HAL open science

Qualité nutritionnelle de la protéine de pois et développement méthodologique sur la digestibilité des acides aminés chez le rat et chez l'Homme

Florence Guillin

▶ **To cite this version:**

Florence Guillin. Qualité nutritionnelle de la protéine de pois et développement méthodologique sur la digestibilité des acides aminés chez le rat et chez l'Homme. Alimentation et Nutrition. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB020 . tel-03295380

HAL Id: tel-03295380

https://pastel.hal.science/tel-03295380v1

Submitted on 22 Jul 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.

université PARIS-SACLAY

Qualité nutritionnelle de la protéine de pois et développement méthodologique sur la digestibilité des acides aminés chez le rat et chez l'Homme

Nutritional quality of pea protein and development of methods for assessing amino acid digestibility in rats and humans

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Sciences de la nutrition
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, 75005, Paris, France.
Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay, le 23/04/2021, par

Florence M. GUILLIN

Composition du Jury

Rozenn RAVALLEC Professeure, Université de Lille	Présidente & Rapporteur
Dominique DARDEVET Directeur de recherche, INRAE – Centre Clermont-Auvergne-Rhône Alpes	Rapporteur & Examinateur
Hervé BERNARD Ingénieur de recherche, INRAE – Centre IdF-Jouy-en-Josas	Examinateur
Steven LE FEUNTEUN Chargé de recherche, INRAE – Centre Bretagne-Normandie	Examinateur

Direction de la thèse

Claire GAUDICHON Professeure, AgroParisTech	Directrice de thèse
Juliane CALVEZ Chargée de recherche, INRAE – Centre IdF-Jouy-en-Josas	Co-Encadrante & Examinatrice
Laetitia GUERIN-DEREMAUX Docteure, Roquette	Invitée, Tutrice en entreprise
Catherine LEFRANC-MILLOT Docteure, Roquette	Invitée, Tutrice en entreprise

Thèse de doctorat

NNT : 2021UPASB020

Remerciements

Ces travaux ont été menés grâce à l'implication d'un grand nombre de personnes, à qui je souhaite témoigner toute ma gratitude.

Tout d'abord, je tiens à remercier Dominique Dardevet (INRAE Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes) et Rozenn Ravallec (Université de Lille) de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi qu'Hervé Bernard (INRAE Jouy-en-Josas) et Steven Le Feunteun (INRAE Bretagne-Normandie) d'avoir intégré le jury en tant qu'examinateurs.

Je remercie vivement Claire Gaudichon, ma directrice de ma thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordée et pour ses conseils avisés, qui m'ont guidée tout au long du projet. Mes remerciements vont aussi à Juliane Calvez, qui a encadré ces travaux. Juliane, je te remercie profondément pour ton investissement, ta disponibilité et ton écoute. Je remercie chaleureusement Laetitia Guérin-Deremaux et Catherine Lefranc-Millot, mes responsables au sein de Roquette, pour leur implication et leur disponibilité au cours de ce projet. Merci pour votre bienveillance et vos nombreux conseils, c'était un plaisir d'échanger avec vous pendant ces trois ans. J'ai eu la chance d'intégrer ce projet impliquant plusieurs partenaires, et je suis fière du travail que nous avons produit ensemble.

Je tiens à remercier vivement Amélie Deglaire et Stéphane Walrand pour leur participation aux comités de thèse, notamment pour avoir enrichi les réflexions par leur expertise et consacré un temps important à ces réunions.

J'adresse mes remerciements au CRV de l'hôpital Avicenne de Bobigny, en particulier au Pr Robert Benamouzig, au Dr Gheorghe Airinei, à Marie-Claude Amard et à Bruna Neves, grâce à qui nous avons pu réaliser l'étude clinique de ces travaux.

Je remercie l'Unité Expérimentale du Domaine d'Epoisses de l'INRAE et la Ferme Expérimentale d'AgroParisTech, notamment Juliette Martin et Pierre-Henri Pomport, d'avoir mené les protocoles de marquage des protéines.

J'adresse mes remerciements chaleureux à tous les membres du laboratoire PNCA, à commencer par Dalila Azzout-Marniche pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, Nadezda Khodorova pour sa participation aux analyses de spectrométrie de masse, et Morgane Dufay pour son aide précieuse pendant les expérimentations animales. Un grand merci à Romain Tessier de m'avoir formée, aidée, et conseillée tant de fois. Merci à Catherine Chaumontet, Véronique Mathé, Vanessa Hudry, Julien

Piedcoq, et Nathalie Loquet pour leur aide et leur participation aux essais. Je remercie également Stéphane Besançon de l'UMR GENIAL AgroParisTech/INRAE d'avoir réalisé les dosages de spectrophotométrie d'absorption atomique.

J'adresse mes remerciements au département R&D Nutrition & Health de Roquette d'avoir porté ce projet. Je remercie Sergio Neves et toute l'équipe pour leur accueil chaleureux et la richesse des échanges au cours de nos réunions. Merci à Christophe Laroche et à son équipe du Process Development de m'avoir accueillie pour mener le protocole d'extraction des protéines. Merci également à Caroline Perreau et à son équipe du Preclinical Lab pour leur aide et leur gentillesse pendant le tri des pois bruchés.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, pour tout le travail fourni et leur grande implication dans le projet : Marie Jozwiak, Grégoire Soghomonian, Maximilien Etheve et Aline Bervoet. Merci également à Pierre-Louis Batrow pour sa participation aux essais.

Je pense également à mes anciens collègues de l'équipe R&D d'Ingredia, qui ont initié mon parcours scientifique lors de ma première expérience professionnelle avant la thèse. Merci notamment à Audrey Boulier, qui m'a beaucoup appris et m'a conseillée de nombreuses fois dans mon parcours.

L'étude clinique a été rendue possible grâce à la participation de volontaires qui ont supporté un protocole contraignant, merci à eux. Une pensée également pour les petits rats, dont j'ai eu tant de plaisir à m'occuper au cours des études animales.

Sur un plan plus personnel, je remercie mes compagnons doctorants/eurs et amis : Alison, Alya, Armelle, Chloé, Elie, Erwan, Gabrielle, Gaëtan, Joanna, Joséphine, Laurianne, Marion, Moufidath, Nathalie, Olivier, Sandra, Simon, Soukaïna, et Trenton, d'avoir apporté beaucoup de joie à ces trois années.

Je consacre ce dernier paragraphe à ma famille et à mes amis, que je remercie pour leurs encouragements pendant la rédaction. Une pensée particulière pour mes parents, qui m'ont apporté une précieuse sérénité durant cette période.

Résumé

Pour une alimentation plus durable, il est nécessaire d'identifier des alternatives végétales aux protéines animales. Le pois présente de nombreux avantages, mais sa digestibilité doit être évaluée.

Or, l'évaluation de la digestibilité iléale des acides aminés (AA) est sujette à des difficultés méthodologiques. Chez le rat, il n'existe pas de méthode validée. Chez l'Homme, la méthode directe standard est très invasive car elle nécessite de collecter les pertes digestives par intubation. Une nouvelle méthode plasmatique minimalement invasive, dite « double traceur », a été proposée. Elle repose sur l'ingestion simultanée d'une protéine test marquée au ^{2}H et d'une protéine de référence de digestibilité connue, marquée au ^{13}C. Les objectifs de nos travaux étaient : 1) évaluer la qualité nutritionnelle de la protéine de pois jaune en comparaison à la caséine et au gluten par l'étude de la digestibilité et d'autres critères de qualité, chez le rat et chez l'Homme ; 2) développer les méthodes de mesure de la digestibilité iléale des AA dans ces deux modèles. Chez l'Homme, il s'agissait de comparer la méthode double traceur à la méthode directe par l'étude d'isolats protéiques marqués au ^{15}N et au ^{2}H.

La digestibilité élevée obtenue pour les AA de la protéine de pois, chez le rat (95%) et chez l'Homme (94%), révèle sa haute qualité nutritionnelle. Sa comparaison à la caséine et au gluten la positionne favorablement parmi l'offre de protéines disponibles. La composition en AA équilibrée de la protéine de pois couplée à sa haute digestibilité a abouti à des scores de qualité DIAAS satisfaisants (1,00 chez l'Homme, 0,88 chez le rat). Chez le rat, nous avons montré que la digestibilité cæcale vraie pourrait approximer la digestibilité iléale vraie. Chez l'Homme, la méthode double traceur a fourni des valeurs de digestibilité variables, qui étaient physiologiques pour certains AA et incohérentes pour d'autres. Cette méthode nécessite davantage de mises au point mais reste prometteuse.

Abstract

To achieve a more sustainable diet, it is necessary to identify plant-based alternatives to animal proteins. Pea exhibits many benefits, but its digestibility has to be evaluated.

The evaluation of ileal amino acid (AA) digestibility is subject to methodological difficulties. In rats, no validated method exists. In humans, the standard direct method requires intubation to collect the digestive losses and is highly invasive. A new minimally invasive plasma method, called "dual tracer", has been proposed. It is based on the simultaneous ingestion of a ^{2}H-labelled test protein and a ^{13}C-labelled reference protein of known digestibility. The objectives of this work were 1) to evaluate the nutritional quality of yellow pea protein in comparison to casein and gluten, through the assessment of digestibility and other quality criteria, in rats and humans; 2) to develop methods for measuring ileal AA digestibility in these two models. In humans, the aim was to compare the dual tracer method and the direct method by studying protein isolates that were labelled with ^{15}N and ^{2}H.

The high AA digestibility obtained for pea protein, in rats (95%) and in humans (94%), ensures a high nutritional quality. The comparison with casein and gluten favourably positions pea protein among the available protein supply. The balanced AA composition of pea protein and its high digestibility resulted in an adequate DIAAS (1.00 in humans, 0.88 in rats). In rats, we showed that true cecal digestibility could approximate true ileal digestibility. In humans, the dual tracer method yielded variable AA digestibility values, some of which were physiological and others were inconsistent. The dual tracer method needs further development but remains promising.

Sommaire

Remerciements 1
Résumé 3
Abstract 4
Sommaire 5
Liste des figures 7
Liste des tableaux 8
Abréviations 9
Contexte de réalisation de la thèse 11
Valorisation scientifique 12
Introduction générale 14

Chapitre 1 – Introduction bibliographique 19
1. Métabolisme protéique 20
1.1. Digestion gastrique et pancréatique des protéines alimentaires 20
1.2. Absorption des peptides et des acides aminés par les entérocytes 21
1.3. Métabolisme des protéines dans le côlon 23
1.4. Flux d'azote endogène et exogène dans l'intestin 24
1.5. Métabolisation postprandiale des acides aminés 25
2. Besoin et apport protéique 29
2.1. Evaluation du besoin en protéines 29
2.2. Evaluation du besoin en acides aminés 31
2.3. Apports protéiques des populations européenne et française 35
3. Qualité nutritionnelle des protéines 38
3.1. Critères de qualité nutritionnelle 38
3.2. Effet de la source : protéines animales et végétales 43
3.3. Focus sur la protéine de pois 55
3.4. Facteurs limitants et enjeux méthodologiques de l'évaluation de la qualité des protéines . 59
4. Méthodes de mesure de la digestibilité *in vivo* 62
4.1. Mesure de la digestibilité au niveau fécal 62
4.2. Mesure de la digestibilité iléale des acides aminés en modèle animal 64
4.3. Estimation des pertes endogènes 66
4.4. Mesure de la digestibilité iléale des acides aminés chez l'Homme 71

Chapitre 2 – Travaux de thèse 79
1. Objectifs généraux 80
2. Méthodes utilisées 82
2.1. Production des protéines doublement marquées 82
2.2. Mesure de la digestibilité des protéines chez le rat et chez l'Homme 85
2.3. Méthodes analytiques 88
3. Articles 95
3.1. Article 1 : Évaluation multicritères de la qualité de la protéine de pois chez le rat : comparaison avec la caséine, le gluten et la protéine de pois seule ou supplémentée en méthionine 95
3.2. Article 2 : Utilisation de la digestibilité cæcale comme approximation de la digestibilité iléale des protéines chez le rat 117
3.3. Article 3 : Digestibilité iléale réelle des acides aminés de la protéine de pois en comparaison à la caséine chez l'Homme sain 135
3.4. Article 4 : Comparaison de la méthode double traceur à la méthode directe dans l'évaluation de la digestibilité iléale des acides aminés de la protéine de pois et de la caséine chez l'Homme 158

Chapitre 3 – Discussion 187
1. Qualité nutritionnelle de la protéine de pois et comparaison à d'autres sources 188
2. Méthodologie d'évaluation de la digestibilité iléale des protéines chez le rat 197
3. Développement de la méthode double traceur chez l'Homme 203

Conclusion 212
Références 215

Liste des figures

Figure 1. Émissions de GES pour 22 catégories d'aliments, exprimées en équivalent CO_2 par gramme de protéines. 14
Figure 2. A. Évolution de la demande mondiale journalière en protéines par habitant et prévisions à 2030. **B.** Évolution de la demande mondiale annuelle en protéines et prévisions à 2030 15
Figure 3. Évolution du taux de consommateurs de légumineuses en France entre 2015 et 2017..... 16
Figure 4. Mécanismes principaux de la digestion des protéines et de l'absorption des acides aminés 23
Figure 5. Flux azoté intestinal et échanges avec la circulation systémique 25
Figure 6. Voies métaboliques du bilan azoté 27
Figure 7. Principe de la méthode de l'oxydation de l'acide aminé indicateur (IAAO) 33
Figure 8. Comparaison du profil en acides aminés indispensables entre les sources de même famille (légumineuses et céréales) 45
Figure 9. A. Décomposition du flux d'azote iléal. **B.** Représentation schématique des digestibilités apparente, vraie, et standardisée 67
Figure 10. Principe de la méthode double traceur pour la mesure de la digestibilité des AA 74
Figure 11. Protocole de marquage des pois sur micro-parcelle 82
Figure 12. Protocole de marquage du lait 83
Figure 13. A. Enrichissement en ^{15}N des AA des isolats de pois et de caséine de l'étude clinique. **B.** Enrichissement en ^{2}H des AA des isolats de pois et de caséine de l'étude clinique 84
Figure 14. A. Représentation schématique de l'extrémité de la sonde naso-iléale. **B.** Radiographie de la sonde positionnée dans l'iléon terminal d'un volontaire 87
Figure 15. A. Plateau d'enrichissement en ^{13}C des AA plasmatiques. **B.** Plateau d'enrichissement en ^{2}H des AA plasmatiques 88
Figure 16. Fonctionnement simplifié de l'EA-IRMS 90
Figure 17. Fonctionnement simplifié du GC-C-IRMS 91
Figure 18. Exemple de chromatogramme obtenu après analyse GC-C-IRMS en mode carbone 92
Figure 19. Fonctionnement simplifié de l'UPLC 93
Figure 20. Exemple de chromatogramme obtenu après analyse U-HPLC 94
Figure 21. A. Digestibilités iléales des AA de la protéine de pois mesurées par la méthode double traceur et la méthode directe. **B.** Digestibilités iléales des AA de la caséine mesurées par la méthode double traceur et la méthode directe 205
Figure 22. Digestibilités iléales des AA estimées par la méthode double traceur dans les travaux de l'équipe du Pr Kurpad, Bangalore 209

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques des peptidases gastriques, intestinales et pancréatiques 21
Tableau 2. Besoin et référence nutritionnelle pour les protéines proposés par l'AFSSA (2007) selon les populations..... 31
Tableau 3. Acides aminés indispensables et non indispensables 32
Tableau 4. Estimation des besoins en acides aminés indispensables de l'adulte proposée par la FAO 34
Tableau 5. Estimation des besoins en acides aminés indispensables du nourrisson, de l'enfant et de l'adolescent proposée par la FAO 34
Tableau 6. Profils de référence en acides aminés indispensables recommandés par la FAO (nourrissons ; jeunes enfants ; enfants, adolescents, adultes) 39
Tableau 7. Composition en acides aminés et score chimique de sources animales et végétales de protéines, d'après les tables de données de la FAO 44
Tableau 8. Rétention azotée et valeur biologique de protéines alimentaires mesurées chez l'Homme et chez le rat. 46
Tableau 9. Digestibilité iléale ou fécale de l'azote et des acides aminés de diverses sources protéiques mesurée chez le rat, le porc ou l'Homme selon la méthode menée. Données issues de la littérature (liste non exhaustive) 48
Tableau 10. PDCAAS de sources végétales et animales de protéines issus de différentes études 52
Tableau 11. DIAAS de sources végétales et animales de protéines issus de différentes études 52
Tableau 12. Composition du pois *(Pisum sativum L.)* 55
Tableau 13. Structure, fonction et proportion des protéines principales du pois 56
Tableau 14. Composition en acides aminés (g AA/100 g protéine) des protéines de pois et de soja sous la forme de farine, concentré et isolat..... 58
Tableau 15. Composition en acides aminés du flux iléal d'azote endogène déterminée chez le rat, le porc et l'Homme nourris par un régime protéiprive..... 71
Tableau 16. Récapitulatif des travaux menés pour chaque article rédigé 81
Tableau 17. Composition en acides aminés indispensables et score chimique des isolats de protéines de pois et de caséine étudiés dans le cadre des travaux de thèse 189
Tableau 18. Digestibilités vraies de l'azote et des AA obtenues pour la protéine pois et la caséine au cours des expérimentations animale et clinique des travaux de thèse 192
Tableau 19. Bilan des données obtenues au cours des travaux de thèse - critère de qualité protéique selon la source évaluée, chez le rat et chez l'Homme 214

Abréviations

AA	Acide Aminé			
	Ala	Alanine	Ile	Isoleucine
	Arg	Arginine	Leu	Leucine
	Asn	Asparagine	Lys	Lysine
	Asp	Aspartate	Met	Méthionine
	Asx	Asn + Asp	Phe	Phénylalanine
	Cys	Cystéine	Pro	Proline
	Gln	Glutamine	Ser	Sérine
	Glu	Glutamate	Thr	Thréonine
	Glx	Gln + Glu	Trp	Tryptophane
	Gly	Glycine	Tyr	Tyrosine
	His	Histidine	Val	Valine
AAA	Acide Aminé Aromatique			
AAI	Acide Aminé Indispensable			
AANI	Acide Aminé Non Indispensable			
AAS	Acide Aminé Soufré			
ACE-1	*Angiotensin Converting Enzyme-1* (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-1)			
AIA	Cendres Insolubles dans l'Acide (*Acid Insoluble Ashes*)			
AID	Digestibilité Iléale Apparente (*Apparent Ileal Digestibility*)			
Anses	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail			
AP	Atome Pourcent			
APE	*Atom Percent Excess* (Excès d'enrichissement)			
AUC	*Area Under Curve* (Aire Sous la Courbe)			
Cr_2O_3	Oxyde de chrome			
Da	Dalton			
DAAO	Direct Amino Acid Oxydation			
DIAAS	*Digestible Indispensable Amino Acid Score*			
E%	Pourcentage de l'Energie			
EA	*Elementary Analyzer* (Analyseur Elémentaire)			
EFSA	*European Food Safety Authority* (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)			
EHC	*Enzyme-Hydrolyzed Casein* (Caséine Hydrolysée par une Enzyme)			
ET	Écart-Type			
FAO	*Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)			

GC-C-IRMS	*Gas Chromatography Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry* (Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse)
GES	Gaz à Effet de Serre
IAAO	*Indicator Amino Acid Oxidation* (Oxydation de l'Acide Aminé Indicateur)
IRMS	*Isotopic Ratio Mass Spectrometry* (Spectrométrie de Masse à Rapport Isotopique)
m.p	Matière protéique
m.s	Matière sèche
m/z	Rapport masse/charge
NA	Non Applicable
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (*WHO - World Health Organization*)
PANDiet	*Probability of Adequate Nutrient Intake* (Probabilité d'Adéquation d'Apports en Nutriments)
pc	Poids corporel
PDCAAS	*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*
PEG	Polyéthylène Glycol
PER	*Protein Efficiency Ratio* (Coefficient d'Efficacité Protéique)
PNNS	Programme National Nutrition Santé
PNNS-GS	Programme National Nutrition Santé Guideline Score
PSP	Phénolsulfonephtaléine (rouge de phénol)
RN	Référence Nutritionnelle
SC	Score Chimique
SEM	*Standard Error of the Mean* (Erreur Standard de la Moyenne)
SID	Digestibilité Iléale Standardisée (*Standardized Ileal Digestibility*)
T0	Temps zéro
TCD	*Thermal Conductivity Detector* (Détecteur de Conductivité Thermique)
TF	Facteurs de Transamination
TID	Digestibilité Iléale Vraie (*True Ileal Digestibility*)
TiO_2	Dioxyde de titane
U-HPLC	*Ultra-High Performance Liquid Chromatography* (Chromatographie Liquide à Ultra-Haute Performance)
UPN	Utilisation Protéique Nette
UPPN	Utilisation Postprandiale Protéique Nette
USDA	United States Department of Agriculture
VB	Valeur Biologique

Contexte de réalisation de la thèse

Les travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA), affiliée à AgroParisTech, à l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE, anciennement INRA), et à l'Université Paris-Saclay. L'unité est située dans les locaux d'AgroParisTech à Paris (75005), et dirigée par Claire Gaudichon depuis 2018. Le projet a été intégré à l'équipe « Apport Protéique et Régulation du Métabolisme » (APReM), dirigée par Dalila Azzout-Marniche.

