baraboi E-D, Samson P, Blouin A, Hould F-S, Marceau P, Biron S, Richard D.** Effects of the biliopancreatic diversion on energy balance in the rat. *Int J Obes* 30: 419–429, 2006.
43. **Neff KJ, Frankel AH, Tam FWK, Sadlier DM, Godson C, le Roux CW.** The effect of bariatric surgery on renal function and disease: a focus on outcomes and inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 28: iv73–iv82, 2013.
44. **Oberli M, Douard V, Beaumont M, Jaoui D, Devime F, Laurent S, Chaumontet C, Mat D, Le Feunteun S, Michon C, Davila A-M, Fromentin G, Tomé D, Souchon I, Leclerc M, Gaudichon C, Blachier F.** Lipo-Protein Emulsion Structure in the Diet Affects Protein Digestion Kinetics, Intestinal Mucosa Parameters and Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res* 62: 1700570, 2018.
45. **Oberli M, Lan A, Khodorova N, Santé-Lhoutellier V, Walker F, Piedcoq J, Davila A-M, Blachier F, Tomé D, Fromentin G, Gaudichon C.** Compared with Raw Bovine Meat, Boiling but Not Grilling, Barbecuing, or Roasting Decreases Protein Digestibility without Any Major Consequences for Intestinal Mucosa in Rats, although the Daily Ingestion of Bovine Meat Induces Histologic Modifications in the Colon. *J Nutr* 146: 1506–1513, 2016.
46. **Oberli M, Marsset-Baglieri A, Airinei G, Santé-Lhoutellier V, Khodorova N, Rémond D, Foucault-Simonin A, Piedcoq J, Tomé D, Fromentin G, Benamouzig R, Gaudichon C.** High True Ileal Digestibility but Not Postprandial Utilization of Nitrogen from Bovine Meat Protein in Humans Is Moderately Decreased by High-Temperature, Long-Duration Cooking. *J Nutr* 145: 2221–2228, 2015.
47. **O'Brien P, McPhail T, Chaston T, Dixon J.** Systematic Review of Medium-Term Weight Loss after Bariatric Operations. *Obes Surg* 16: 1032–1040, 2006.
48. **Odstrcil EA, Martinez JG, Santa Ana CA, Xue B, Schneider RE, Steffer KJ, Porter JL, Asplin J, Kuhn JA, Fordtran JS.** The contribution of malabsorption to the reduction in net energy absorption after long-limb Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr* 92: 704–713, 2010.
49. **Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D, Fouillet H.** The Nature of the Dietary Protein Impacts the Tissue-to-Diet 15N Discrimination Factors in Laboratory Rats. *PLoS ONE* 6: e28046, 2011.
50. **Pucci A, Batterham RL.** Mechanisms underlying the weight loss effects of RYGB and SG: similar, yet different. *J Endocrinol Invest* 42: 117–128, 2019.
51. **Rajendram R, Marway JS, Mantle D, Peters TJ, Preedy VR.** Skeletal muscle and jejunal protein synthesis in normal and ethanol-treated rats: The effect of the nitric oxide synthase inhibitors, L- ω -nitro-L-arginine methyl ester and N(G)-nitro-L-arginine in vivo. *Metabolism* 52: 397–401, 2003.