Cette thèse été menée dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (dispositif CIFRE) avec l'industrie agroalimentaire Roquette, qui a financé ces travaux. Le projet a été porté par le département R&D Nutrition & Health de Roquette, situé à Lestrem (62) et dirigé par Sergio Neves puis par Laetitia Guérin-Deremaux depuis janvier 2021.

La thèse a été encadrée par Claire Gaudichon et Juliane Calvez au sein de l'UMR PNCA, et par Laetitia Guérin-Deremaux et Catherine Lefranc-Millot au sein de Roquette.

Valorisation scientifique

Articles scientifiques

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Dalila Azzout-Marniche, Nadezda Khodorova, Juliane Calvez. **Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine**. *The British Journal of Nutrition.* 2020. https://doi.org/10.1017/S0007114520002883.

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Nadezda Khodorova, Stéphane Besançon, Juliane Calvez. **Cecal digestibility as an approximation of ileal protein digestibility evaluation in rats**. *En cours de soumission.*

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Gheorghe Airinei, Nadezda Khodorova, Robert Benamouzig, Pierre-Henri Pomport, Juliette Martin, Juliane Calvez. **Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans**. *En cours de soumission.*

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Gheorghe Airinei, Nadezda Khodorova, Robert Benamouzig, Pierre-Henri Pomport, Juliette Martin, Juliane Calvez. **Comparison of dual tracer and ileal sampling methods in the assessment of amino acid digestibility of pea protein and casein in humans**. *Journal à définir.*

Communications affichées

Florence M. Guillin, Juliane Calvez, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Dalila Azzout-Marniche, Nadezda Khodorova, Claire Gaudichon. **Indices de qualité nutritionnelle d'un isolat de protéines de pois seul ou complémenté chez le rat**. *Journées Francophones de Nutrition*. Nice (France). 28-30 novembre 2018.

Florence M. Guillin, Juliane Calvez, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Nadezda Khodorova, Claire Gaudichon. **Nitrogen and amino acid digestibility of a pea protein isolate in rats, comparison with casein and gluten**. *Infogest 2019*. Granada (Espagne). 02-04 avril 2019.

Florence M. Guillin, Juliane Calvez, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Nadezda Khodorova, Claire Gaudichon. **Nitrogen and amino acid digestibility of a pea protein isolate in rats, comparison with casein and gluten**. *Nutrition 2019*. Baltimore (USA). 08-11 juin 2019.

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Nadezda Khodorova, Stéphane Besançon, Juliane Calvez. **Comparaison de trois méthodes de mesure de la digestibilité iléale vraie des protéines chez le rat**. *JFN 2019*. Rennes (France). 27-29 novembre 2019.

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Gheorghe Airinei, Nadezda Khodorova, Robert Benamouzig, Pierre-Henri Pomport, Juliette Martin, Juliane Calvez. **La biodisponibilité des acides aminés d'un isolat de pois chez l'Homme n'est pas différente de celle de la caséine**. *JFN 2020*. Virtuel. 25-27 novembre 2020. Prix de Communication NUTRIENTS.

Communications orales

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Gheorghe Airinei, Nadezda Khodorova, Robert Benamouzig, Pierre-Henri Pomport, Juliette Martin, Juliane Calvez. **Real ileal amino acid digestibility of pea protein isolate as compared to casein in healthy adult humans**. *Nutrition 2021.* Virtuel. 07-10 juin 2021.

Florence M. Guillin, Claire Gaudichon, Laetitia Guérin-Deremaux, Catherine Lefranc-Millot, Gheorghe Airinei, Nadezda Khodorova, Robert Benamouzig, Pierre-Henri Pomport, Juliette Martin, Juliane Calvez. **Comparison of dual isotope and ileal sampling methods for the determination of the amino acid digestibility of pea protein and casein in adult humans**. *Nutrition 2021*. Virtuel. 07-10 juin 2021.

Introduction générale

Face à l'augmentation de la population mondiale, qui devrait avoisiner les 9 milliards en 2050 [1], les systèmes de production alimentaires doivent être adaptés pour répondre aux enjeux de l'alimentation durable. En effet, le défi actuel consiste à fournir à l'ensemble de la population des régimes alimentaires sains et culturellement acceptables, issus de systèmes de production minimisant l'impact environnemental et économiquement viables [2]. L'apport en protéines occupe une place importante dans ces préoccupations, leurs sources étant nombreuses, et les productions animales ayant un impact environnemental global plus important que les sources végétales [3]. Par exemple, la production de viande issue des ruminants (bœuf et agneau) entraîne des émissions de gaz à effet de serre (GES) 250 fois supérieures à celles des légumineuses, ramenées à la quantité de protéines (**Figure 1**) [4].

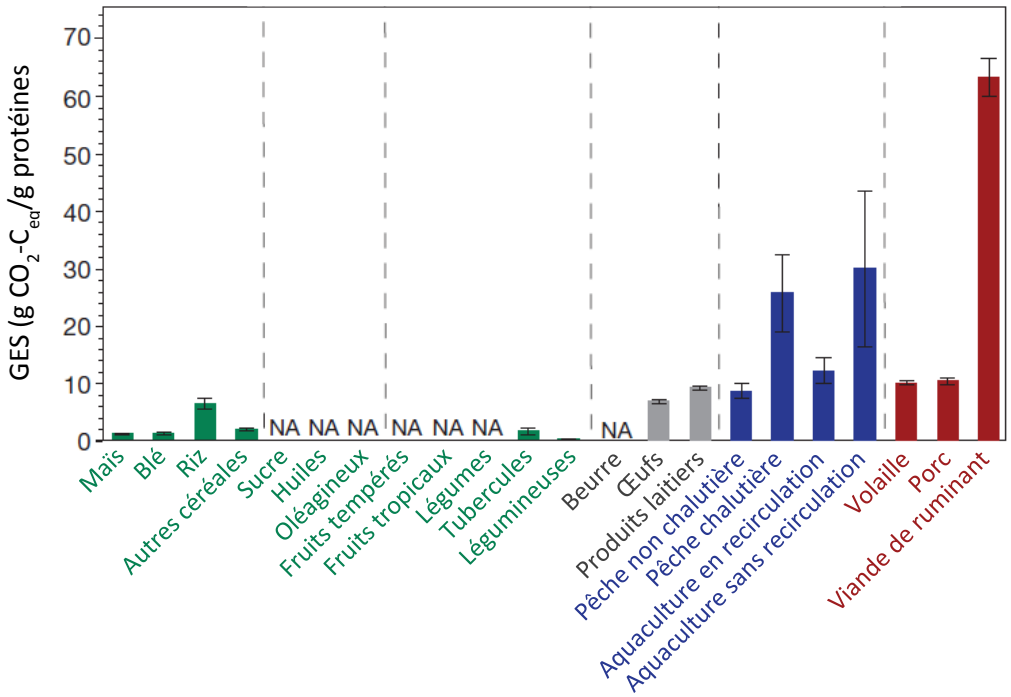

Figure 1. Émissions de GES pour 22 catégories d'aliments, exprimées en équivalent CO_2 par gramme de protéines. D'après Tilman *et al.* [4] Les valeurs sont les moyennes ± SEM. NA : non applicable

La demande mondiale en protéines connait une forte croissance depuis les années 1960 (**Figure 2**). Elle s'accentuera dans les prochaines décennies, suite notamment au développement économique des continents africain et asiatique. La FAO prévoit une hausse de 40% entre 2010 et 2030, qui concernera à la fois les sources animales (+33%) et végétales (+43%) [5]. Les végétaux (céréales, légumineuses, fruits à coque) fournissent 65 à 70% de l'apport protéique mondial alors que dans les pays

économiquement développés, il est majoritairement d'origine animale (viandes, poissons, œufs) [6]. En France, la majorité de l'apport en protéines est fournie par les produits animaux et les végétaux comptent pour 30%, d'après l'étude INCA3 [7]. Or, une consommation importante de viande rouge et de produits carnés transformés a été associée à un risque accru de cancer colorectal [8–10] et de maladies cardiovasculaires [11–14]. Au contraire, une alimentation riche en sources végétales diversifiées s'accompagnerait de bénéfices santé, comme la réduction du risque de diabète de type II, et d'un impact positif sur la mortalité [15–20].

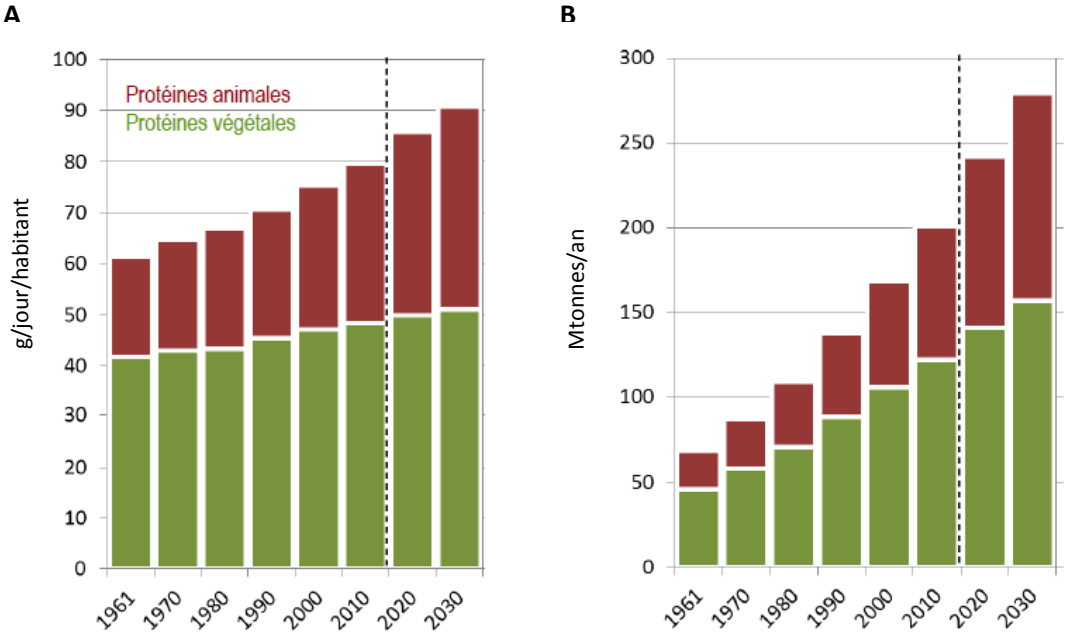

Figure 2. A. Évolution de la demande mondiale journalière en protéines par habitant et prévisions à 2030. **B.** Évolution de la demande mondiale annuelle en protéines et prévisions à 2030. D'après le rapport Sofiprotéol-BIPE basé sur les données de la FAO [5].

Face aux constats environnementaux et aux données de santé publique, il a été recommandé d'équilibrer l'apport protéique à 50% de produits végétaux, ce qui implique de proposer des alternatives végétales aux sources animales de protéines [3,4]. Les légumineuses ont été identifiées comme des leviers de cette transition alimentaire. Elles comprennent des oléagineux (soja), des protéagineux (pois, féveroles, lupins), et des légumes secs (haricots, pois chiches, lentilles). Leur avantage nutritionnel est basé sur leur richesse en protéines (de 20 à 40% m.s selon les sources), en fibres, et en micronutriments, ainsi que sur leur faible teneur en matières grasses [21]. De plus, leur culture permet de réduire les apports azotés, qui contribuent à 25% des émissions de GES de l'agriculture dans l'Union Européenne, grâce à la symbiose de son système racinaire avec les bactéries du genre *Rhizobium* [22,23]. Elles améliorent également le rendement de la culture qui la suit. Même si

les légumineuses sont pour l'instant peu attractives pour les ménages français [7,24], le taux de consommateurs est en hausse (**Figure 3**) [25]. Ainsi, la consommation de légumineuses devrait suivre la tendance mondiale, dont la progression est estimée à +1,9% par an d'ici 2029, d'après les prévisions de l'OCDE et de la FAO [26].

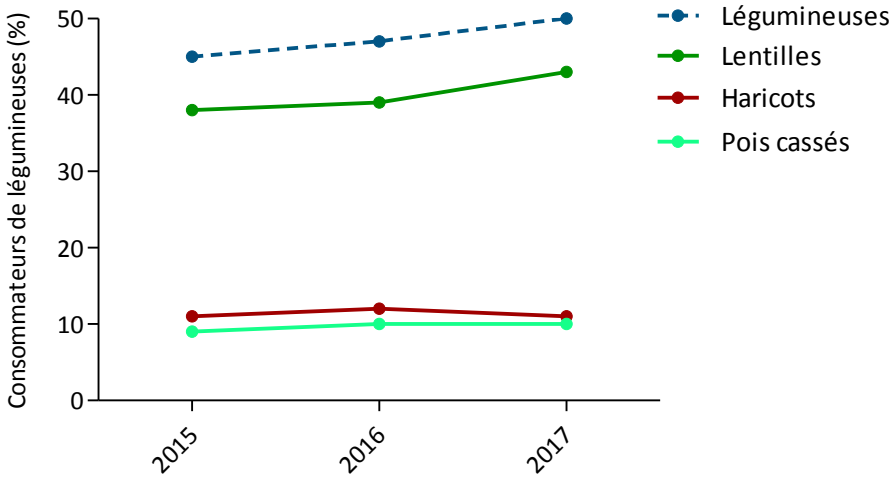

Figure 3. Évolution du taux de consommateurs de légumineuses en France entre 2015 et 2017. Reproduit d'après les données de FranceAgriMer [25].

Depuis 2019, une stratégie a été lancée pour accroître l'autonomie en protéines végétales de la France, qui est de 55% actuellement. Elle passe par la structuration des filières protéines végétales, annoncée par le plan « France relance 2020-2022 », qui prévoit d'augmenter la culture de légumineuses [27]. Un budget devrait également être alloué à la recherche et développement sur les variétés de légumineuses, et à des mesures d'innovation afin de mieux les valoriser et d'encourager leur consommation. Les surfaces de légumineuses cultivées ont en effet fortement diminué en France depuis les années 1990, du fait du manque de compétitivité par rapport au soja importé, majoritairement du Brésil. Sur les 14 millions d'hectares consacrés aux grandes cultures, les oléagineux (dont le soja) représentent 15,3%, les protéagineux (pois, féveroles, lupins) 1,7%, et les légumes secs (lentilles, pois chiches) 0,5%, les plus produites étant le pois et le soja [28]. En comparaison, les céréales comptent pour près de 68% des terres cultivées.

Le pois est une légumineuse particulièrement intéressante pour sa teneur en protéines de 24% m.s [29] (deux fois plus que le blé complet et trois fois plus que le riz), et son absence de la liste des allergènes soumis à déclaration, contrairement au soja [22]. La production française de pois a atteint 620 000 tonnes en 2019 et représentait 52% de la production nationale de légumineuses, d'après

FranceAgriMer. Seulement 26% de la production était consacrée à la consommation humaine, la majorité étant destinée à l'alimentation animale. La demande mondiale de la protéine de pois connaît actuellement une forte hausse, avec un chiffre d'affaires anticipé à 313,5 millions de dollars d'ici 2025, soit 3 fois sa valeur actuelle [30]. Elle est utilisée par l'industrie agroalimentaire et incorporée dans des produits à destination de la nutrition spécialisée (sportive, médicale et diététique), ou dans les substituts végétaux de viande [31].

La qualité nutritionnelle n'est pas équivalente entre les différentes protéines. Malgré l'attrait actuel pour les protéines végétales, elles sont réputées être nutritionnellement moins qualitatives que les sources animales [32,33]. Elles varient notamment en termes de composition en acides aminés indispensables et de digestibilité. La digestibilité est définie comme la part d'acides aminés absorbée relativement à la part ingérée. Elle se détermine généralement par la mesure des pertes digestives d'azote suite à l'ingestion de la protéine à étudier. L'évaluation de la digestibilité en recherche en nutrition humaine est menée sur l'Homme, le porc ou le rat, suivant cet ordre de préférence [34]. En 2013, la FAO a recommandé d'évaluer la digestibilité individuellement pour chaque acide aminé, entraînant un changement du site de recueil des pertes digestives [34]. Dans ce cas, les pertes ne se mesurent plus dans les fèces mais dans l'iléon [35], la partie terminale de l'intestin grêle, car l'activité métabolique du microbiote colique utilise et transforme les acides aminés [36]. Cette transition de digestibilité fécale à digestibilité iléale a été suivie par la mise en place du *Digestible Indispensable Amino Acid Score* (DIAAS) en tant qu'indice de qualité des protéines alimentaires.

L'évaluation de la digestibilité au niveau iléal est soumise à des difficultés méthodologiques chez le rat et chez l'Homme. Chez le rat, il est impossible d'utiliser une canule digestive, similairement au protocole mené chez le porc [37]. Les digesta iléaux du rat sont collectés par euthanasie et dissection, ce qui empêche un recueil continu des pertes au cours du processus de digestion. En clinique, la mesure directe des pertes d'acides aminés nécessite de recueillir les digesta iléaux à l'aide d'une sonde, très invasive pour les volontaires et inadaptée pour les populations vulnérables (enfants et personnes âgées notamment). Au vu du contexte actuel qui nécessite que de nombreuses nouvelles sources de protéines soient évaluées, il est essentiel de développer les méthodes de mesure de la digestibilité, afin de faire face à ces problématiques [38,39]. Un regain d'intérêt pour l'évaluation de la digestibilité des acides aminés a ainsi été observé ces 5 dernières années, et s'est manifesté par des développements méthodologiques au sein des différents modèles d'études [40]. Chez l'Homme, une nouvelle méthode indirecte dite « double traceur » a été proposée par la FAO. Elle permettrait, une fois validée, d'estimer la digestibilité iléale des AA par des prélèvements plasmatiques à l'aide de traceurs isotopiques, sans recueillir le contenu iléal [38]. Des études récentes ont mis en œuvre la

méthode double traceur dans l'évaluation de diverses sources protéiques, animales comme végétales [41–45]. Cependant, aucune étude publiée ne la compare à la mesure directe de la digestibilité iléale des acides aminés, par le prélèvement des digesta.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet de thèse était double. Dans un premier temps, notre but était d'évaluer la qualité nutritionnelle de la protéine de pois, chez le rat et chez l'Homme, en comparaison à d'autres sources de protéines, la caséine de lait et le gluten de blé. Cette évaluation reposait sur la mesure de la digestibilité iléale des acides aminés, le calcul du DIAAS, et quelques critères supplémentaires de qualité protéique. Dans un second temps, nos travaux avaient pour objectif de développer les méthodes de mesure de la digestibilité iléale des acides aminés, chez le rat et chez l'Homme. Il s'agissait notamment de comparer la méthode plasmatique double traceur à la méthode directe, impliquant le recueil des digesta par intubation.

Le premier chapitre du manuscrit est consacré à une analyse bibliographique, qui aborde les thèmes du métabolisme protéique, du besoin et de l'apport protéique, de la qualité nutritionnelle des protéines, et des méthodes d'évaluation de la digestibilité *in vivo*. Après un descriptif de la méthodologie suivie et des techniques mises en œuvre, les travaux menés sont présentés sous la forme de 4 articles scientifiques, dont l'un est publié, et les autres en cours de soumission. Ce manuscrit s'achève par une discussion générale et les conclusions tirées de ces travaux.

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Métabolisme protéique

Les protéines constituent un macronutriment indispensable assurant les apports en azote et en acides aminés de l'organisme. Elles possèdent de nombreuses fonctions : structurale, enzymatique, hormonale, immunitaire, de transport etc. Chez l'Homme adulte, le compartiment protéique représente environ 8% du poids corporel, la contribution majoritaire étant le muscle squelettique [46]. Malgré leur grand nombre, la moitié peut être représentée par quatre protéines : la myosine, l'actine, le collagène et l'hémoglobine. Les protéines corporelles sont en renouvellement constant par des processus biochimiques associant synthèse et catabolisme protéique. Ainsi, l'apport azoté de l'adulte en bonne santé doit fournir les acides aminés nécessaires au renouvellement des protéines et en quantité suffisante pour compenser les pertes et assurer un bilan azoté équilibré. Les protéines ingérées sont hydrolysées par les enzymes digestives et libèrent les acides aminés, qui sont absorbés par les entérocytes de l'intestin grêle et libérés dans la veine porte. La part non retenue par les tissus splanchniques intègre le pool d'acides aminés libres plasmatiques, qui assure le rôle de précurseur de la synthèse protéique.

1.1. Digestion gastrique et pancréatique des protéines alimentaires

La digestion des protéines débute dans l'estomac sous l'action conjuguée de l'acide chlorhydrique et des pepsines. L'acide chlorhydrique sécrété par les cellules pariétales permet la dénaturation des protéines sous l'effet du pH, ce qui facilite l'accès des protéases à leurs liaisons peptidiques. Il permet également d'activer le précurseur de la pepsine, le pepsinogène, donc l'activation se poursuit par autocatalyse. La pepsine est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons impliquant des acides aminés aromatiques ou ramifiés, et transforme ainsi les protéines en peptides [47]. La digestion gastrique des protéines n'est que partielle (10 à 15% des protéines ingérées [48]) car le pouvoir tampon du bol alimentaire maintient le pH intragastrique à des valeurs supérieures à 5 alors que l'activité de la pepsine est optimale entre pH 2 et pH 4 et inhibée au-delà de pH 5 [49]. Ainsi, l'estomac permet essentiellement l'homogénéisation mécanique du bol alimentaire et la régulation de la libération du chyme dans le duodénum. La vitesse de la vidange gastrique n'a pas d'impact sur l'absorption globale des protéines et leur digestibilité [50–52] mais affecterait la cinétique d'absorption des acides aminés dans l'intestin grêle et leur devenir métabolique [53].

La lumière duodéno-jéjunale accueille l'étape déterminante de la digestion enzymatique des protéines [46]. Le suc pancréatique excrété par le sphincter hépatopancréatique neutralise l'acidité du chyme en

sortie gastrique par la libération de bicarbonate. Il fait également intervenir des peptidases, qui se subdivisent en deux catégories selon leur site de coupure. Les endopeptidases (trypsine, chymotrypsine, élastase) ciblent les liaisons internes de la chaîne peptidique. Les exopeptidases complètent leur action par l'hydrolyse des extrémités, libérant l'acide aminé en position N-terminale (aminopeptidase) et en position C-terminale (carboxypeptidase). La majorité des peptidases clivent la chaîne en une position précise, selon la nature du site adjacent de liaison du substrat (**Tableau 1**). La trypsine est issue de l'activation du trypsinogène par une entérokinase de la bordure en brosse des entérocytes et active ensuite les autres enzymes. L'activité des peptidases est optimale entre pH 8 et pH 9 et mène à la libération d'oligopeptides de 2 à 8 acides aminés (70%) et d'acides aminés libres (30%) [48]. Ces oligopeptides sont pris en charge par les aminopeptidases de la bordure en brosse et hydrolysés en acides aminés, di- et tripeptides prêts à être absorbés [54].

Tableau 1. Caractéristiques des peptidases gastriques, intestinales et pancréatiques, reproduit d'après Goodman *et al.*, 2010 [55]

Enzyme	Action	Points de clivage	Produits
Pepsine	Endopeptidase	Tyr, Phe, Leu, Asp	Grands peptides et acides aminés libres
Trypsine	Endopeptidase	Arg, Lys	Oligopeptides (2-6 acides aminés)
Chymotrypsine	Endopeptidase	Tyr, Trp, Phe, Met, Leu	Oligopeptides (2-6 acides aminés)
Elastase	Endopeptidase	Ala, Gly, Ser	Oligopeptides (2-6 acides aminés)
Carboxypeptidase A	Exopeptidase	Val, Leu, Ile, Ala en C-terminale	Acides aminés libres
Carboxypeptidase B	Exopeptidase	Arg, Lys en C-terminale	Acides aminés libres
Aminopeptidase	Exopeptidase	Extrémité N-terminale	Acides aminés libres

Malgré la grande efficacité de la protéolyse pancréatique, 5 à 10% de l'azote alimentaire reste sous forme de peptides et de protéines intactes [51,56,57]. Ce taux varie en fonction de la composition en acides aminés des protéines, de procédés technologiques tels que l'hydrolyse, l'extrusion, et le traitement thermique [58], ou de la présence de facteurs antinutritionnels inhibant l'action des protéases digestives [59,60] (cf. paragraphe 3.2).

1.2. Absorption des peptides et des acides aminés par les entérocytes

Les produits de la digestion pénètrent dans les entérocytes par transport actif secondaire. Les acides aminés sont majoritairement absorbés par cotransport avec le Na^+ [48], les transporteurs pouvant être

stéréospécifiques ou prendre en charge plusieurs groupes d'acides aminés. Les di- et tripeptides sont absorbés par l'intermédiaire de PEPT1 [61], un transporteur H^+-dépendant à large spécificité de substrat [62], et constituent la forme majoritaire de l'azote absorbé (> 50%) [63]. Ils sont transportés indépendamment des acides aminés libres et plus rapidement (rythme 70-80% supérieur) [54,64], suite à l'efficacité élevée de PEPT1 [65] et sa large expression dans l'intestin grêle [62]. Les peptides absorbés sont hydrolysés par les peptidases intracellulaires des entérocytes, libérant des acides aminés qui passent la membrane basale des cellules intestinales et rejoignent la circulation portale par des capillaires sanguins (**Figure 4**). Le rythme de digestion varie selon la source et la nature des protéines alimentaires, ainsi que leur environnement dans le repas, ce qui aboutit à des ratios entre peptides et acides aminés libres différents [66]. Ces variations entraînent des différences dans la mobilisation des transporteurs entérocytaires et s'étendent ainsi au rythme d'absorption des peptides et des acides aminés [67].

Environ 10% des acides aminés absorbés sont utilisés par les cellules intestinales pour leur propre métabolisme. Les entérocytes utilisent la glutamine, le glutamate et l'aspartate comme combustibles [68,69] pour répondre à leur besoin énergétique élevé induit par l'absorption des nutriments et le renouvellement cellulaire rapide de la couche épithéliale [70]. Les entérocytes occupent trois fonctions vis-à-vis des nutriments protidiques : 1) la digestion des oligopeptides au pôle apical par les enzymes de la bordure en brosse ; 2) le transfert des acides aminés, di- et tripeptides de la lumière intestinale vers le milieu intérieur ; 3) la transamination des acides aminés, restituant l'azote à l'organisme sous une forme d'échange (alanine, proline, citrulline). Des données suggèrent que l'utilisation intestinale de la glutamine est responsable d'une part importante de la production globale d'ammoniac dans l'organisme [71].

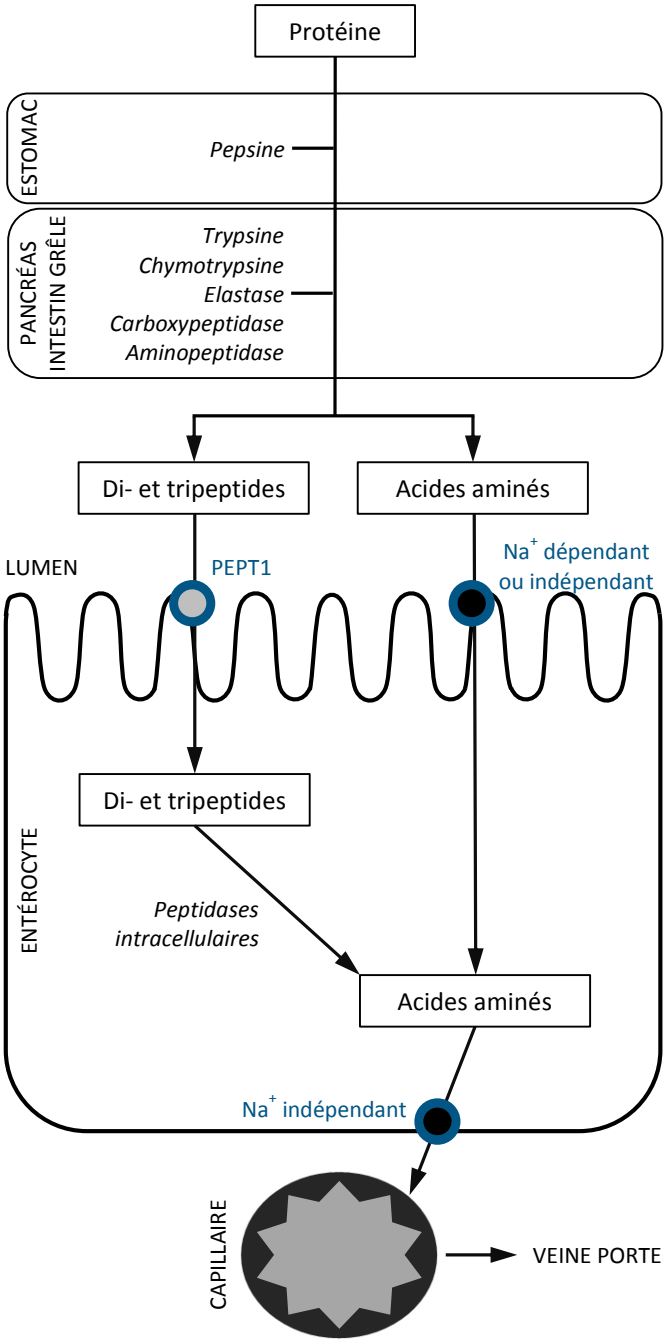

Figure 4. Mécanismes principaux de la digestion des protéines et de l'absorption des acides aminés

1.3. Métabolisme des protéines dans le côlon

Environ 12 à 18 g de protéines entrent dans le gros intestin chaque jour, soit 2 à 3 g d'azote présent sous forme d'urée, d'ammoniac, nitrate et acides aminés (10-15%), de protéines (48-51%) et de peptides (34-42%) [72]. L'azote colique est en majorité d'origine endogène et bactérienne [73,74] mais les niveaux d'azote alimentaire entrant dans le gros intestin restent significatifs et peuvent augmenter considérablement lors de l'ingestion de protéines peu digestibles [73,75]. En moyenne, 10% de l'azote

alimentaire n'est pas absorbé et atteint le côlon, où il est intégré à l'activité protéolytique du microbiote. Après hydrolyse par les protéases extracellulaires, les acides aminés libérés sont intégrés dans les protéines bactériennes ou catabolisés par transamination, désamination et décarboxylation. Ces réactions mènent à la production de métabolites bactériens dont des acides gras courte chaîne (acétate, propionate, butyrate), des acides organiques (formate, lactate, succinate), de l'éthanol et des gaz (H_2, CO_2) [36]. Les acides aminés alimentaires sont absorbés en majeure partie dans le duodénum et le jéjunum supérieur proximal [76], et leur absorption ne se poursuivrait pas dans la muqueuse colique [73,77,78]. Cependant, des études chez le porc suggèrent une potentielle capacité du côlon à absorber les acides aminés de manière limitée [77,79] mais un tel mécanisme n'a pas encore été mis en évidence chez l'Homme adulte [66,75].

Seulement 5% à 10% de l'azote alimentaire se retrouve excrété par les fèces et l'azote fécal n'est qu'un reflet inexact des protéines non digérées [80]. Les pertes fécales d'azote représentent 10 à 15 % des pertes totales (métaboliques + digestives) et diffèrent selon les acides aminés. Elles sont plus élevées pour la thréonine et la cystéine (30 à 40 % des pertes totales) du fait de leur teneur élevée dans les protéines des mucines digestives [81].

Par ailleurs, une partie de l'azote colique provient d'un recyclage de l'urée d'origine hépatique, estimé à 15 g par jour chez l'adulte [82]. Il est estimé que 25% de l'urée produite est utilisée par le côlon [83] et que ce mécanisme serait soumis à régulation. La proportion du flux de recyclage entéro-hépatique de l'azote augmente dans le cas de faibles apports en protéines [82,84,85] et possiblement lorsque la qualité des protéines alimentaires est moindre, afin de limiter les fuites d'azote sous forme d'urée [81].

1.4. Flux d'azote endogène et exogène dans l'intestin

Le flux d'azote intestinal se décompose entre intestin grêle (29 g N/jour) et côlon (20 g N/jour) [86]. Les échanges avec la circulation systémique sont différents selon le segment considéré. Les pertes azotées s'évaluent à environ 3 g N/jour en sortie d'iléon terminal et à 2 g N/jour dans les fèces (**Figure 5**).

La digestion des protéines alimentaires est généralement incomplète, mais l'alimentation n'est pas le contributeur majoritaire des pertes azotées digestives. Dans la lumière intestinale, les protéines alimentaires (80-100 g/jour) sont mêlées aux protéines endogènes (20-50 g/jour) [81]. L'azote endogène provient des enzymes salivaires, gastriques, biliaires et pancréatiques sécrétées au cours du processus de digestion (20-33 g), des cellules épithéliales intestinales desquamées (5-6 g), des pertes plasmatiques (albumine et immunoglobuline, 3-6g) et des protéines du mucus [36]. Environ la moitié se

trouve sous forme protéique, le reste étant constitué de peptides et d'acides aminés libres (cf. paragraphe 4.3).

La majorité de l'azote endogène est produit au niveau duodénal puis est réabsorbé à environ 80% avant la fin de l'intestin grêle, les pertes endogènes iléales pouvant être estimées à 18 g de protéines par jour [87]. Il est estimé chez l'Homme que le flux de protéines endogènes dans le duodénum varie de 0,7 g par heure à jeun [88] à 2 g par heure en phase postprandiale [50]. Il est réduit à moins d'1 g par heure dans l'iléon terminal suite à sa réabsorption dans les parties supérieures de l'intestin [89]. Le recyclage de l'azote endogène a également été étudié dans les modèles animaux, et s'estime à 90% chez le rat [90] et 88% chez le porc [91]. Les protéines microbiennes, qui constituent une proportion considérable de la matière protéique dans les digesta, sont généralement incluses dans la mesure des protéines endogènes [92]. Ainsi, les pertes d'azote et d'acides aminés provenant du tube digestif supérieur et délivrées dans le gros intestin sont quantitativement importantes et essentiellement d'origine endogène.

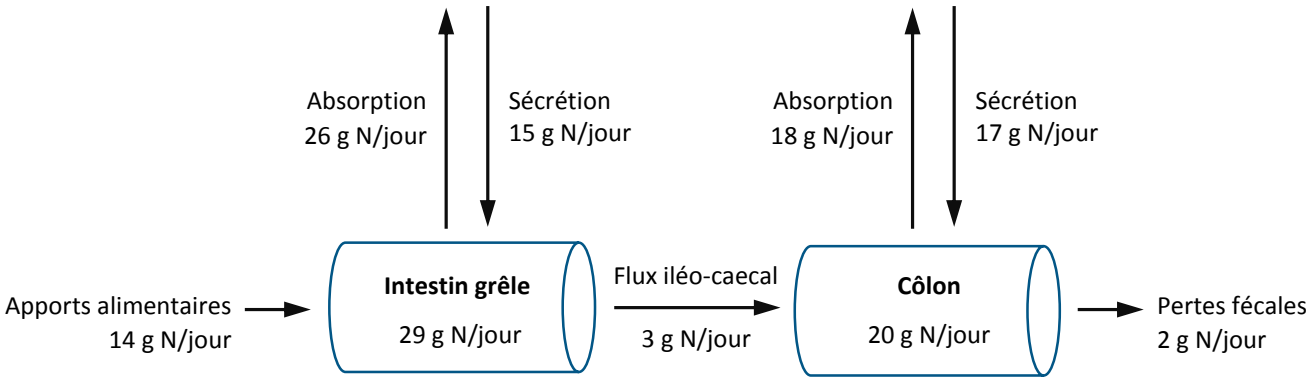

Figure 5. Flux azoté intestinal et échanges avec la circulation systémique, adapté de FAO 2007 [86]

1.5. Métabolisation postprandiale des acides aminés

Les acides aminés absorbés intégrés à la circulation portale atteignent le foie où ils sont en grande partie métabolisés et interconvertis, les produits de ce métabolisme rejoignant ensuite la circulation périphérique. Parmi les acides aminés absorbés captés par le foie, 57% sont catabolisés, 23% sont libérés dans la circulation sanguine et 20% sont utilisés pour ses propres synthèses, participant ainsi à l'extraction splanchnique [46].

Le compartiment protéique est de 10 à 12 kg chez l'Homme adulte de 70 kg, les protéines corporelles étant localisées en majorité dans le muscle squelettique (42%), la peau, les os, le sang (15%), et les

tissus splanchniques (10%) [81]. Elles subissent un renouvellement permanent par les processus de synthèse et de dégradation protéique, au rythme de 250 à 300 g par jour (3 g/kg/j). Les principaux flux du métabolisme protéique sont l'apport alimentaire des acides aminés indispensables et non indispensables, la synthèse protéique, la dégradation des protéines, l'oxydation des acides aminés, et la synthèse de novo des acides aminés non indispensables (**Figure 6**) [93].

Le compartiment des acides aminés libres est maintenu constant (80 g) et représente 1% de l'ensemble des acides aminés corporels. La majeure partie est intracellulaire (75 g environ) et l'autre fraction est extracellulaire (4 g environ, dont 2 g dans le plasma) [46]. Les acides aminés ont pour rôle principal d'être les précurseurs de la synthèse protéique. Parmi les vingt acides aminés protéinogènes, neuf sont qualifiés d'indispensables : histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine. Leur radical carboné ne peut pas être synthétisé par l'organisme à partir des précurseurs azotés ou carbonés (glucose, acides aminés non indispensables) et ils doivent être apportés par l'alimentation. Les processus de transamination assurent les interconversions entre acides aminés selon les besoins de l'organisme, à l'exception de la lysine et de la thréonine qui n'y participent pas.

L'azote excédentaire est excrété majoritairement par voie urinaire, qui représente 70 à 75% des pertes azotées de l'organisme, contre 25 à 30% pour les pertes intestinales et 1 à 5% pour les pertes subsidiaires (sueur, desquamation, cheveux, …) [81]. L'élimination de l'azote est assurée par le foie via le cycle de l'urée et par les reins sous la forme d'ammoniac, cette dernière étant la voie minoritaire. Le catabolisme des acides aminés est initié par la perte du groupement α-aminé par désamination ou transamination et la formation d'acide alpha-cétonique. L'ammoniac est transféré sur le glutamate, converti en glutamine, pour permettre son transport entre les organes sous une forme non-toxique. Dans le foie, l'ammoniac est récupéré à partir de la glutamine et intégré au cycle de l'urée. L'urée est formée à partir de la dégradation de l'arginine, de la citrulline, et de l'ornithine. Elle diffuse ensuite dans les compartiments liquidiens, dont la circulation sanguine, et est éliminée par les reins dans l'urine. Une part de l'urée produite (20-25%) peut également migrer jusqu'à la lumière intestinale colique et être dégradée par les uréases bactériennes en ammoniac, qui peut être réabsorbé. Ce mécanisme participe au recyclage de l'azote corporel, dont le rôle est non négligeable en cas de jeûne prolongé.

Le devenir des radicaux carbonés des acides aminés varie selon l'acide aminé et l'organe considéré. Ils peuvent être aminés, orientés vers les différentes voies du métabolisme énergétique

(gluconéogenèse, lipogenèse, cétogenèse) ou subir une oxydation complète via le cycle de Krebs menant à la production d'énergie et à la libération de CO_2 et H_2O.

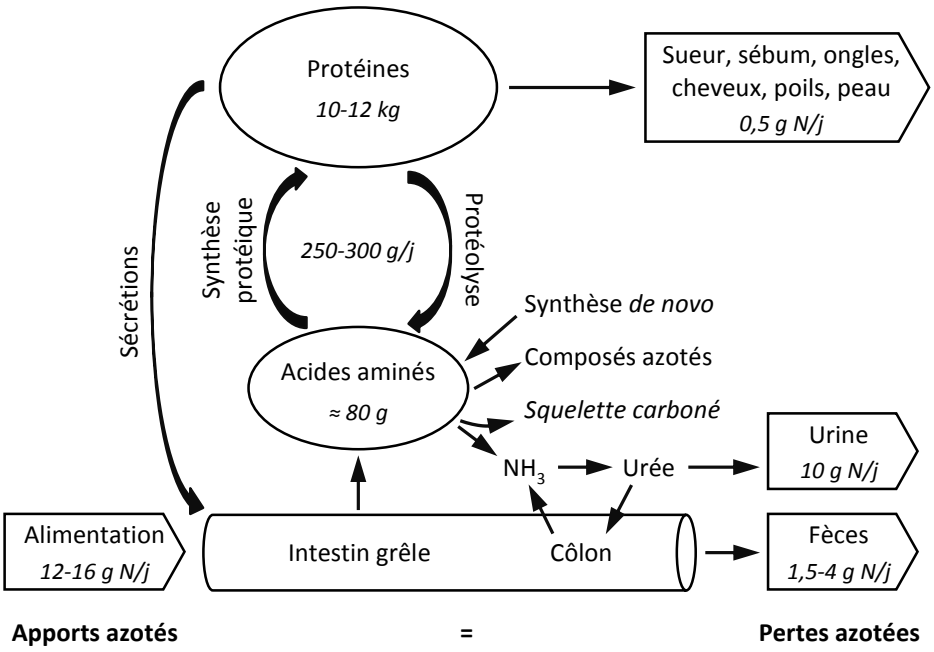

Figure 6. Voies métaboliques du bilan azoté. Reproduit d'après [81,93,94]

La régulation du métabolisme protéique fait intervenir de nombreux transferts d'azote entre organes qui permettent le recyclage de l'azote, particulièrement important en cas d'apports alimentaires insuffisants [95]. Les principaux intermédiaires sont la glutamine et l'alanine, qui représentent plus de 30% des échanges [46]. Les organes majoritairement impliqués sont le foie, l'intestin, le muscle, les reins et le cerveau. Le maintien d'un bilan azoté équilibré entre apports et pertes est assuré par des mécanismes hormonaux et nutritionnels (taux circulants d'acides aminés [96,97]), qui s'exercent de manière simultanée. L'organisme s'adapte aux variations de l'apport protéique par la régulation des pertes azotées [97,98] et des taux de synthèse protéique [99] et de protéolyse musculaire [100–102]. Les cycles journaliers sont ainsi marqués par l'alternance entre des phases de dépôt protéique par protéosynthèse à l'état nourri et des phases de mobilisation des réserves par protéolyse à l'état de jeûne. L'ensemble de ces mécanismes permet d'assurer la stabilité du pool d'acides aminés libres et de satisfaire les besoins azotés de l'organisme malgré les variations d'apports. La contribution des acides aminés alimentaires à ces flux est de 20 à 50% dans les pertes digestives, de 15 à 25% dans les voies d'oxydation, et de 30% dans les voies de synthèse [103].