52. **Rebours V, Garteiser P, Ribeiro-Parenti L, Cavin J-B, Doblaz S, Pagé G, Bado A, Couvineau A, Ruzniewski P, Paradis V, Le Gall M, Van Beers BE, Couvelard A.** Obesity-induced pancreatopathy in rats is reversible after bariatric surgery. *Sci Rep* 8: 16295, 2018.
53. **Rutherford SM, Fanning AC, Miller BJ, Moughan PJ.** Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *J Nutr* 145: 372–379, 2015.
54. **Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Kvas S, Kucharczyk J, Bonab AA, Fischman AJ, Yarmush ML, Stylopoulos N.** Reprogramming of Intestinal Glucose Metabolism and Glycemic Control in Rats After Gastric Bypass. *Science* 341: 406–410, 2013.
55. **Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Patterson LM, Holmes GM, Berthoud H-R.** Longitudinal Assessment of Food Intake, Fecal Energy Loss, and Energy Expenditure After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in High-Fat-Fed Obese Rats. *Obes Surg* 23: 531–540, 2013.
56. **Stearns AT, Balakrishnan A, Tavakkolizadeh A.** Impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on rat intestinal glucose transport. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 297: G950–G957, 2009.
57. **Taqi E, Wallace LE, de Heuvel E, Chelikani PK, Zheng H, Berthoud H-R, Holst JJ, Sigalet DL.** The influence of nutrients, biliary-pancreatic secretions, and systemic trophic hormones on intestinal adaptation in a Roux-en-Y bypass model. *J Pediatr Surg* 45: 987–995, 2010.
58. **Vdoviaková K, Petrovová E, Maloveská M, Krešáková L, Teleky J, Elias MZJ, Petrášová D.** Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterol Res Pract* 2016: 1–11, 2016.
59. **Verger EO, Aron-Wisnewsky J, Dao MC, Kayser BD, Oppert J-M, Bouillot J-L, Torcivia A, Clément K.** Micronutrient and Protein Deficiencies After Gastric Bypass and Sleeve Gastrectomy: a 1-year Follow-up. *Obes Surg* 26: 785–796, 2016.
60. **Wang Y, Chen X, Song Y, Caballero B, Cheskin LJ.** Association between obesity and kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Kidney Int* 73: 19–33, 2008.
61. **Watanabe K, Ohta M, Takayama H, Tada K, Shitomi Y, Kawasaki T, Kawano Y, Endo Y, Iwashita Y, Inomata M.** Effects of Sleeve Gastrectomy on Nonalcoholic Fatty Liver Disease in an Obese Rat Model. *Obes Surg* 28: 1532–1539, 2018.
62. **Yao CK, Muir JG, Gibson PR.** Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther* 43: 181–196, 2016.
63. Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 27: 1–22, 1993.

Supplementary Material

Supplemental Figure 1. Experimental design of the study.



Sketch presents the main steps of the protocol from the beginning of High Fat diet feeding to euthanasia.

Supplemental Table 1. Composition of high fat diet (HFD) and standard diet (P14).

	Altromin C1090-45 HFD		Standard diet P14	
	g/kg DM	%	g/kg DM	%
Protein	207.8	20.8	140	14
Fat	226.3	22.6	40	4
Carbohydrates	381.8	38	722.7	72.3
Fiber	55.7	5.6	50	5
Minerals	24.0	2.4	35	3,5
Vitamins	1.6	1.6	10	1
Others	102.8	9.0	2.3	0.2
	kcal/kg	% of energy	kcal/kg	% of energy
Total protein	831	18	524.6	15
Total Fat	2037	45	378.1	10
Total carbohydrate	1629	37	2681.5	74
Total vitamins	0	0	39.1	1
Total energy	4497		3623.3	

Composition in mass (g/kg of dry matter (DM)) and energy supply (kcal/kg).

Supplemental Table 2. Follow up of body composition (in g) after bariatric surgery.

	Sham	VSG	RYGB	Group effect
Initial	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	
Lean Mass (g)	419 ± 9	411 ± 9	406 ± 12	NS
Fat Mass (g)	148 ± 11	131 ± 16	165 ± 13	NS
Final	<i>n</i> = 13	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 9	
Lean Mass (g)	392 ± 10	384 ± 5	380 ± 9	NS
Fat Mass (g)	121 ± 9	87 ± 13	116 ± 10	NS
Delta	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	
Lean Mass (g)	-27 ± 7	-26 ± 7	-26 ± 8	NS
Fat Mass (g)	-27 ± 3 ^a	-43 ± 5 ^{ab}	-48 ± 9 ^b	P = 0.02

Values are means ± SEM. Surgery effects were tested after surgery for fat and lean by a one-way ANOVA test and post hoc Bonferroni's test for multiple comparisons. Values with different letters within a column are statistically different.