Résumé métabolisme protéique

– –

Les protéines alimentaires et endogènes sont digérées par le tube digestif, absorbées sous forme de dipeptides, tripeptides et d'acides aminés, et rejoignent le compartiment des acides aminés libres après passage et extraction par les organes splanchniques. Les protéines corporelles sont en renouvellement permanent par des cycles de dégradation et de synthèse à partir du pool d'acides aminés libres, alimenté par l'azote ingéré ou par la dégradation des protéines fonctionnelles provenant majoritairement du tissu musculaire. Les acides aminés excédentaires sont désaminés et utilisés comme substrat énergétique ou éliminés dans les urines sous forme d'urée et d'ammoniac. Le maintien d'un bilan azoté équilibré est assuré par des mécanismes hormonaux et nutritionnels qui régulent les rythmes de synthèse et de dégradation protéique ainsi que les pertes oxydatives. L'étape déterminante de la digestion des protéines est la phase digestive contrôlant la libération des acides aminés dans le milieu interne. L'efficacité des peptidases intestinales peut être réduite par des paramètres liés à la matrice alimentaire et à la nature des protéines, menant à la persistance d'une part de protéines alimentaires non digérées. Ce flux exogène résiduel libéré dans le côlon est partiellement transformé en d'autres acides aminés ou métabolites par le microbiote, et l'azote fécal n'est qu'un reflet inexact des protéines non digérées. Le flux endogène représente une part prépondérante des pertes digestives d'azote et d'acides aminés. Ainsi, la qualité nutritionnelle d'une protéine ne se limite pas à sa composition en acides aminés et son évaluation doit également tenir compte des flux d'acides aminés générés dans les différents tissus de l'organisme à la suite de son assimilation.

2. Besoin et apport protéique

Le besoin protéique est défini comme l'apport minimal en protéines de bonne qualité permettant de maintenir l'équilibre azoté chez une personne en bonne santé, de composition corporelle normale et exerçant une activité physique modérée [86]. Il s'exprime en fonction du poids corporel (pc). La mesure du besoin en protéines est basée essentiellement sur l'équilibre du bilan azoté, les apports devant compenser les pertes. Chez les enfants et les adolescents, cette définition est complétée par le besoin additionnel de croissance pour la déposition protéique, variant selon la tranche d'âge considérée. Le besoin en protéines associe le besoin en azote et le besoin en acides aminés indispensables. Sa mesure est rendue délicate par l'intervention des mécanismes de régulation permettant à l'organisme de s'adapter aux variations d'apports protéiques et notamment aux privations.

2.1. Evaluation du besoin en protéines

Le besoin en protéines est évalué par les méthodes dites « du bilan azoté » et « factorielle ». L'azote alimentaire excédentaire est éliminé par désamination de manière immédiate et les produits de dégradation sont excrétés. Le bilan azoté est calculé par la différence entre les apports et les pertes, le besoin étant défini comme la quantité minimale à ingérer pour compenser les pertes. Elle consiste à mesurer l'excrétion azotée par les voies fécales, urinaires, dermiques ainsi que les pertes variées (cheveux, ongles…) chez des sujets recevant des apports protéiques croissants. Le besoin correspond au niveau d'apport qui entraîne un bilan azoté nul. Lorsque cette approche est appliquée chez l'individu en croissance, le critère recherché est un bilan positif. Cette méthode est limitée par le fait que plusieurs niveaux d'apports peuvent engendrer un bilan nul et que la mesure de l'intégralité des pertes est complexe. La méta-analyse de Rand *et al*., croisant les résultats d'un grand nombre d'études de bilan azoté sur des sujets adultes sains, définit l'apport protéique journalier permettant d'équilibrer le bilan à 0,66 g/kg pc [104]. Cette valeur a été acceptée par de nombreuses instances officielles comme la FAO ou l'ANSES en tant que référence officielle du besoin en protéines [86]. Le besoin en protéines est calculé comme une valeur moyenne (ou médiane) pour la population, avec sa variance. L'apport individuel adéquat a été défini comme le 97,5^{ème} centile de la distribution des besoins individuels, correspondant à la moyenne + 1,96 écart-type, le risque d'apport insuffisant étant ainsi réduit à moins de 2,5% [86]. Les références nutritionnelles sont exprimées en fonction du poids corporel, pour des sujets dont le poids se situe dans une fourchette acceptable pour leur taille (adultes) ou leur âge (enfants). Ainsi, après deux applications successives d'un coefficient de variation de 12,5% (variations

inter-études et interindividuelles), la référence nutritionnelle (RN) en protéines de l'adulte sain est fixé à 0,83 g/kg pc/jour [104].

La méthode factorielle permet de prédire le besoin protéique d'individus à des stades physiologiques particuliers, qu'elle définit comme la somme d'un besoin d'entretien et d'un besoin spécifique (croissance, grossesse, allaitement). L'évaluation du besoin d'entretien passe par la mesure des pertes azotées obligatoires lors d'un régime exempt de protéine, dit protéiprive. Ces pertes obligatoires correspondent à l'élimination de protéines constitutives de l'organisme (desquamation cutanée, pertes digestives et urinaires). Le besoin d'entretien est alors défini comme l'apport permettant de couvrir ces pertes, après correction par l'efficacité d'utilisation de l'azote ingéré, initialement fixée à 70% [105] et réévaluée à 47% en 2003 [104]. Les besoins spécifiques sont extrapolés de manière à soutenir le taux de déposition protéique des tissus nouvellement formés. Le besoin de croissance est estimé théoriquement à partir des courbes de gain pondéral, de la concentration en azote dans l'organisme et l'efficacité de son utilisation spécifique selon l'âge (66% avant 6 mois, 58% de 6 mois à 18 ans) [106]. Le besoin additionnel chez la femme enceinte est déterminé pour chaque trimestre de grossesse par le gain de poids moyen, correspondant au dépôt protéique total dans les tissus du fœtus et de la mère, avec application du taux d'efficacité d'utilisation de l'azote de 47%. Le besoin de lactation est calculé à partir de la concentration en protéines du lait maternel, du volume produit, et de l'efficacité d'utilisation de l'azote (47%). Les études de bilan azoté appliquées au sujet âgé rapportent des résultats très variables mais suggèrent que son besoin protéique serait plus élevé que celui des jeunes adultes [104]. En France, le besoin moyen des personnes âgées de plus de 60 ans est fixé à 0,8 g de protéines de bonne qualité par kg et par jour, menant à une RN de 1,0 g/kg pc/jour [81]. En 2007, l'AFSSA a également émis une référence de besoin protéique pour les athlètes confirmés dans les disciplines de force, estimée entre 1,3 et 1,5 g/kg pc/jour [81]. Le **Tableau 2** récapitule les profils de besoin en protéines formulés pour la population générale adulte et les populations aux besoins spécifiques.

Tableau 2. Besoin et référence nutritionnelle pour les protéines proposés par l'AFSSA (2007) selon les populations [81]

Population	Besoin protéique moyen (g/kg pc/j)	RN protéines (g/kg pc/j)	Prévalence d'inadéquation (%)
Nourrissons (0-3 ans)	0,76-1,80	0,94-2,60 *	0
Enfants (4-10 ans)	0,68-0,72	0,85-0,90	0
Adolescents (11-18 ans)	0,63-0,72	0,78-0,90	2-7 (filles)
Adultes	0,66	0,83	0,2 (femmes)
Femmes enceintes	0,65-0,73	0,82-1	ND
Femmes allaitantes	0,8	1,1	ND
Personnes âgées (> 60 ans)	0,8	1,0	3-5
Sportifs d'endurance **	1,0-1,1	1,2-1,4	ND
Sportifs de force **	1,1-1,2	1,3-1,5	ND

RN : Référence Nutritionnelle ; ND : Non déterminé

* La RN est de 10 g/j pour les enfants de 0 à 2 ans et de 12 g/j pour les enfants de 3 ans

** Valeurs basées sur les travaux de Tarnopolsky (2004) et Phillips (2004) [107,108]

2.2. Evaluation du besoin en acides aminés

Les vingt acides aminés entrant dans la composition des aliments sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Cependant, les acides aminés indispensables (**Tableau 3**) ne peuvent pas être synthétisés *de novo* ou ne sont pas produits à un rythme suffisant pour répondre aux besoins [109]. Parmi eux, les acides aminés strictement indispensables ne peuvent pas être obtenus par réamination de leur acide alpha-cétonique. Certains acides aminés sont qualifiés de conditionnellement indispensables car ils sont produits par l'organisme à partir des précurseurs indispensables mais leur synthèse peut être insuffisante sous certaines conditions physiologiques augmentant les besoins nets.

Tableau 3. Acides aminés indispensables et non indispensables [46]

Acides aminés indispensables		Acides aminés non indispensables	
Strictement indispensables	Indispensables	Conditionnellement indispensables	Non indispensables
Lysine Thréonine	Histidine Isoleucine Leucine Méthionine Phénylalanine Tryptophane Valine	Arginine Cystéine Glutamine Acide glutamique Tyrosine	Alanine Asparagine Proline Sérine Glycocolle Acide aspartique

Le besoin en acides aminés est la résultante du besoin net, défini par le remplacement des pertes par oxydation, et de la biodisponibilité, dont dépend leur efficacité d'utilisation par l'organisme. La biodisponibilité est définie comme la part d'acides aminés atteignant les voies métaboliques, après digestion et absorption, relativement à la part ingérée. Elle prend en compte l'activité métabolique des entérocytes et des hépatocytes qui modifient et retiennent une partie des acides aminés absorbés.

Les besoins en acides aminés ont été évalués par diverses méthodes, dont le bilan azoté [110] et des techniques basées sur leur vitesse d'oxydation, la plus couramment utilisée étant la méthode IAAO (Indicator Amino Acid Oxidation). Le marquage isotopique permet de suivre la métabolisation de l'acide aminé étudié ou d'un acide aminé indicateur. La méthode du bilan consiste à alimenter les sujets avec un régime équilibré répondant aux besoins à l'exception de l'acide aminé à étudier. Le déficit en un acide aminé indispensable ralentit la synthèse protéique et limite l'utilisation de tous les autres acides aminés, par augmentation de leur catabolisme. L'acide aminé déficitaire est qualifié de limitant, et le bilan azoté résultant est négatif. L'apport en cet acide aminé est augmenté progressivement et le besoin correspond au niveau d'apport permettant d'équilibrer le bilan. Cette approche est à l'origine des recommandations de la FAO de 1985 [111], même si l'on supposait dès cette époque que les valeurs de besoins obtenues étaient sous-estimées [86]. Par conséquent, la mesure du taux d'oxydation des acides aminés par des traceurs ^{13}C a supplanté la méthode du bilan azoté. La méthode IAAO repose sur le principe que le déficit en un acide aminé indispensable inhibe la synthèse protéique et entraîne l'augmentation de l'élimination des autres par oxydation [112,113]. Cette méthode indirecte consiste à mesurer les pertes oxydatives d'un acide aminé indicateur marqué au ^{13}C, en général la phénylalanine, à différents niveaux d'apport de l'acide aminé dont on veut mesurer le besoin. Ainsi, l'oxydation de l'indicateur est élevée tant que le besoin en l'acide aminé à tester n'est pas satisfait. Le besoin correspond alors au point d'inflexion du taux de production de $^{13}CO_2$ dans l'air expiré (**Figure 7**). Le besoin par la méthode de l'oxydation peut également être évalué par marquage

direct de l'acide aminé testé au carbone 13 dans le cadre de la méthode DAAO (Direct Amino Acid Oxydation). Sur le même principe, l'acide aminé à tester est limitant dans le régime et apporté en quantités croissantes. Le besoin en cet acide aminé est atteint lorsque son oxydation augmente, visible par une plus forte production de $^{13}CO_2$ expiré. Les résultats obtenus par les mesures d'oxydation mènent généralement à des besoins en acides aminés indispensables plus élevés que la méthode du bilan [46].

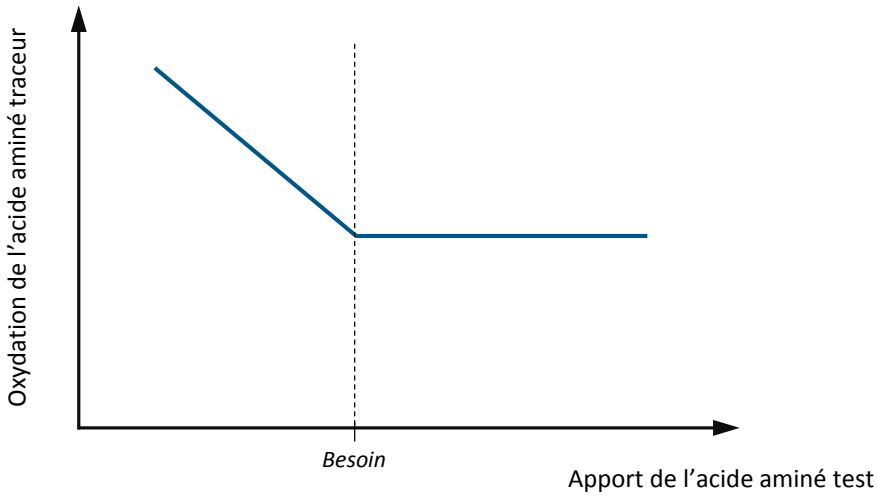

Figure 7. Principe de la méthode de l'oxydation de l'acide aminé indicateur (IAAO)

Ces méthodes isotopiques ont permis de réévaluer les besoins en acides aminés en 2007 [86], avec pour conséquence une augmentation des besoins pour tous les acides aminés indispensables par rapport aux données de 1985 [111]. Cependant, elles ne sont pas toujours concordantes et ne sont pas fiables pour certains acides aminés indispensables (histidine, isoleucine, acides aminés aromatiques). Des valeurs moyennes de besoin en acides aminés indispensables sont proposées dans le rapport OMS/FAO/UNU (2007, **Tableau 4**), les plus élevées étant atteintes pour la leucine et la lysine. Les besoins en acides aminés indispensables des nourrissons et des enfants ont été déterminés à l'aide de la méthode factorielle (**Tableau 5**), sur la base d'un besoin d'entretien et d'un besoin lié à la croissance [86,114]. Le besoin d'entretien est considéré identique à celui de l'adulte. Le besoin de croissance est estimé en fonction du taux moyen de déposition protéique dans les tissus selon la tranche d'âge, de la composition en acides aminés des protéines corporelles [115] et de l'efficacité d'utilisation des acides aminés (58% après 6 mois [106]). Les besoins en acides aminés indispensables diminuent avec l'âge, un facteur 2 étant observé entre les nourrissons (0,5 ans) et les adolescents (15-18 ans). La détermination des besoins en acides aminés est complexe et encore soumise à des incertitudes méthodologiques. Par conséquent, en l'absence de détermination fiable de la variabilité individuelle, il n'existe pas de RN

pour les acides aminés individuels à l'heure actuelle. Il est préférable de se baser sur la RN formulée pour les protéines corrigée par leur composition en acides aminés indispensables (cf. partie 3.) [6].

Tableau 4. Estimation des besoins en acides aminés indispensables de l'adulte proposée par la FAO [86]

Acide aminé	mg/kg pc/j	mg/g protéine *
Histidine	10	15
Isoleucine	20	30
Leucine	39	59
Lysine	30	45
AAS (Met + Cys)	15	22
Méthionine	10	16
Cystéine	4	6
AAA (Phe + Tyr)	25	38
Thréonine	15	23
Tryptophane	4	6
Valine	26	39
Total AAI	184	277

AAS : Acides aminés soufrés, AAA : Acides aminés aromatiques

* Pour un besoin moyen de 105 mg d'azote/kg/j (0,66 g protéine/kg/j)

Tableau 5. Estimation des besoins en acides aminés indispensables du nourrisson, de l'enfant et de l'adolescent proposée par la FAO [86]

Acide aminé	Besoin moyen selon l'âge (mg/kg pc/j)				
	0,5 an	1-2 ans	3-10 ans	11-14 ans	15-18 ans
Histidine	22	15	12	12	11
Isoleucine	36	27	23	22	21
Leucine	73	54	44	44	42
Lysine	64	45	35	35	33
AAS (Met + Cys)	31	22	18	17	16
AAA (Phe + Tyr)	59	40	30	30	28
Thréonine	34	23	18	18	17
Tryptophane	9,5	6,4	4,8	4,8	4,5
Valine	49	36	29	29	28

AAS : Acides aminés soufrés, AAA : Acides aminés aromatiques

2.3. Apports protéiques des populations européenne et française

Consommation de protéines

Les études de consommation montrent que de nombreuses populations ont un apport protéique largement supérieur aux recommandations établies à 0,83 g/kg pc/jour. Un recensement d'études de consommation réalisées sur 24 pays européens entre 1994 et 2010 a estimé les apports protéiques moyens des populations européennes adultes, qui s'étendent de 0,8 g/kg pc/jour pour l'Estonie à 1,25 g/kg pc/jour pour l'Italie [106]. Lorsqu'ils sont exprimés en pourcentage de l'énergie (E%), ils oscillent entre 12,3 E% pour la Bulgarie et 20 E% pour l'Espagne, des apports de 17 E% étant enregistrés pour la France. En France, l'étude INCA 3 sur les consommations et les habitudes alimentaires de la population menée sur 5800 sujets entre 2014 et 2015 indique que les protéines sont consommées à hauteur de 83 g/jour en moyenne [7]. L'apport protéique moyen des adultes français se chiffre à 16,8 E%, sans différence significative entre les hommes et les femmes. Il avoisine les 55 g/jour chez les enfants de 0 à 10 ans et contribue à 15 E%. L'apport protéique des adolescents de 11 à 17 ans est de 77 g/jour, représentant 9 à 20 E%.

Les dangers potentiels d'apports en protéines élevés sont peu documentés et aucune limite supérieure n'a été formellement identifiée [106]. Les risques identifiés à la consommation de protéines en excès sont l'insuffisance rénale, l'ostéoporose et le surpoids [6]. L'Anses qualifie d'« élevés » les apports protéiques situés entre 2,2 et 3,5 g/kg pc/jour et de « très élevés » les apports supérieurs à 3,5 g/kg pc/jour. Le niveau « très élevé » est lié à la capacité maximale d'uréogenèse, estimée à 22 mg d'azote uréique/heure/kg pc chez l'Homme adulte et atteinte pour un apport protéique autour de 3,5 g/kg pc/jour (40 E%) [116]. Le rapport OMS/FAO/UNU (2007) indique qu'il est peu probable que des apports deux fois supérieurs à la recommandation soient associés à un quelconque risque, mais conseille la prudence aux individus aux apports 3 à 4 fois supérieurs [86]. Il a été conclu que pour un individu adulte en bonne santé, des apports en protéines compris entre 0,83 et 2,2 g/kg pc/jour (environ 10 à 27 E%) seraient sans risque [106]. En France, l'Anses propose une limite supérieure à 20 E% [6], seuil au-delà duquel le risque de développement de surpoids n'est pas exclu, au vu de deux études épidémiologiques [117,118]. Cependant, le rôle spécifique des protéines n'est pas clair et une consommation protéique élevée peut s'associer à des facteurs confondants tels qu'un régime alimentaire déséquilibré.

Consommation des légumineuses

Les végétaux fournissent 65 à 70% de l'apport protéique mondial alors que leur contribution est beaucoup plus faible dans les pays les plus développés économiquement [6]. Les légumineuses (soja,

pois, lentille, haricot sec, lupin, fève…) sont de plus en plus valorisées en tant que sources végétales de protéines. En France, les produits végétaux représentent 30% de la consommation de protéines, les céréales étant le principal contributeur (40-70%) [7]. D'après l'étude INCA3 de 2014-2015, les légumineuses représentent 1% de l'apport protéique et seulement 14,7% des adultes français déclarent en consommer [7]. Leur consommation journalière chez les 18-79 ans se chiffre à 7,7 g/jour en moyenne (52,4 g/jour limitée aux seuls consommateurs), soit 0,5 E%, et représente 2,3% de l'apport en fibres. La consommation annuelle en France a été établie à 1,7 kg par personne en 2016 [7], contre 3,9 kg en moyenne européenne [27]. D'après les données FranceAgriMer de 2017, le pois cassé et le pois chiche représentent respectivement 10% et 4% de la consommation de légumineuses des ménages français. Le faible attrait pour les légumineuses s'expliquerait en partie par le manque d'investissement technologique pour proposer des produits attrayants et innovants pour cette catégorie d'aliments. Une représentation sociale négative et un manque de connaissance sur la manière de les cuisiner y participeraient également [24]. Néanmoins, la consommation de légumineuses augmente rapidement, et une hausse de 11% a été enregistrée en France entre 2015 et 2017 [25]. Des campagnes nationales ont été lancées pour fournir des informations sur les légumineuses et augmenter leur consommation [21,24]. Ainsi, le Programme National Nutrition Santé (PNNS) recommande de consommer des légumineuses à une fréquence de 2 fois par semaine [119] pour leur teneur élevée en protéines (20-40%) et en fibres.

Les sources de protéines dans le régime sont nombreuses et diverses, et toutes ne se valent pas en termes de qualité nutritionnelle. Ainsi, la satisfaction des besoins en acides aminés ne s'appréhende pas uniquement par les quantités consommées mais également par les sources qui constituent ces apports et leur qualité nutritionnelle.

Résumé besoin et apport protéique

– –

Le besoin en protéines de la population générale s'évalue par la méthode du bilan azoté, et correspond au niveau d'apport permettant d'équilibrer le bilan (apports – pertes = 0). Le besoin des populations particulières (croissance, grossesse, allaitement) se décompose en un besoin d'entretien et un besoin de déposition protéique, ce dernier étant calculé théoriquement pour chaque catégorie étudiée. Le besoin en acides aminés est évalué par la mesure de l'oxydation d'un acide aminé marqué au ^{13}C, qui peut être un acide aminé indicateur, généralement la phénylalanine ^{13}C. Le besoin correspond au niveau d'acide aminé pour lequel on observe un point d'inflexion du taux de production de $^{13}CO_2$ dans l'air expiré. Le besoin moyen en protéines est de 0,66 g/kg pc/jour et la référence nutritionnelle est fixée à 0,83 g/kg pc/jour pour un adulte en bonne santé. Les données sont insuffisantes pour fixer une limite supérieure de sécurité. Il n'existe pas de recommandation d'apports en acides aminés indispensables actuellement, dont la mesure des besoins est délicate et mène à des résultats variables entre les études. Les apports de la population française répondent largement au besoin en protéines. Les sources végétales ne fournissent que 30% de l'apport protéique en France. Les recommandations sont favorables à l'augmentation de la part végétale des apports en protéines, qui passe notamment par une plus forte consommation de légumineuses. Néanmoins, les sources de protéines ne sont pas équivalentes et la satisfaction des besoins doit prendre en compte la qualité nutritionnelle des protéines consommées.

3. Qualité nutritionnelle des protéines

La qualité d'une protéine dépend de sa capacité à fournir l'azote et les acides aminés. Son évaluation *in vivo* passe par des approches biochimiques ou physiologiques permettant d'étudier différents critères, tels que la composition en acides aminés indispensables, la digestibilité, la biodisponibilité des acides aminés, leur utilisation anabolique et leur impact sur les pools protéiques de l'organisme.

3.1. Critères de qualité nutritionnelle

Score chimique

Le premier déterminant de la capacité d'une protéine à soutenir la synthèse protéique est sa composition en acides aminés indispensable (AAI). Des profils de référence ont été définis selon la classe d'âge des individus en rapportant le besoin en chaque acide aminé indispensable (mg AAI/kg poids corporel/jour) au besoin moyen en protéines (g/kg poids corporel/jour). Le score chimique (SC) est un indice qui compare la teneur en acides aminés indispensable de la protéine étudiée avec le profil de référence. Ce dernier peut être assimilé à une protéine de référence, répondant exactement aux besoins en acides aminés indispensables lorsque son apport correspond au besoin protéique moyen de la tranche d'âge sélectionnée (0,66 g/kg poids corporel/jour pour les adultes). Le ratio entre la composition de la protéine étudiée et la référence est calculé pour chaque acide aminé indispensable, et le SC correspond à la valeur la plus faible. A titre d'exemple, un SC de 1,2 indique que la protéine apporte tous les acides aminés indispensables en excès et le plus limitant en quantité 20% supérieure au besoin. Un SC de 0,8 signifie qu'au moins un des acides aminés indispensables est apporté en quantité insuffisante, le plus limitant présentant un déficit de 20%. Ainsi :

$$\text{Ratio AAI}_i = \frac{\text{mg AAI}_i \text{ dans 1 g de la protéine testée}}{\text{mg AAI}_i \text{ dans 1 g de la protéine de référence}}$$

$$\text{SC} = \text{Ratio AAI le plus faible}$$

Les profils de référence sont élaborés à partir des besoins en acides aminés, dont la détermination est complexe. Comme évoqué précédemment, ils font l'objet d'incertitudes méthodologiques. En 2013, la FAO a proposé trois profils de protéine de référence sur la base des besoins réévalués en 2007 [86] (**Tableau 6**) : nourrissons (moins de 6 mois), enfants (6 mois à 3 ans), et individus de plus de 3 ans (enfants, adolescents, adultes) [34].

Tableau 6. Profils de référence en acides aminés indispensables recommandés par la FAO (nourrissons ; jeunes enfants ; enfants, adolescents, adultes) [34]

Groupe d'âge	mg/g protéine recommandée								
	His	Ile	Leu	Lys	AAS	AAA	Thr	Trp	Val
Nourrissons (0 - 6 mois)	21	55	96	69	33	94	44	17	55
Enfants (6 mois - 3 ans)	20	32	66	57	27	52	31	8,5	43
Enfants, adolescents, adultes (> 3 ans)	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40

La deuxième approche pour évaluer la qualité nutritionnelle d'une protéine est liée à l'efficacité d'utilisation de l'azote par l'organisme. Elle peut se limiter à la phase digestive (digestibilité), à la phase métabolique (valeur biologique) ou combiner les composantes digestives et métaboliques (rétention azotée).

Digestibilité

La digestibilité désigne la proportion de l'apport alimentaire mise à disposition de l'organisme après digestion et absorption. Elle peut s'appliquer à la protéine entière ou à chaque acide aminé de manière individuelle. Elle peut être évaluée *in vitro* par des modèles statiques ou dynamiques qui visent à reproduire les phases orale, gastrique, et intestinale du processus de digestion. Les modèles dynamiques sont plus proches de la complexité du système digestif [120,121]. Ils miment en temps réel l'injection d'enzymes digestives dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal tout en régulant le pH, et permettent l'écoulement des aliments par reproduction des forces mécaniques du péristaltisme. *In vivo*, la digestibilité est obtenue par le ratio entre la quantité d'azote ou d'acides aminés absorbée relativement à la quantité ingérée, l'absorption étant calculée par la différence entre l'ingestion et les pertes digestives. Le point central repose sur l'évaluation des pertes digestives, qui peuvent être mesurées dans les fèces ou à la fin de l'intestin grêle (iléon). La mesure des pertes d'azote au niveau fécal était la méthode conventionnelle jusqu'à ce que la FAO recommande en 2013 d'évaluer la digestibilité individuellement pour chaque acide aminé [34]. En effet, la digestibilité des acides aminés se mesure au niveau iléal pour s'affranchir de l'activité du microbiote colique, qui utilise et transforme les acides aminés alimentaires non absorbés par l'intestin grêle [35]. La digestibilité iléale est généralement plus faible que la digestibilité fécale, qui sous-estime les pertes digestives [37]. Cet écart est réduit (2 à 3%) pour les protéines de haute qualité nutritionnelle, mais est plus important (> 10%) pour les protéines peu digestibles [122] (cf. partie 4.).

Les pertes d'azote endogènes doivent être évaluées et retranchées des pertes totales pour calculer la digestibilité vraie (cf. paragraphe 4.3), à la différence de la digestibilité apparente qui s'affranchit de cette distinction :

$$\text{Digestibilité apparente} = \frac{I - P}{I} \times 100$$

$$\text{Digestibilité vraie/réelle} = \frac{I - (P - Pe)}{I} \times 100$$

Où I = azote ingéré, P = pertes azotées fécales, Pe = pertes azotées endogènes

Scores PDCAAS et DIAAS

Des scores de qualité nutritionnelle pondèrent la composition en acides aminés indispensables de la protéine par la digestibilité. Le *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score* (PDCAAS) était le critère recommandé initialement pour l'évaluation de la qualité globale des protéines chez l'Homme. Il s'obtient par le calcul suivant :

PDCAAS = Ratio AAI le plus faible × digestibilité fécale N (%)

Le profil de référence généralement utilisé pour le PDCAAS est le besoin en acides aminés des enfants de 1 à 2 ans défini par le rapport OMS/FAO/UNU de 2007 [86]. L'utilisation des acides aminés absorbés ne pouvant théoriquement pas excéder 100%, les ratios AAI sont plafonnés à 1 lors du calcul du PDCAAS. Ainsi, un PDCAAS inférieur à 1 signifie qu'au moins un des acides aminés indispensables est fourni en quantité insuffisante après ingestion et absorption de la protéine étudiée.

En 1989, la consultation conjointe d'experts FAO/OMS sur l'évaluation de la qualité des protéines a recommandé l'adoption du PDCAAS en tant que méthode officielle au niveau international [86]. Depuis, ses limites ont été mises en avant, notamment la surestimation de la qualité des protéines faiblement digestibles due à l'évaluation de la digestibilité au niveau fécal. De plus, la méthode PDCAAS ne tient pas compte de la digestibilité individuelle de chaque acide aminé, qui peut être différente de l'un à l'autre [123]. Enfin, le plafonnement à 1 ne permet pas d'attribuer de valeur nutritionnelle supplémentaire aux protéines de haute qualité. La FAO a recommandé en 2013 d'utiliser le *Digestible Indispensable Amino Acid Score* (DIAAS) [34], qui intègre trois changements majeurs par rapport au PDCAAS :

- Chaque ratio AAI est corrigé par la digestibilité individuelle de l'acide aminé considéré
- La digestibilité est mesurée au niveau iléal
- Les scores supérieurs à 1 ne sont pas plafonnés

Ainsi :

$$AAI_i \text{ ratio} = \frac{\text{mg } AAI_i \text{ digestible dans 1g de la protéine testée}}{\text{mg } AAI_i \text{ dans 1g de la protéine de référence}}$$

$$\text{DIAAS} = \text{AAI ratio le plus faible}$$

Le profil de référence utilisé peut influencer les valeurs de PDCAAS et de DIAAS [34,124]. Le DIAAS est calculé à partir des profils de 2011 alors que les valeurs de PDCAAS de la littérature se basent fréquemment sur ceux de 2007. Lorsqu'un profil de besoin similaire est utilisé, le PDCAAS est généralement plus élevé que le DIAAS pour une même source protéique [122]. La différence entre les deux scores est plus élevée pour les protéines peu digestibles [124].

Rétention azotée, valeur biologique

La qualité d'une protéine s'évalue également par l'efficacité de son utilisation métabolique après absorption. La mesure de la rétention azotée consiste à rapporter les pertes azotées digestives et urinaires à l'azote ingéré et s'évalue par l'Utilisation Protéique Nette (UPN) et l'Utilisation Postprandiale Protéique Nette (UPPN). La Valeur Biologique (VB) rapporte les pertes à l'azote absorbé et se limite ainsi à la composante métabolique. Les pertes endogènes urinaires peuvent être prises en compte ou non :

$$\text{Valeur biologique apparente} = \frac{I - P - U}{I - P} \times 100$$

$$\text{Valeur biologique vraie} = \frac{I - (P - Pe) - (U - Ue)}{I - (P - Pe)} \times 100$$

Où I = azote ingéré, P = pertes azotées fécales, Pe = pertes azotées fécales endogènes, U = pertes azotées urinaires, Ue =pertes azotées urinaires endogènes

L'utilisation métabolique des protéines varie selon le profil des acides aminés absorbés, leur vitesse de digestion et d'absorption et le niveau d'apport protéique. En effet, l'excrétion azotée augmente lorsque l'apport dépasse le besoin et diminue ainsi la rétention protéique [125]. Le déficit en un ou plusieurs acides aminés dans le régime réduit également la rétention protéique [126]. Par ailleurs, une protéine digérée lentement présente une meilleure UPPN qu'une protéine digérée plus rapidement (e.g. 73% pour la caséine vs. 67% pour la protéine de lactosérum [127]).

La biodisponibilité est le terme générique désignant la proportion de tout nutriment absorbée de l'alimentation et disponible pour être utilisée par les tissus cibles. Elle tient compte des composantes digestives et métaboliques et comprend la digestibilité, l'intégrité chimique et le niveau d'interférence dans le métabolisme [35,86]. Dans la littérature scientifique, le terme « biodisponibilité des acides

aminés » est régulièrement employé pour faire référence à la digestibilité des acides aminés individuels, par nuance avec la digestibilité de la protéine entière, alors qu'en réalité la biodisponibilité ne se réduit pas à la composante digestive. La digestibilité et la biodisponibilité des protéines et acides aminés varient selon la source de protéine (composition, structure), l'aliment (matrice, traitements technologiques), et selon les individus (état physiologique, génétique) [128,129].

Capacité à soutenir la croissance

La qualité d'une protéine peut également se définir par sa capacité à soutenir la croissance. Le coefficient d'efficacité protéique (*Protein Efficiency Ratio*, PER) est un indice déterminé chez le rat qui consiste à évaluer sa croissance lorsqu'il est nourri avec une source unique de protéine. La croissance des animaux est suivie pendant 1 mois, au cours duquel ils reçoivent un régime standardisé légèrement déficitaire en protéines (10 E% au lieu de 20 E%). Le PER est calculé par le ratio suivant :

$$\text{PER} = \frac{\text{gain de poids corporel sur 1 mois (g)}}{\text{apports protéiques sur 1 mois (g)}}$$

La caséine, dont le PER de référence de 2,5 permet de standardiser les valeurs des autres sources protéiques, sert de groupe contrôle. La méthode du PER est utilisée depuis des décennies pour son efficacité à mettre en évidence les protéines de moindre qualité, son faible coût, et l'existence d'un protocole standardisé [130]. Au Canada, elle est toujours considérée comme la méthode de référence pour l'évaluation de la qualité des protéines [131]. Cependant, les besoins en acides aminés du rat, et plus particulièrement du rat en croissance, diffèrent de ceux de l'Homme et sont notamment doublés pour les acides aminé soufrés [132]. On lui préfère généralement l'usage du PDCAAS et du DIAAS.

Autres critères

La qualité nutritionnelle des protéines peut également être étudiée par des approches fonctionnelles allant au-delà de leur capacité à fournir les acides aminés indispensables. L'étude des cinétiques de digestion et d'absorption intestinale, notamment la vitesse de vidange gastrique, en fait partie. Ces cinétiques sont influencées par la nature des protéines, la teneur en fibres de la matrice alimentaire et sa viscosité [53,133–135]. Il peut également s'agir d'évaluer le taux de synthèse protéique de maintenance ou d'accrétion protéique (croissance) au niveau organisme entier ou de certains tissus cibles (muscle, os) [81]. Ces approches peuvent aussi intégrer la mesure de facteurs de risque de dysfonctions métaboliques, liés par exemple à la résistance à l'insuline [136], au diabète [137], à l'obésité ou au risque de maladie cardiovasculaire. Un nombre croissant d'études portent sur le rôle des protéines dans la promotion d'une santé optimale ou la prévention des dysfonctions, par

l'intermédiaire de facteurs comme la gestion du poids [138] et la satiété [139], le développement de la masse musculaire [140,141], la sarcopénie et la santé osseuse [142,143].

3.2. Effet de la source : protéines animales et végétales

Comparaison selon la composition en acides aminés

L'existence des critères standardisés permet de comparer la qualité nutritionnelle des protéines, et notamment de mettre en évidence les différences entre les sources animales et végétales. Certaines sources végétales se distinguent par leur teneur élevée en protéines (N × 6,25% m.s). Elle avoisine les 20-25% pour le pois, les haricots et lentilles et atteint 40-45% pour le soja et le lupin [32,144], soit autant que dans la viande de bœuf, exprimée en % m.s (**Tableau 7**). La teneur en protéines des céréales (blé, maïs, riz) est plus faible et se situe généralement entre 8 et 12%. Les sources protéiques se comparent également selon leur composition en acides aminés indispensables. Les études de score chimique rapportent principalement les déficits respectifs en lysine et en méthionine des céréales et des légumineuses, alors que les protéines animales ont un profil en acides aminés équilibré (**Tableau 7**). Quelques sources végétales font exception, comme le soja parmi les légumineuses, dont la teneur en acides aminés soufrés répond au besoin tel que défini par le profil de référence des individus de 3 ans et plus [34]. Le pois et le lupin ont également un score chimique proche de 1. En revanche, le lupin a une teneur bien plus faible en lysine que les autres légumineuses (**Figure 8**). Parmi les céréales et pseudo-céréales, le quinoa se distingue par une teneur en lysine supérieure au besoin, qui en fait une des rares sources végétales au profil équilibré. La combinaison de différentes sources permet de compenser les déficits respectifs en acides aminés indispensables, la plus commune étant l'association céréale-légumineuse [145]. Les sources les plus efficaces pour cette combinaison sont les légumineuses riches en lysine comme le pois et le soja, et les céréales riches en acides aminés soufrés comme le blé et le sarrasin. Il est également possible d'améliorer la qualité nutritionnelle d'une protéine végétale en la combinant avec une source animale (œuf, lait). Ces implications sont importantes pour les populations végétariennes ou consommant de faibles quantités de produits animaux. Ces combinaisons ne sont pas nécessairement à suivre au sein d'un même repas, et la consommation de sources diverses d'acides aminés au cours de la journée devrait assurer une utilisation azotée adéquate chez les personnes en bonne santé [146,147]. Les combinaisons céréales-légumineuses et céréales-produits laitiers sont par ailleurs adoptées dans de nombreuses cultures et mises en pratique dans un grand nombre de plats traditionnels [33].

Tableau 7. Composition en acides aminés et score chimique de sources animales et végétales de protéines, d'après les tables de données de la FAO [144]

	Animales			Légumineuses							Céréales et pseudo-céréales				Profil de réf. [1]
	Lait	Œuf	Bœuf	Soja	Pois	Pois-chiche	Lentille	Haricot	Féverole	Lupin	Blé	Maïs	Quinoa	Sarrasin	
AAI (mg/g protéine)															
His	26	24	34	28	23	26	27	28	24	26	25	27	24	21	16
Ile	46	63	48	50	43	44	43	42	40	44	35	37	36	34	30
Leu	93	88	81	85	68	75	76	76	71	72	72	125	**60**	59	61
Lys	76	70	89	70	75	68	72	72	65	53	**31**	**27**	56	**38**	48
AAS [2]	33	58	40	28	**20**	**22**	**17**	**19**	**15**	**21**	43	35	34	39	23
AAA [3]	99	99	80	88	73	87	85	77	75	72	80	87	69	62	41
Thr	44	51	46	42	41	38	40	40	34	36	31	36	35	36	25
Val	57	68	50	53	47	45	50	46	44	40	47	48	45	67	40
Trp	-	-	-	14	-	-	-	-	-	10	-	7	12	-	6,6
AANI (mg/g protéine)															
Arg	32	61	63	79	95	94	87	57	89	95	49	42	70	98	-
Ala	34	59	58	47	41	43	43	42	41	35	39	75	47	47	-
Asp	75	96	90	128	110	116	116	120	112	110	53	63	73	89	-
Glu	218	127	153	205	161	159	166	148	151	220	320	189	119	173	-
Gly	19	33	49	46	40	40	42	38	41	41	42	37	52	64	-
Pro	89	42	38	60	39	42	43	36	40	41	107	89	31	43	-
Ser	57	76	40	56	43	51	53	56	45	51	49	50	37	50	-
SC	1,42	1,45	1,25	1,23	**0,88**	**0,97**	**0,74**	**0,83**	**0,67**	**0,93**	**0,64**	**0,56**	**0,98**	**0,79**	-
Protéine (% m.s)	27	48	45	41	25	23	27	25	26	35	14	11	14	14	-

AAI : Acides aminés indispensables, AANI : Acides aminés non indispensables, AAS : Acides aminés soufrés, AAA : Acides aminés aromatiques, SC : Score chimique
Les concentrations inférieures aux valeurs de référence (valeurs limitantes) sont indiquées en gras. Le facteur de conversion azote-protéine utilisé est 6,38 pour le lait, 5,71 pour le soja, 5,83 pour le blé, et 6,25 pour les autres sources. Les valeurs renseignées pour les légumineuses et les céréales sont les concentrations des graines entières crues.