Titre : Etude de la biodisponibilité des protéines et acides aminés du tournesol chez le rat et l'Homme ; mise en œuvre de la méthode double traceur

Mots clés : Isotopes stables – Tournesol – Digestibilité – Qualité protéique – Homme - Rat

Résumé : En vue de diversifier les sources de protéines végétales pour l'alimentation humaine, le tournesol est un candidat intéressant. Il n'existe pas d'études chez l'Homme sur la qualité des protéines et acides aminés d'isolat de tournesol. La mesure directe de la digestibilité des acides aminés au niveau iléal est invasive, c'est pourquoi une nouvelle méthode moins invasive, dite double traceur, a été développée. Cette méthode repose sur l'administration de la protéine d'intérêt marquée au ^2H ou au ^{15}N et d'une protéine de référence marquée au ^{13}C . Le rapport relatif entre les deux isotopes ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ ou $^2\text{H}/^{13}\text{C}$) d'un même acide aminé dans le repas et le plasma reflète l'absorption relative des deux protéines. Les objectifs de cette thèse sont (1) de déterminer la qualité protéique du tournesol et (2) de mettre en place et valider la méthode double traceur, chez le rat et chez l'Homme.

Les protéines de tournesol ont été marquées soit au ^{15}N et ^2H en serre, soit au ^{15}N en plein champ, et purifiées en isolats. Les études chez le rat ont permis de caractériser la qualité de l'isolat de tournesol, d'évaluer la pertinence de l'utilisation de la spiruline ^{13}C comme protéine de référence dans la méthode double traceur et de mettre en application cette méthode.

L'étude clinique visait à déterminer la qualité protéique de l'isolat de tournesol inclus dans un biscuit et de comparer les valeurs de digestibilité iléale obtenues par la mesure directe dans l'iléon *via* une sonde naso-iléale à celles de la méthode double traceur.

La protéine de tournesol purifiée a une digestibilité élevée (95%) chez le rat mais plus faible chez l'Homme lorsqu'elle est incorporée et cuite dans un biscuit (87%), et ce malgré une bonne utilisation postprandiale (72%). Bien que modérément limitée en lysine (DIAAS de 0,78 à 0,94 selon le facteur de conversion protéine/N), son utilisation en alimentation humaine est intéressante. La méthode double traceur s'est avérée difficilement applicable chez le rat en raison de la faible quantité de sang prélevable séquentiellement. Chez l'Homme, la comparaison entre digestibilité iléale des acides aminés et les indices d'absorption $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ dans le plasma montre que la méthode double traceur donne des valeurs cohérentes physiologiquement mais environ 10% plus faibles que les valeurs de digestibilité et une forte imprécision. L'utilisation du ^2H n'ayant pu être testée, elle aurait peut-être produit de meilleurs résultats.

Title: Sunflower protein and amino acid biodisponibility in rats and humans; implementation of the dual tracer method

Keywords : Stable isotope – Sunflower – Digestibility – Protein quality – humans – Rat

Abstract: In the search for new plant protein sources for human nutrition, sunflower is a good candidate. There is no study on protein and amino acid quality of sunflower protein isolate in humans. Ileal direct digestibility assessment is invasive, that is the reason why a less invasive method, called dual tracer, was developed. This method is based on the ingestion of a ^{15}N or ^2H labeled test protein and ^{13}C labeled reference protein. Relative ratio between the two isotopes ($^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ or $^2\text{H}/^{13}\text{C}$) for a given amino acid in the meal and the plasma reflects the relative absorption between the two proteins. This thesis aims (1) to determine sunflower protein quality and (2) to validate the dual tracer method in rats and in humans.

Sunflower was labeled either with ^{15}N and ^2H under a greenhouse or with ^{15}N in open fields, and protein were isolated. Rat studies allowed to characterize sunflower isolate quality, to evaluate the use of ^{13}C spirulina as reference protein of the dual tracer method and to challenge this method in this model.

The clinical study aimed to determine sunflower protein isolate quality included in biscuits and to compare direct ileal digestibility values obtained with direct measurement with a naso-ileal tube to those from the dual tracer method.

Sunflower protein isolate have a high digestibility (95%) in rats but a lower digestibility in humans when incorporated and cooked in biscuits (87%) despite a good postprandial utilization (72%). Although moderately limited in lysine (DIAAS of 0.78 to 0.94 according to the conversion factor protein/N), its use in human nutrition is interesting. The dual tracer method was hardly applicable in rats, because of the small amount of blood available sequentially. In humans, comparison between ileal digestibility and plasma $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ absorption indexes shows that the dual tracer method produces physiologically relevant values but about 10% lower than digestibility values and with a high imprecision. Better results could have been obtained with the use of ^2H .