[1] Profil de référence en AAI des individus de 3 ans et plus [34]

[2] Méthionine + cystéine

[3] Phénylalanine + tyrosine

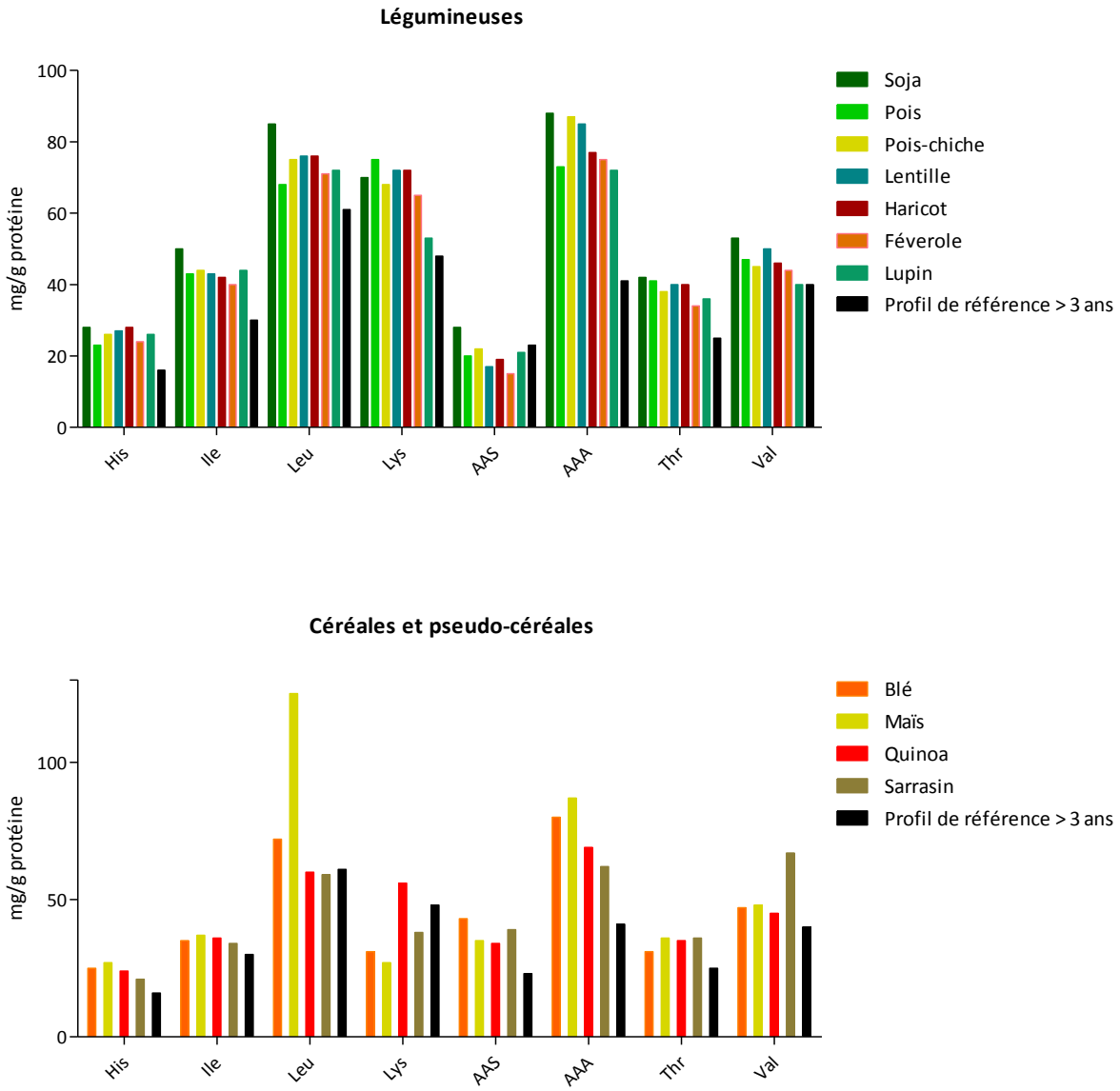

Figure 8. Comparaison du profil en acides aminés indispensables entre les sources de même famille (légumineuses et céréales) [144]. Le facteur de conversion azote-protéine est 5,71 pour le soja, 5,83 pour le blé, et 6,25 pour les autres sources.

Comparaison selon le PER

Les conséquences du déséquilibre en acides aminés indispensables des protéines végétales sont visibles à travers les études de PER chez le rat, qui montrent qu'elles ne permettent pas de soutenir la croissance au même niveau que les sources animales [145,148]. Des PER de 3 à 4 ont été rapportés pour les protéines d'œuf et les protéines de lait totales [130] et des valeurs plus faibles ont été obtenues pour de nombreuses sources végétales, notamment les céréales, dont le PER est parfois inférieur à 1 [149]. Une étude ciblée sur les légumineuses a évalué le PER du pois jaune, du pois chiche, de la lentille verte

et du haricot rouge à 1,42 ; 2,32 ; 1,30 et 1,55 respectivement [150], valeurs ajustées pour un PER de la caséine de lait à 2,50.

Comparaison selon le bilan azoté

Les études de bilan azoté chez l'Homme montrent que l'utilisation azotée suivant l'ingestion de blé et de certains haricots est réduite par rapport à celle induite par les protéines animales [105,151]. L'utilisation protéique et la valeur biologique du blé sont également inférieures à celles du lait. Cependant, certaines protéines végétales comme le lupin, le soja, et le pois se distinguent par une utilisation protéique plus efficace, relativement similaire à celle des sources animales (**Tableau 8**).

Tableau 8. Rétention azotée et valeur biologique de protéines alimentaires mesurées chez l'Homme et chez le rat. D'après [51,81,126,152–156]

Source	UPPN (rat)	UPPN (Homme)	VB (rat)	VB (Homme)
Lait (protéine totale)	-	75-80	-	78
Caséine	77	71	75	81
Lactosérum	77	64	77	67
Viande	-	70-72	-	-
Blé	53-65	66	56-68	73
Quinoa	76	-	83	-
Colza (isolat)	-	70	-	84
Pois (globuline)	-	70-72	-	76-78
Pois (albumine)	-	71	-	79
Soja (entier)	-	70-74	-	77-82
Soja (isolat)	-	78	-	86
Lupin	-	74	-	82

Comparaison selon la digestibilité

Les sources de protéines diffèrent également en termes de digestibilité. Les données chez l'Homme indiquent des digestibilités vraies de l'azote entre 80 et 90 % pour les protéines végétales [33], bien que certaines sources soient inférieures (60% pour la zéine du maïs [157]) ou supérieures (91-94% pour le soja [123,155]). La digestibilité est généralement plus élevée pour les sources animales. Le **Tableau 9** répertorie des données de digestibilité de l'azote évaluées chez l'Homme, chez le porc et chez le rat pour diverses sources de protéines.

Les protéines végétales sont généralement moins digestibles que les protéines animales du fait de la complexité des parois cellulaires et de la présence de fibres et de facteurs antinutritionnels. Ces derniers exercent un effet barrière sur les enzymes protéolytiques par formation de complexes, qui les rendent inactives [158]. Ils peuvent également agir sur l'intestin en stimulant les sécrétions endogènes et en perturbant l'absorption des peptides et des acides aminés. Les légumineuses contiennent des inhibiteurs d'enzymes digestives (antitrypsines), des tannins, et des hémagglutinines. Il a été montré que la présence de niveaux élevés d'inhibiteurs de la trypsine dans le soja et les haricots entraînait une réduction de la digestibilité des protéines et des acides aminés pouvant aller jusqu'à 50% chez le rat ou le porc [159]. Chez le porc, le raffinage des graines de soja réduisant l'activité anti-trypsique d'un facteur 6 a fait passer la digestibilité iléale vraie de 85,5% à 94,9% [160] (**Tableau 9**). Le soja possède les teneurs les plus élevées en facteur antitrypsine (inhibiteur de Kunitz particulièrement), alors que le pois en contient 3 à 10 fois moins [159,161]. Les céréales contiennent des tannins et des phytates (acide phytique), ces derniers pouvant réduire la digestibilité des protéines de 10% [162]. En effet, la charge négative de leurs groupements phosphate chélate les protéines par liaison directe ou par l'intermédiaire de cations (généralement le calcium) [163]. Les phytates seraient également susceptibles d'interférer avec l'action protéolytique de la pepsine et de la trypsine [164]. L'acide phytique est réparti de manière inégale dans la graine, les teneurs les plus élevées se trouvant dans le germe du maïs, le son du blé et le péricarpe du riz [165]. Sa concentration est plus faible dans les légumineuses et relativement similaire entre les sources (haricot, pois, lentilles).

L'impact des facteurs antinutritionnels sur la digestibilité des protéines alimentaires n'est pas le même selon les individus. Leurs effets néfastes seraient par exemple plus prononcés chez les rats âgés (20 mois) que chez les jeunes rats (5 semaines) [166]. Par ailleurs, les conséquences de ces différences de digestibilité entre les sources seraient d'autant plus importantes dans les pays émergents. Les pays les plus développés économiquement consomment généralement des protéines animales et végétales de qualité nutritionnelle élevée et hautement digestibles. En revanche, l'alimentation des populations les plus pauvres est parfois limitée à des sources protéiques peu digestibles, comme le maïs, le riz ou le manioc, contenant des niveaux élevés de fibres insolubles et de facteurs antinutritionnels [167–169].

Tableau 9. Digestibilité iléale ou fécale de l'azote et des acides aminés de diverses sources protéiques mesurée chez le rat, le porc ou l'Homme selon la méthode menée. Données issues de la littérature (liste non exhaustive)

Source	Nature	Digestibilité fécale N	Digestibilité iléale N	Digestibilité iléale AA *	Modèle	Recueil digesta	Repas	Différenciation pertes endo/exogènes	Marqueur indigestible	Référence
Tournesol	Concentré protéique	95,1 ± 0,5	96,5 ± 0,3	96,3 ± 0,2	Rat	Cæcum	Unique	^{15}N **	Aucun	Tessier *et al.*[170]
Viande bœuf crue Viande bœuf cuite	- Bouillie	97,5 ± 0,08 94,5 ± 0,28	97,8 ± 0,07 95,4 ± 0,14	-	Rat	Cæcum	Unique	^{15}N **	Aucun	Oberli *et al.*[171]
Lait (caséine) Lait (protéines solubles) Lait	Isolat protéique Isolat protéique Ecrémé, microfiltré	-	95,63 ± 1,2 98,30 ± 0,52 96,23 ± 0,42	-	Rat	Cæcum	Unique	^{15}N **	Aucun	Lacroix *et al.*[127]
Lait (protéines totales) Lait (protéines solubles) Soja Pois Pois cuisiné Riz Blé	Concentré protéique Isolat protéique Concentré protéique Concentré protéique Cuit (bouilli) Cuit Son	98,1 ± 1,1 102 ± 0,54 98,5 ± 0,64 99,0 ± 1,45 89,0 ± 1,51 86,6 ± 3,60 85,3 ± 3,28	92,1 ± 1,1 99 ± 0,54 94,4 ± 0,64 97,2 ± 1,45 88,4 ± 1,51 72,8 ± 3,60 72,7 ± 3,28	94 ± 1,0 100 ± 0,5 96 ± 0,5 98 ± 1,1 92 ± 0,4 77 ± 0,3 74 ± 0,6	Rat	Iléon	Multiples	Groupe protéiprive	Dioxyde de titane (TiO_2)	Rutherfurd *et al.*[122]
Blé Riz brun Sarrasin Avoine Millet	Pain complet cuit Trempé, cuit, lyophilisé Trempé, cuit, lyophilisé Trempé, cuit, lyophilisé Trempé, cuit, lyophilisé	-	-	93,3 ± 2,0 85,0 ± 0,8 88,01 ± 1,6 88,54 ± 1,5 78,0 ± 2,0	Rat	Iléon	Multiples	Groupe protéiprive	Dioxyde de titane (TiO_2)	Han *et al.*[172]
Pois jaune Pois-chiche Lentille verte Haricot rouge Lait (caséine)	Décortiqué, cuit Décortiqué, trempé, cuit Entière, cuite Décortiqué, trempé, cuit Isolat protéique	87,9 85,0 87,9 78,6 96,6	-	-	Rat	Fèces, sur 5 jours	Multiples	Groupe protéiprive	Aucun	Nosworthy *et al.*[150]
Soja Pois Blé Lait (protéines totales)	Isolat protéique Concentré protéique Mélange farine de soja Concentré protéique	-	94 95 91 92	99 96 90 99	Porc	Canule iléale en T	Multiples, sur 2 jours	Groupe protéiprive	Oxyde de chrome (Cr_2O_3)	Mathai *et al.*[124]
Soja Maïs Blé	Farine - -	-	87,1 88,6 79,9	90,4 91,4 82,8	Porc	Canule iléale en T	Multiples, sur 2 jours	Groupe protéiprive	Oxyde de chrome (Cr_2O_3)	Oliveira *et al.*[173]

Source	Nature	Digestibilité fécale N	Digestibilité iléale N	Digestibilité iléale AA *	Modèle	Recueil digesta	Repas	Différenciation pertes endo/exogènes	Marqueur indigestible	Référence
Lait (caséine) Lait (caséine hydrolysée) Colza	Caséinate de calcium Caséinate de calcium Isolat protéique	-	97,6 95,0 91,4	97,4 94,0 -	Porc	Canule iléale en T	Unique	^{15}N **	Dioxyde de titane (TiO_2)	Deglaire *et al.*[174]
Seitan Tofu Boisson de soja Pois en émulsion	Aliment à base de blé Aliment à base de soja - Isolat protéique + huile de soja-eau	-	-	92,3 ± 3.4 86,0 ± 3.3 89,3 ± 3.6 92,6 ± 2.5 (SID)	Porc	Canule iléale en T	Unique	Groupe protéiprive	Oxyde de chrome (Cr_2O_3)	Reynaud *et al.*[175]
Seitan Tofu Boisson de soja Pois en émulsion	Aliment à base de blé Aliment à base de soja - Isolat protéique + huile de soja-eau	-	-	97,5 ± 1,5 95,0 ± 2,3 92,3 ± 3,0 94,2 ± 1,3 (TID)	Porc	Canule iléale en T	Unique	Dilution isotopique ^{13}C Leu + protéiprive	Oxyde de chrome (Cr_2O_3)	Reynaud *et al.*[175]
Pois Soja anti-trypsique bas Soja anti-trypsique moy Soja anti-trypsique fort	- Concentré protéique Farine 50% graines grillées	-	89,9 94,9 93,1 85,5	-	Porc	Canule iléale en T	Multiples, sur 3 jours	^{15}N **	Oxyde de chrome (Cr_2O_3)	Grala *et al.*[160]
Lait en aigüe Lait en chronique	Ecrémé, poudre Ecrémé, poudre	-	76,6 75,7 (AID)	-	Porc	Iléostomie	Unique vs Multiples 14 jours	Aucune	Oxyde de chrome (Cr_2O_3)	Moughan *et al.*[176]
Lait Soja	Isolat protéique Isolat protéique	-	95,3 ± 0,9 91,7 ± 1,8	95,3 ± 1,8 93,8 ± 3,0	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	^{15}N **	PSP (débit)	Gaudichon *et al.*[123]
Lait (protéines solubles) Maïs (zéine)	Isolat protéique Isolat protéique	-	91,2 ± 2.6 60,2 ± 4.5	92,3 ± 2.3 63,0 ± 4.6	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	Groupe protéiprive	PEG-4000 (débit)	Calvez *et al.*[157]
Pois (protéines totales) Pois (globulines) Soja Lupin	Isolat protéique Isolat protéique Isolat protéique Farine	-	89,9 ± 4,0 94,0 ± 2,5 91,5 ± 2,0 91,0 ± 3,0	-	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	^{15}N **	PSP (débit) PEG-4000	Mariotti *et al.*[52,154,156]
Pois	Farine	-	89,4 ± 1,1	-	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	^{15}N **	PSP (débit) PEG-4000	*Gausserès et al.*[177]
Lait (caséine) Lait (caséine hydrolysée) Colza	Caséinate de calcium Caséinate de calcium Isolat protéique	-	94,1 92,3 87,1	94,4 93,2 -	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	^{15}N **	PEG-4000 (débit)	Deglaire *et al.*[174]
Viande bœuf cuite ++ Viande bœuf cuite	Cuisson 90°C 30min Cuisson 55°C 5min	-	90,1 ± 2,1 94,1 ± 0,7	-	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	^{15}N **	PEG-4000 ^{13}C inuline	Oberli *et al.*[153]

Source	Nature	Digestibilité fécale N	Digestibilité iléale N	Digestibilité iléale AA *	Modèle	Recueil digesta	Repas	Différenciation pertes endo/exogènes	Marqueur indigestible	Référence
Lait Blé	Ecrémé Isolat protéique + farine	96,6 ± 0,4 -	95,5 ± 0,4 90,3 ± 4,3	-	Homme	Sonde nasoiléale	Unique	^{15}N **	PSP (débit)	Bos *et al.*[126,178]
Œuf cuit Œuf cru	Micro-ondes -	-	90,9 ± 0,8 51,3 ± 9,8	-	Homme	Iléostomie	Unique	^{15}N **	PSP (débit) PEG^3H	Evenepoel *et al.*[179]
Lait (caséine) Lait (protéines solubles) Soja Soja	Caséinate de calcium Isolat protéique Isolat protéique Concentré protéique	-	101,9 ± 0,70 98,3 ± 0,80 99,5 ± 0,80 98,5 ± 1,20	100,0 96,9 97,9 96,8	Homme	Iléostomie	Unique	Groupe protéiprive	AIA	Moughan *et al.*[176]
Spiruline Pois-chiche Haricot mungo Haricot mungo décortiqué	Cellules entières Farine Farine Farine	-	-	85,2 56,6 57,7 63,4 (BD)	Homme	Aucun (plasma)	Multiples sur 7h	^2H & ^{13}C ***	NA	Devi *et al.*[41]
Spiruline Œuf cuit Œuf cuit (bis) Blanc d'œuf Viande poulet cuite Pois jaune Pois-chiche Haricot mungo Haricot mungo décortiqué	Cellules entières Entier Entier, bouilli Bouilli, lyophilisé Cuite sous pression Entier, trempé, cuit Entier, trempé, cuit Entier, trempé, cuit Trempé, cuit	-	-	87,9 92,3 89,4 ± 4,5 86,3 ± 4,6 92,0 ± 2,8 71,6 ± 1,3 74,6 ± 0,8 63,2 ± 1,5 70,9 ± 2,1 (BD)	Homme	Aucun (plasma)	Multiples sur 7h	^2H & ^{13}C ***	NA	Kashyap *et al.*[42,43,45]

AID, Digestibilité iléale apparente ; AIA, Cendres insolubles dans l'acide ; BD, Biodisponibilité digestive ; NA, Non applicable ; PEG, Polyéthylène glycol ; PSP, Phénolsulfonephtaléine (rouge de phénol) ; SID, Digestibilité iléale standardisée ; TID, Digestibilité iléale vraie

* Valeur moyenne sur l'ensemble des acides aminés étudiés

** Protéines alimentaires (exogènes) marquées au ^{15}N

*** Protéine test marquée au ^2H, protéine de référence marquée au ^{13}C

Comparaison selon le PDCAAS et le DIAAS

Alors que les protéines animales ont généralement un PDCAAS de 1 (œuf, lait, viande), attestant leur capacité à couvrir les besoins en acides aminés, la majorité des protéines végétales présente un score plus faible [180]. D'importantes variations existent selon les sources, y compris au sein de mêmes groupes d'aliments. Quelques végétaux tels que le soja, le quinoa, le pois, et le haricot noir se distinguent par un PDCAAS élevé lorsque certaines céréales ne dépassent pas 0,2 (**Tableau 10**). Les valeurs de DIAAS sont légèrement inférieures à celles du PDCAAS mais les différences entre les sources de protéines restent très similaires [122,124] (**Tableau 11**). Le remplacement de la digestibilité fécale de l'azote par la digestibilité iléale des acides aminés dans le cadre du passage du PDCAAS au DIAAS entraîne une baisse de l'indice pour toutes les protéines [33]. Ces différences entre indices sont plus ou moins marquées selon les sources. Selon Rutherfurd *et al.*, la différence entre le PDCAAS et le DIAAS serait de 8% dans le cas de la protéine de pois, mais réduite à 4% lorsque le même profil de référence est utilisé [122]. L'usage des allégations relatives à la teneur en protéines est régi à la fois par la teneur en protéines de l'aliment et par la qualité de ses protéines, évaluée désormais par le DIAAS [34]. En effet, un DIAAS ≥ 1 fait évoluer l'allégation de « haute » à « excellente », un DIAAS entre 0,75 et 0,99 permet de passer de « source » à « bonne », alors qu'un DIAAS < 0,75 rend le produit inéligible à une allégation. Par conséquent, l'usage du DIAAS à la place du PDCAAS sera susceptible de changer l'éligibilité aux allégations protéiques pour certains aliments d'origine végétale, dans un sens comme dans l'autre [147].

Tableau 10. PDCAAS de sources végétales et animales de protéines issus de différentes études

Source	Nature	PDCAAS	Modèle	Profil de référence	Référence
Soja	Isolat protéique	0,97	Rat	FAO 2013 0,5-3 ans	Rutherfurd *et al.* [122]
Pois	Concentré protéique	0,86			
Blé	Son	0,48			
Riz	Cuit	0,56			
Lait	Concentré (protéines totales)	1,25			
Lait	Concentré (protéines solubles)	0,99			
Pois jaune	Graine décortiquée, cuite	0,63	Rat	FAO 1991	Nosworthy *et al.* [150]
Lentille verte	Graine entière, cuite	0,63			
Pois-chiche	Graine décortiquée, trempée, cuite	0,52			
Haricot rouge	Graine décortiquée, trempée, cuite	0,55			
Lait (caséine)	Isolat protéique	1,00			
Haricot noir	Graine, crue	0,72	Rat	Rat & FAO 1985	Sarwar [181]
Pomme de terre	Entière, cuite, lyophilisée	0,81	Rat	FAO 1991 enfants	Jørgensen *et al.* [182]
Quinoa	Farine	0,79	Rat	FAO 1985	Ruales *et al.* [183]
Spiruline	Cellules entières	0,84	Rat	FAO 2013 > 3 ans	Tessier *et al.* [170]

Tableau 11. DIAAS de sources végétales et animales de protéines issus de différentes études

Source	Nature	DIAAS	Modèle	Profil de référence	Référence
Soja	Isolat protéique	0,90	Rat	FAO 2013 0,5-3 ans	Rutherfurd *et al.* [122]
Pois	Concentré protéique	0,82			
Blé	Son	0,41			
Riz	Cuit	0,60			
Lait	Concentré (protéines totales)	1,18			
Lait	Concentré (protéines solubles)	0,97			
Tournesol	Concentré protéique	0,84	Rat	FAO 2013 > 3 ans	Tessier *et al*. [184]

Source	Nature	DIAAS	Modèle	Profil de référence	Référence
Blé	Pain complet cuit	0,20	Rat	FAO 2013 0,5-3 ans	Han *et al*. [172]
Riz brun	Trempé, cuit, lyophilisé	0,42			
Sarrasin	Trempé, cuit, lyophilisé	0,68			
Avoine	Trempé, cuit, lyophilisé	0,43			
Millet	Trempé, cuit, lyophilisé	0,07			
Soja	Isolat protéique	0,84	Porc	FAO 2013 0,5-3 ans	Mathai *et al.* [124]
Pois	Concentré protéique	0,62			
Blé	Mélangé avec farine de soja	0,45			
Lait	Concentré (protéines totales)	1,20			
Soja	Isolat protéique	0,98	Porc	FAO 2013 > 3 ans	Mathai *et al.* [124]
Pois	Concentré protéique	0,73			
Blé	Mélangé avec farine de soja	0,54			
Lait	Concentré (protéines totales)	1,41			
Seitan	Aliment de blé	0,19	Porc	FAO 2013 0-0,5 ans	Reynaud *et al.* [175]
Tofu	Aliment de soja	0,68			
Boisson de soja	-	0,78			
Pois en émulsion	Isolat protéique + huile de soja-eau	0,42			
Seitan	Aliment de blé	0,24	Porc	FAO 2013 0,5-3 ans	Reynaud *et al.* [175]
Tofu	Aliment de soja	0,83			
Boisson de soja	-	0,99			
Pois en émulsion	Isolat protéique + huile de soja-eau	0,51			
Seitan	Aliment de blé	0,28	Porc	FAO 2013 > 3 ans	Reynaud *et al.* [175]
Tofu	Aliment de soja	0,97			
Boisson de soja	-	1,17			
Pois en émulsion	Isolat protéique + huile de soja-eau	0,60			

Traitements technologiques et amélioration de la qualité nutritionnelle des protéines végétales

En raison de leur nature protéique, les inhibiteurs trypsiques peuvent être inactivés par un traitement thermique [166,180,185] (ébullition, autoclavage rayonnement infrarouge, micronisation…) ou éliminés par fractionnement [161]. Une étude a montré que le chauffage de graines de soja à 100°C pendant 10 minutes réduisait l'activité des antitrypsines d'environ 80%, aboutissant à un PER optimal de 3,1 [186]. Toutefois, un chauffage prolongé visant à réduire davantage l'activité de l'inhibiteur de la trypsine a, au contraire, a réduit le PER à 2,9. De plus, la cuisson et l'appertisation des haricots rouges améliorent la digestibilité des acides aminés mesurée chez le rat [187]. Une étude chez l'Homme a montré que la rétention azotée suivant l'ingestion de farine de soja cru était inférieure de 20 % par rapport à la farine de soja cuit [188]. Les procédés mécaniques et notamment l'extrusion réduisent la teneur en phytates des graines de haricot [189] ce qui pourrait améliorer leur digestibilité. Dans les légumineuses, une part importante des phytates est localisée dans les parties comestibles et l'effet des traitements mécaniques est plus limité [159]. Ainsi, la digestibilité est généralement plus élevée pour les végétaux raffinés, les isolats et les concentrés protéiques par rapport aux produits bruts non transformés [86,122,124,180] (e.g. 86% pour le blé entier, 96% pour le blé raffiné, 99% pour le gluten de blé [86]). Une digestibilité iléale moyenne des acides aminés de 98% a été obtenue pour le concentré de protéines de pois chez le rat quand elle n'atteignait que 92% pour le pois cuit [122]. Concernant le soja, une étude chez le porc a évalué la digestibilité iléale des acides aminés à 99% pour un isolat protéique et à 95% pour une farine [124] (**Tableau 9**). La germination de certaines graines augmenterait la teneur en protéines et diminuerait le taux d'acide phytique, améliorant ainsi leur digestibilité [180]. Ces effets ont été démontrés notamment sur le pois bambara [190] et le haricot noir [191]. La germination du pois chiche augmenterait la teneur en protéines de 11-16% et la digestibilité *in vitro* de 6-17% [192].

Néanmoins, les traitements thermiques sont également susceptibles de réduire la digestibilité des protéines en favorisant la réaction de Maillard, qui intervient entre le groupement amine des acides aminés et la fonction carbonyle des glucides réducteurs (glucose, fructose, lactose) [193–195]. Ce phénomène concerne essentiellement la lysine, acide aminé le plus réactif, par réduction de la part disponible, dont le résidu terminal NH_2 est libre, au profit de la « lysine réactive », rendue inutilisable pour la synthèse protéique. Les premières phases de la réaction forment des composés tels que la lysinoalanine et la furosine et interviennent dans des conditions standards de transformation et de stockage des aliments [196]. Des traitements thermiques plus poussés (stérilisation, séchage par atomisation) mènent à la formation de mélanoïdines associés à une coloration brune et affectent négativement la valeur nutritionnelle des denrées alimentaires [73,159]. Les traitements thermiques ou alcalins de la caséine, de la protéine de soja ou de blé génèrent également des acides aminés D[197], de

digestibilité réduite (inférieure à 40%), pouvant entraîner une réduction marquée de la qualité des protéines évaluée chez le rat [159] ou le porc [198].

3.3. Focus sur la protéine de pois

Le pois (*Pisum Sativum L.)* est une plante annuelle de la famille des légumineuses (Fabacées) cultivée principalement au Canada, en Russie et en Chine [199] pour l'alimentation animale et humaine. Son composant principal est l'amidon, qui représente jusqu'à 50% de la matière sèche des graines. Sa teneur en protéines est de 24% m.s et peut être qualifiée comme « élevée » d'après les critères d'allégations définis par la FAO [34]. Les fibres comptent pour 20% m.s et les lipides ne sont présents qu'en faible quantité (2,5 % m.s, **Tableau 12**). Les teneurs en protéines et en amidon sont susceptibles de varier fortement selon la variété et les conditions environnementales [29,200]. La concentration en protéines mesurée sur 59 variétés de pois fluctue de 13,7 à 30,7% m.s [201]. Une autre étude l'évalue entre 24,2 et 27,5% m.s [29]. La fraction protéique du pois est composée d'environ 80% de globuline, soluble dans les solutions salines, et de 20% d'albumine, soluble dans l'eau. Les globulines ont un rôle de réserve et se divisent en deux catégories selon leur coefficient de sédimentation, 11S (légumine) et 7S (viciline et conviciline), le ratio 11S/7S variant de 0,2 à 1,5 [46] (**Tableau 13**).

Tableau 12. Composition du pois *(Pisum sativum L.)* [202]

Composant	Concentration (% m.s)
Protéine (N × 6,25, %)	21,2 – 32,9
Amidon	36,9 – 49,0
Fibres totales	14 – 26
insolubles	*10 – 15*
solubles	*2 – 9*
Sucres solubles	5,3 – 8,7
Lipides	1,2 – 2,4
Cendres	2,3 – 3,4

Tableau 13. Structure, fonction et proportion des protéines principales du pois [22,199,203]

Famille	Nom	Structure et poids moléculaire	Fonction	Quantité (% protéine)
Globulines 49-82% m.p	Légumine	Hexamère PM 330 – 400 kDa	Stockage	6 – 24,5
	Viciline	Trimère PM 150 – 170 kDa	Stockage	21 – 55
	Conviciline	Trimère PM 210 kDa	Stockage	3,9 – 8,3
Albumines 20-30% m.p	PA1	Dimère PM 10 kDa	Stockage	5 – 9
	PA2	Dimère PM 50 kDa	Inconnue	10 – 20
	Lectines	Tétramère PM 50 kDa	Protection contre les protéases endogènes	2,5
	Lipoxygénases	–	Oxydation des acides gras	< 1
	Inhibiteurs de protéases (trypsine)	Monomère PM 10 – 16 kDa	Activité antitrypsique	< 2

PM, Poids moléculaire ; m.p, matière protéique

La protéine de pois est limitante en méthionine mais riche en lysine, ce qui la rend très adaptée aux combinaisons avec les céréales. Cependant, sa teneur en acides aminés soufrés est proche de la valeur adéquate définie par le profil de besoin adulte de la FAO [34], grâce à une concentration élevée en cystéine [204,205]. Des études comparatives entre les légumineuses révèlent des profils en acides aminés assez similaires entre les protéines de pois et de soja, les contributeurs principaux étant la glutamine, l'asparagine, l'arginine, la leucine et la lysine [202,206]. La protéine de pois est cependant plus riche en arginine, lysine et méthionine et moins riche en glutamine et en cystéine que la protéine de soja (**Tableau 14**).

Les pois sont traités après récolte par des procédés mécaniques de nettoyage et de séparation. Le fractionnement par broyage à sec et la turboséparation permettent d'en extraire une farine, dont la concentration en protéines est comprise entre 40 et 50%. La fraction protéique peut être extraite par précipitation acide au point isoélectrique, menant à un concentré (70%) ou à un isolat protéique (> 85%) après centrifugation et lyophilisation. La séparation membranaire permet d'éliminer des facteurs antinutritionnels tels que les protéases, les inhibiteurs d'enzymes digestives, et les polyphénols [207]. Le

profil en acides aminés de la protéine est susceptible de varier selon le degré de pureté et le procédé technologique employé. À titre d'exemple, la farine et le concentré de pois sont plus riches en arginine et moins riches en leucine que l'isolat (**Tableau 14**) [206].

Les facteurs antinutritionnels sont concentrés dans la fraction albuminique du pois [208], alors que les globulines sont plus digestibles [154,209,210]. L'élimination des facteurs antinutritionnels par les processus de purification permet à l'isolat de protéine de pois d'atteindre une digestibilité élevée. Rutherfurd *et al*. ont obtenu une digestibilité fécale vraie de l'azote de 99% chez le rat pour le concentré de protéine de pois lorsque le pois entier cuisiné n'atteignait que 89% (97,2% vs. 88,4% pour la digestibilité iléale, valeurs mesurées chez le rat) [122] et 87,9% dans une autre étude [150]. La digestibilité fécale de l'isolat de protéine de pois NUTRALYS® (Roquette) a été estimée à 97,3% chez le rat [211]. La digestibilité iléale vraie de l'isolat de pois a également été évaluée chez le porc à 89,9% [160] et à 94% lorsque l'isolat protéique était incorporé dans une émulsion [175]. Chez l'Homme, l'étude de Gausserès *et al*. rapporte une digestibilité iléale de l'azote de 89,4% pour la farine de pois [56]. De plus, chez l'Homme également, la globuline du pois présente une digestibilité de 94% alors que la protéine totale (globuline et albumine) ne serait digestible qu'à 90% [154], car l'albumine concentre l'ensemble des inhibiteurs de la trypsine et que sa structure lui confère une plus grande résistance à l'hydrolyse. Une étude clinique récente faisant intervenir une nouvelle méthode isotopique plasmatique évalue la digestibilité vraie de la protéine du pois jaune cuit à 71,6% chez l'adulte [43]. La digestibilité a par la suite été mesurée chez l'enfant après extrusion du pois et était plus élevée, atteignant 88% [44]. À titre de comparaison, une étude réalisée par la même équipe dans des conditions similaires sur la protéine d'œuf, réputée hautement digestible, rapportait une digestibilité iléale vraie de 86,3% [42].

La consommation de pois a été associée à des bénéfices santé du fait de sa composition nutritionnelle, principalement la concentration et les propriétés de l'amidon, des protéines, des fibres, des vitamines et minéraux et des substances phytochimiques qu'il contient [202]. Des effets positifs sur la satiété et la gestion du poids ont été mis en évidence chez le rat [212,213] et chez l'Homme [214] suite à une alimentation contenant de la protéine de pois. La consommation de protéine de pois aurait un impact positif sur la réponse glycémique postprandiale chez l'Homme sain [215,216]. Par ailleurs, l'hydrolyse de la protéine de pois peut libérer des peptides bioactifs qui agissent notamment par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ACE-1), ayant potentiellement un effet positif sur la pression sanguine [22,217]. Certaines substances phytochimiques du pois autrefois considérées uniquement comme des facteurs antinutritionnels sont maintenant associés à des bénéfices santé, tels que les polyphénols et leurs propriétés antioxydantes [218]. L'allergénicité du pois n'a pas fait l'objet d'études épidémiologiques pour estimer sa prévalence mais il ne figure pas parmi les 14 allergènes

soumis à déclaration d'après la réglementation européenne ou américaine sur l'étiquetage alimentaire*, contrairement au soja ou au lupin [22]. Cependant, ces effets ne sont pas limités au pois, la consommation de protéines d'origine végétale étant de manière générale bénéfique pour la santé. Elle serait par exemple positivement associée à la probabilité d'un apport adéquat en nutriments (score PANDiet) [219] et négativement associée au risque d'accidents coronariens [220].

Tableau 14. Composition en acides aminés (g AA/100 g protéine) des protéines de pois et de soja sous la forme de farine, concentré et isolat [206]

Acide aminé (%)	Pois			Soja		
	Farine	Concentré	Isolat	Farine	Concentré	Isolat
Asp	10,46	11,58	11,52	11,89	10,81	10,95
Tre	3,66	3,12	3,69	5,07	4,33	3,54
Ser	4,37	4,96	6,09	5,42	5,45	5,38
Glu	16,60	16,39	17,03	19,65	21,29	23,45
Pro	5,56	4,30	5,01	4,81	4,81	5,28
Gly	4,43	4,50	4,68	4,37	4,26	3,52
Ala	4,53	4,13	4,41	4,27	4,11	4,03
½ Cys	0,34	0,35	0,73	0,80	0,85	0,63
Val	5,20	5,13	4,81	3,40	3,87	3,79
Met	0,86	0,85	0,78	0,77	0,62	0,59
Ile	3,80	3,48	3,68	3,96	3,62	3,55
Leu	6,36	6,94	8,16	6,76	7,98	7,92
Tyr	3,05	3,35	3,79	3,53	3,61	3,53
Phe	4,54	4,67	5,18	4,33	5,17	5,08
Lys	8,58	8,12	8,96	9,08	8,56	6,83
His	3,40	3,39	3,81	3,81	3,71	3,16
Trp	0,50	0,51	0,51	0,50	0,80	1,03
Arg	13,76	14,22	7,15	7,57	7,59	7,75

* Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/ EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. Official Journal of the European Union, L 304, 18–63.

3.4. Facteurs limitants et enjeux méthodologiques de l'évaluation de la qualité des protéines

Les méthodes d'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines basées sur le score chimique, comme le PDCAAS et le DIAAS, sont soumises à des limites théoriques et méthodologiques. L'un des principaux biais est lié à la détermination de la teneur en protéines et en acides aminés des aliments et notamment le choix du facteur de conversion azote-protéine. Le facteur historique 6,25 est basé sur l'hypothèse selon laquelle les protéines contiendraient 16% d'azote. Cependant, la teneur en azote diffère entre les sources protéiques car elles n'ont pas la même composition en acides aminés et que la quantité d'azote varie selon les acides aminés. Ainsi, des variations allant de 13,4% pour la protéine d'avocat à 19,3% pour la protéine de l'amande ont été observées [221]. De plus, une part de l'azote total dosé dans une protéine ne correspond pas à des acides aminés (acides nucléiques, urée, amines, urée, ammoniac, nitrates...). Ce taux d'azote non protidique est variable entre les différentes protéines alimentaires et aussi au sein d'une même source, selon le procédé de production et le degré de purification, ajoutant une difficulté supplémentaire dans le choix du facteur [81]. Ainsi, l'utilisation de la valeur 6,25 peut entraîner des erreurs de 15 à 20%, surestimant ou sous-estimant la teneur réelle en protéines des aliments [81]. D'après l'EFSA, l'utilisation du facteur standard 6,25 suffirait pour étudier la capacité d'une source protéique à fournir de l'azote [106]. Lorsque l'objectif est d'étudier la capacité à fournir les acides aminés, il est recommandé d''utiliser des coefficients spécifiques, calculés selon le profil en acides aminés de chaque protéine. Ces facteurs spécifiques seraient de 5,4 en moyenne pour les légumineuses et pour les céréales (variant respectivement de 5,24 à 5,64 et de 5,3 à 5,8) et de 6,15 pour la caséine du lait [222–226]. Cependant, le facteur 6,25 reste employé en pratique, notamment dans les banques de données de composition des aliments (USDA [227], FAO [144], Ciqual [228]…). Le choix du facteur de conversion azote-protéine est susceptible d'impacter fortement les résultats de DIAAS, une diminution du facteur entraînant l'augmentation du DIAAS [229]. Ainsi, les DIAAS calculés à partir de ratios faisant intervenir le facteur 6,25 seraient particulièrement sous-estimés pour les protéines d'origine végétale.

Les limites des méthodes basées sur le score chimique proviennent également des incertitudes qui persistent quant à la détermination des besoins en acides aminés (cf. paragraphe 2.2). Selon Wolfe *et al.*, les besoins actuellement définis pour les acides aminés indispensables sont faibles par rapport au besoin en protéines, et pourraient être sous-estimés [229]. De plus, l'évaluation par le PDCAAS et le DIAAS ne peuvent pas refléter les adaptations métaboliques qui peuvent avoir lieu à plus long terme, comme les cinétiques postprandiales de l'urée et son recyclage dans l'intestin terminal. Par exemple, la production et l'hydrolyse de l'urée serait plus importante suivant l'ingestion de protéines végétales par rapport aux protéines animales [85]. De plus, la teneur en un acide aminé indispensable dans le

régime peut agir sur le métabolisme des autres acides aminés, comme c'est le cas pour la leucine et son impact sur la biodisponibilité de l'isoleucine et la valine [230]. Comme toute méthode reposant sur l'évaluation d'un nutriment isolé de son régime, le score chimique s'affranchit des interactions possibles avec les autres éléments de la matrice alimentaire et ne reflète pas toujours l'impact sur le métabolisme. Il a en effet été montré que l'utilisation métabolique d'une protéine n'était pas la même que celle du mélange d'acides aminés lui correspondant [231].

Par ailleurs, le PDCAAS et le DIAAS sont définis par la valeur de l'acide aminé le plus limitant, quel que soit le nombre d'acides aminés limitants. Or, une protéine qui n'en possède qu'un seul peut plus facilement être combinée à une autre pour mener à un mix de qualité adéquate qu'une protéine déficitaire en plusieurs acides aminés. Par conséquent, les scores de qualité pourraient être améliorés pour mieux refléter le potentiel des sources de moindre qualité (< 1) à être combinées entre elles, comme par exemple une pondération par le nombre d'acides aminés limitants dans la protéine. Cette limite est visible par le fait que les populations végétariennes des pays occidentaux parviennent à satisfaire leurs besoins en acides aminés indispensables [33,232], alors que les protéines végétales ont généralement un DIAAS < 1. En effet, les protéines végétales semblent suffire pour couvrir le besoin des individus adultes (à l'exclusion des personnes âgées) lorsque l'apport protéique global est adéquat et que les sources sont variées [233], malgré leurs scores de qualité souvent faibles. La difficulté dans l'utilisation des indices de qualité réside aussi dans la méthodologie d'évaluation de la digestibilité des protéines et des acides aminés (cf. partie 4.).

De plus, certains auteurs proposent une modernisation des indices actuels d'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines en les complétant par des paramètres de santé publique [129], comme le risque de maladie cardiovasculaire, de diabète et le profil lipidique plasmatique. Cette évolution serait surtout favorable aux protéines d'origine végétale [15,20,219,234,235]. Katz *et al.* suggèrent par exemple d'intégrer le risque de maladies chroniques aux approches existantes ainsi que des critères liés à l'impact environnemental des régimes, dans le but de mieux répondre aux enjeux actuels sur l'alimentation durable [147].

Résumé qualité nutritionnelle des protéines

– –

La qualité d'une protéine dépend de sa capacité à fournir l'azote et les acides aminés indispensables pour assurer la croissance et le renouvellement normal des protéines corporelles. Son évaluation passe par des approches biochimiques, physiologiques et fonctionnelles. Les scores PDCAAS et DIAAS permettent de combiner les approches en associant le score chimique à la digestibilité des protéines. La qualité nutritionnelle varie selon la source, y compris au sein d'une même famille d'aliments. Les protéines végétales sont généralement de moins bonne qualité nutritionnelle que les protéines animales par leur composition en acides aminés et leur digestibilité réduite. Les combinaisons céréale-légumineuse permettent de combler leurs déficits respectifs en lysine et en méthionine et de rééquilibrer le score chimique. Les procédés technologiques tels que le fractionnement, le traitement thermique ou l'extrusion peuvent réduire les facteurs antinutritionnels (phytates, inhibiteurs de la trypsine, …) contenus dans les protéines végétales et améliorer leur digestibilité. Le soja, le pois, le lupin et le quinoa se distinguent des autres végétaux par leur forte teneur en protéines, leur composition en acides aminés relativement équilibrée ou la digestibilité élevée de leurs isolats protéiques. La consommation de protéines végétales serait potentiellement associée à des bénéfices santé qui font l'objet d'un nombre croissant de recherches, dans le contexte actuel appelant à développer des alternatives aux protéines animales. Les critères d'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines comportent certaines limites méthodologiques et d'interprétation des indices notamment liées à leur spécificité, qui les éloignent de l'impact global sur le métabolisme, et aux incertitudes relatives aux besoins en acides aminés de l'Homme.

4. Méthodes de mesure de la digestibilité *in vivo*

La digestibilité désigne la quantité d'azote ou d'acides aminés absorbée relativement à la quantité ingérée, l'absorption étant obtenue par différence entre l'ingestion et les pertes digestives. Son évaluation *in vivo* passe par la mesure des pertes digestives au niveau fécal ou iléal, à l'échelle de la protéine entière (quantité d'azote) ou individuellement pour chaque acide aminé. Les méthodes suivies sont propres à chaque modèle d'étude, à savoir l'Homme, le porc et le rat, suivant cet ordre de préférence [34]. L'évaluation de la digestibilité iléale est soumise à des difficultés méthodologiques chez le rat et chez l'Homme. En étude clinique, le recueil des digesta iléaux nécessite une approche très invasive par intubation. Le recours à des sujets iléostomisés pour lesquels le contenu iléal est déjà accessible est une alternative, mais leur recrutement est laborieux du fait de la rareté des sujets sains. Chez le porc, des interventions chirurgicales comme la pose d'une canule digestive et l'iléostomie rendent possible l'évaluation de la digestibilité iléale et permettent les répétitions sur un même animal. Mais les études en modèle porcin nécessitent des infrastructures et des équipements très spécifiques. Chez le rat, la pose d'une canule est impossible et l'euthanasie est nécessaire, ce qui empêche le recueil des pertes iléales en continu au cours du processus de digestion.

Bien que des études rapportent dans certains cas une bonne corrélation entre les digestibilités mesurées *in vitro* et *in vivo* [236–238], leurs enjeux méthodologiques sont très différents et ce chapitre se limitera aux protocoles *in vivo*.

4.1. Mesure de la digestibilité au niveau fécal

La mesure de la digestibilité au niveau fécal est appréciée pour son faible coût, sa praticité, sa rapidité d'exécution et, la possibilité d'effectuer plusieurs mesures sur le même sujet pour tous les modèles. Cependant, son utilisation est soumise à de nombreuses limites. Les pertes azotées iléales ont été estimées chez l'Homme à 2-5 g/jour, les pertes endogènes y contribuant à hauteur de 60% [177,239,240], et sont une composante déterminante du besoin en acides aminés [123]. La digestibilité mesurée au niveau fécal ne tient pas compte des acides aminés non absorbés dans l'iléon et métabolisés dans le côlon sous l'action du microbiote intestinal [241]. En effet, l'absorption incomplète des acides aminés dans l'intestin grêle augmente le flux d'azote dans le côlon et stimule l'activité des bactéries qui y résident. Les acides aminés non absorbés sont intégrés dans les protéines bactériennes ou catabolisés par transamination, désamination ou décarboxylation, avec formation de métabolites tels que l'ammoniac, les phénols et les indoles [36]. De plus, une part importante de l'azote fécal est d'origine microbienne et ne provient pas de l'azote alimentaire non absorbé ou des sécrétions endogènes,

entraînant un nouveau biais dans la mesure de la digestibilité au niveau fécal [73]. L'activité microbienne dans l'iléon n'est pas inexistante [242,243] mais peut être considérée comme minime [75,244]. La différence entre les valeurs iléale et fécale de digestibilité dépend du type et du nombre de microorganismes présents, de la nature de l'aliment et du temps de séjour du contenu digestif dans le côlon [73]. Cet écart est d'autant plus important pour les protéines de faible qualité nutritionnelle, qui fournissent plus de résidus disponible pour la fermentation colique [73,75,245]. La mesure fécale surestime (dans la majorité des cas) ou sous-estime la mesure iléale. Une étude a mesuré la différence entre les digestibilités iléale et fécale de l'azote sur des sujets humains sains ou iléostomisés consommant un régime à faible ou à forte teneur en protéines, et l'a estimé à 9,4% et 6,4% respectivement [246]. Un protocole similaire qui évaluait cette fois-ci la digestibilité des acides aminés a montré que les mesures iléale et fécale étaient différentes pour 9 acides aminés sur les 18 testés [247]. L'écart entre les mesures iléale et fécale varie également selon l'acide aminé considéré [248]. Dans une étude chez le porc, la digestibilité apparente fécale surestimait la valeur iléale de 10% pour la thréonine, 11% pour le tryptophane, et 6% pour la lysine et la sous-estimait pour la méthionine et dans certains cas la lysine [73]. Chez l'Homme, une étude a montré que la digestibilité fécale surestimait la digestibilité iléale pour tous les acides aminés sauf la lysine, l'isoleucine, l'alanine et la méthionine, avec un écart de 10% en moyenne [247].

Les modèles animaux sont fréquemment utilisés pour l'évaluation en routine de la digestibilité fécale de l'azote. Le modèle porc a été validé pour caractériser la digestibilité fécale de l'azote chez l'Homme [249,250], avec une bonne corrélation entre les deux espèces (r^2 = 0,95) [38]. D'après Deglaire *et al*., sa mesure chez le rat la surestimerait par rapport à une évaluation chez l'Homme, à hauteur de 13% pour la digestibilité fécale apparente et de 3% pour la digestibilité vraie, avec une bonne corrélation entre les deux espèces (r^2 = 0,92) [132]. Le rat ne possède pas de côlon sigmoïde et son cæcum est plus grand que celui de l'Homme, relativement à la taille totale de l'appareil digestif [251]. Ces particularités anatomiques entraînent probablement des différences dans l'utilisation microbienne de l'azote non absorbé. Par conséquent, la digestibilité de l'azote et des acides aminés mesurée au niveau iléal serait plus comparable entre les espèces [252,253]. Par ailleurs, la digestibilité fécale chez le rat peut être surestimée par la coprophagie en empêchant le recueil de la totalité des pertes digestives [241].

La digestibilité fécale est admise à l'échelle de l'azote mais pas des acides aminés, or les acides aminés peuvent avoir des digestibilités différentes. Dans une étude évaluant la digestibilité iléale des acides aminés de deux sources protéiques chez l'Homme, sa valeur variait de 89% à 97% selon les acides aminés pour le soja et de 92% à 99% pour la protéine totale de lait [123]. Peu de données de digestibilité iléale des acides aminés sont disponibles chez l'Homme et chez le rat. Les démarches d'amélioration

des protocoles se heurtent à des limites méthodologiques, la mesure des pertes digestives au niveau iléal étant difficile à mettre en œuvre et plus coûteuse. La FAO souligne la nécessité de faire évoluer les méthodes de mesure de la digestibilité mais reconnait que tant que l'on ne dispose pas de plus de données, la digestibilité fécale de l'azote peut être utilisée comme un indicateur de la biodisponibilité des acides aminés individuels [34]. Cependant, les digestibilités iléale et fécale sont mal corrélées (r^2= 0,67 en modèle porc, r^2 = 0,27 en modèle rat [253]) et la mise en place d'un facteur de correction entre les deux mesures est difficilement envisageable. Le développement d'une méthode standardisée pour caractériser la digestibilité iléale des acides aminés chez l'Homme comme chez l'animal semble primordial.

4.2. Mesure de la digestibilité iléale des acides aminés en modèle animal

Les modèles définis par la FAO pour mesurer la digestibilité iléale des acides aminés sont l'Homme, le porc et le rat. Il est techniquement et économiquement difficile de l'évaluer chez l'Homme en routine et les modèles animaux représentent une alternative largement utilisée, bien qu'éthiquement questionnables.

Mesure de la digestibilité iléale chez le rat

La digestibilité iléale vraie des acides aminés s'évalue chez le rat par administration d'un régime contenant la protéine à tester à hauteur de 10% m.s, après une période d'adaptation d'au moins 5 jours [38]. Le recueil des digesta iléaux chez le rat doit se faire par euthanasie et dissection, sa petite taille étant incompatible avec la pause d'une canule intestinale et une collecte continue tout au long du processus de digestion [37]. Il se fait à un instant donné, ce qui ne permet pas de collecter l'intégralité des pertes digestives iléales. Le recours à un marqueur indigestible permet de rapporter les pertes recueillies à la quantité ingérée correspondante [37]. Cette méthode a été étudiée essentiellement chez le porc mais elle est également utilisable en modèle rat [254,255]. Les marqueurs généralement utilisés sont le dioxyde de titane et l'oxyde de chrome [38]. Les cendres insolubles dans l'acide (célite) sont également un marqueur envisageable [256]. La digestibilité apparente s'obtient à partir de la concentration du marqueur indigestible mesurée dans les digesta, selon l'équation suivante :

$$\text{Digestibilité iléale apparente (\%)} = \left(1 - \frac{AA_{digesta}}{AA_{repas}} \times \frac{M_{digesta}}{M_{repas}}\right) \times 100$$

Où $AA_{digesta}$ et AA_{repas} correspondent aux concentrations en acide aminé (g/kg m.s) respectives dans les digesta et le repas et $M_{digesta}$ et M_{repas} correspondent aux concentrations en marqueur (g/kg m.s) respectives dans les digesta et le repas. Le repas peut être administré continuellement sous forme de petites portions (généralement toutes les heures) et la dissection et le prélèvement du contenu iléal

sont réalisés entre 5 et 6 heures après la première ingestion [122,254,257]. Cette procédure permet d'assurer un débit intestinal constant et d'augmenter la quantité du contenu iléal, qui est souvent trop faible chez le rat par rapport aux besoins analytiques. Une méthode alternative consiste à administrer un repas unique et à recueillir les digesta à un instant défini, généralement entre 4 et 8 heures après ingestion, temps nécessaire au bolus pour atteindre le cæcum tout en minimisant la fermentation et le passage dans le côlon [81]. La digestibilité iléale est parfois estimée à partir des pertes cæcales, le cæcum étant hypothétiquement considéré comme un lieu de stockage des pertes iléales. Cette procédure est décrite dans le rapport de l'AFSSA 2007 [81] et a été suivie dans plusieurs études chez le rat [171,184]. Elle s'accompagne du recueil intégral des contenus du tube digestif pour réaliser le bilan de matière et se passer de l'utilisation d'un marqueur indigestible pour le calcul de la digestibilité [132,258,259]. En effet, les méthodes ayant recours à un marqueur sont souvent limitées par sa récupération insuffisante [37,260,261]. Le taux de récupération du marqueur indigestible peut être influencé par la composition du régime, en étant notamment réduit par la présence de fibres [37].

D'après Deglaire *et al.*, il existe une bonne corrélation entre les digestibilités iléales mesurées chez le rat et chez l'Homme, avec un coefficient plus élevé pour la digestibilité vraie (r^2 = 0,91) par rapport à la digestibilité apparente (r^2 = 0,83) [132]. Le rat apparaît comme un modèle approprié pour l'évaluation de la digestibilité iléale des protéines végétales (soja) comme des protéines animales (lait) [254,258]. Le rat en croissance est préconisé par rapport au rat adulte pour une meilleure représentativité de l'Homme [132]. Cependant, des données suggèrent que les rats pourraient être plus aptes à digérer certaines protéines peu digestibles chez l'Homme, comme la protéine de colza, pour laquelle la digestibilité iléale vraie de l'azote était de 84-87% chez l'Homme contre 95% chez le rat [152,262]. Cette faible digestibilité chez l'Homme s'expliquerait par la résistance des napines à l'hydrolyse [152].

Mesure de la digestibilité iléale chez le porc

Le système gastro-intestinal du porc en croissance est très similaire anatomiquement et physiologiquement à celui de l'Homme adulte (de la bouche à l'iléon) [253] et fait de lui un modèle largement utilisé en nutrition humaine [263,264]. Le porc a aussi l'avantage d'être omnivore avec une prise alimentaire rythmée par des repas. L'évaluation de la digestibilité iléale des acides aminés chez le porc se fait par des méthodes chirurgicales impliquant la pose d'une canule digestive [265,266] ou l'iléostomie [267]. La grande taille de l'animal permet de recueillir une quantité importante de digesta, contrairement au modèle rat. La canule est généralement placée en « T » dans l'iléon terminal et permet de collecter les effluents de manière non exhaustive, d'où la nécessité d'utiliser un marqueur non absorbable [258]. Théoriquement, le recueil intégral des digesta se passe de l'usage d'un marqueur. Par ailleurs, le modèle porc permet de pratiquer des approches alternatives et des évaluations de

routine. Le Gall *et al*. mettent en œuvre l'anastomose iléo-rectale, une intervention chirurgicale qui consiste à enlever l'intégralité du côlon et à suturer l'iléon au rectum. Ces études visent à identifier les pertes digestives iléales ou les protéines endogènes par immunotransfert et spectrométrie de masse [158,268] pour caractériser la digestion de protéines spécifiques.

Une étude comparative entre des Hommes et des porcs iléostomisés nourris avec une combinaison de sources protéiques n'a pas révélé de différence de digestibilité iléale vraie, à l'exception de 4 acides aminés, mais a montré une digestibilité iléale apparente plus faible chez le porc (5% en moyenne) [247]. Une autre étude menée sur des porcs canulés confirme la proximité des digestibilités iléales vraies entre les deux espèces pour la protéine de colza et la caséine. Les valeurs n'étaient différentes que pour 5 acides aminés, en moyenne 3% plus élevées chez le porc par rapport à l'Homme [174].

Un modèle consiste à utiliser le porc canulé comme substitut de l'Homme pour évaluer la digestibilité iléale en routine, en particulier pour comparer les sources protéiques entre elles, avec l'utilisation d'équations de régression pour passer d'une espèce à l'autre [174]. Dans ce protocole suggéré par Moughan et Rutherfurd, les pertes endogènes seraient mesurées pour chaque animal individuellement par la méthode Enzyme-Hydrolyzed Casein (EHC, cf. paragraphe 4.3) [87]. La mise au point d'équations de prédiction statistiquement robustes permettrait de transposer un grand nombre de données existantes chez le porc à l'Homme adulte [66]. Les limites du modèle porcin dans l'évaluation de la digestibilité des protéines sont liées au coût des protocoles, aux difficultés de mise en œuvre, et aux considérations éthiques, en particulier dans le cas des canules permanentes. Malgré la bonne corrélation des mesures de digestibilité iléale des protéines entre le porc et l'Homme pour un certain nombre de protéines animales et végétales, la FAO souligne la nécessité d'augmenter les données en caractérisant le maximum de sources de protéines et de régimes [38].

4.3. Estimation des pertes endogènes

Nature des pertes endogènes

Les pertes iléales endogènes sont les acides aminés des protéines synthétisées par l'organisme, sécrétées dans la lumière intestinale, et qui n'ont pas été digérées et réabsorbées avant d'atteindre l'iléon distal [269]. Elles sont constituées de mucoprotéines, d'enzymes digestives, de cellules intestinales desquamées, et des poils ingérés dans le cas des modèles animaux [270]. Les protéines bactériennes sont souvent comptabilisées parmi ces pertes, malgré qu'elles ne soient pas strictement d'origine endogène. Chez l'Homme, les pertes endogènes sont de l'ordre de 1-2 g/jour contre 0,7-1,2 g/jour pour les pertes exogènes (alimentaires) [123,177]. Elles représentent 60% du flux total d'acides

aminés en sortie d'iléon, chez l'Homme [123,239] comme chez le porc [37,91], d'où l'importance de les différencier de la part exogène dans les mesures de digestibilité des protéines.

Les pertes endogènes se subdivisent en pertes basales, dites obligatoires, et en pertes spécifiques, qui varient selon la composition du régime [271] (**Figure 9.A.**). On différencie la digestibilité iléale apparente (AID) de la digestibilité iléale vraie (TID) et de la digestibilité iléale standardisée (SID) selon la proportion d'acides aminés iléaux intégrés dans le calcul. La digestibilité apparente s'obtient en déduisant le flux iléal total d'acides aminés (AA endogènes + AA exogènes) des acides aminés ingérés. La digestibilité vraie s'obtient en corrigeant la digestibilité apparente par les pertes endogènes totales. Dans le cas de la digestibilité standardisée, la digestibilité apparente est corrigée par les pertes endogènes basales uniquement [37].

$$\text{Digestibilité iléale apparente (AID, \%)} = \frac{AA_{\text{ingéré}} - AA_{\text{iléon}}}{AA_{\text{ingéré}}} \times 100$$

$$\text{Digestibilité iléale vraie (TID, \%)} = \frac{AA_{\text{ingéré}} - (AA_{\text{iléon}} - AA_{\text{endogène total}})}{AA_{\text{ingéré}}} \times 100$$

$$\text{Digestibilité iléale standardisée (SID, \%)} = \frac{AA_{\text{ingéré}} - (AA_{\text{iléon}} - AA_{\text{endogène basal}})}{AA_{\text{ingéré}}} \times 100$$

La digestibilité apparente des acides aminés est par définition plus basse que les digestibilités vraie et standardisée et varie selon la teneur en protéines du régime (**Figure 9.B.**) [37]. Elle augmente de manière non linéaire avec le niveau d'acides aminés alimentaire car l'augmentation d'apport protéique réduit la contribution relative des acides aminés endogènes par rapport aux acides aminés totaux dans l'iléon [272,273].

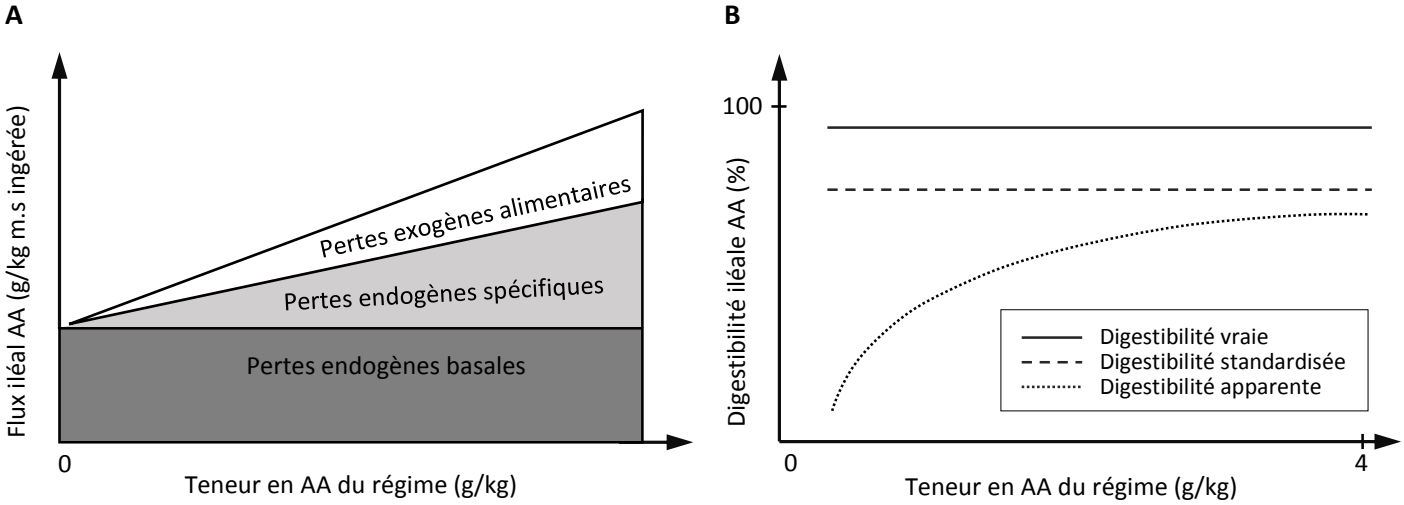

Figure 9. A. Décomposition du flux d'azote iléal. **B.** Représentation schématique des digestibilités apparente, vraie, et standardisée (reproduit d'après Stein *et al*. [37])

Méthodes de mesure des pertes endogènes

Plusieurs méthodes existent pour mesurer les pertes endogènes. Les pertes endogènes basales peuvent être estimées par le biais d'un régime exempt de protéine (protéiprive). Le recueil des pertes se fait après une période d'adaptation, généralement 4 jours [59], nécessaire à l'évacuation des acides aminés exogènes du tube digestif. La part endogène peut être déterminée à partir des concentrations d'un marqueur non absorbable (cf. paragraphe 4.2) selon l'équation suivante [37] :

$$\text{Pertes endogènes basales AA (g/kg m.s ingérée)} = AA_{digesta} \times \frac{M_{repas}}{M_{digesta}}$$

Où $AA_{digesta}$ correspond à la concentration en acide aminé (g/kg m.s) dans les digesta iléaux, et $M_{digesta}$ et M_{repas} correspondent aux concentrations en marqueur (g/kg m.s) respectives dans les digesta et le repas. Le régime protéiprive est la méthode de référence recommandée [37] mais on lui reproche sa nature non-physiologique par le manque de stimulation du tube digestif [87]. En effet, l'alimentation par un régime sans protéine peut entraîner une réduction de la sécrétion d'enzymes gastriques et pancréatiques [258] et une diminution du taux de synthèse protéique dans l'intestin et l'ensemble de l'organisme [274]. Ces effets entraîneraient une sous-estimation des pertes endogènes totales d'acides aminés [275–278] et la surestimation des pertes endogènes de proline et de glycine [276,279]. Les pertes endogènes basales peuvent être mesurées par une méthode plus physiologique, qui consiste à alimenter le sujet avec des peptides de faible poids moléculaire issus généralement de l'hydrolyse de la caséine (Enzyme-Hydrolyzed Casein, EHC) [280]. Les digesta iléaux sont traités par ultrafiltration pour éliminer les peptides inférieurs à 10 kDa et les acides aminés libres, la fraction restante représentant la matière endogène. Cette technique a été utilisée dans plusieurs études chez le rat [122,254,257], l'incertitude principale étant l'hypothèse selon laquelle la contribution endogène aux digesta iléaux se ferait entièrement sous forme de protéines ou de peptides de haut poids moléculaire (> 10 kDa), ce qui n'est pas toujours le cas [276]. Une alternative proposée par certains auteurs consisterait à utiliser un régime supplémenté par une protéine entièrement digestible, comme la protéine de jaune d'œuf, afin de stimuler le tube digestif sans alimenter l'iléon terminal en acides aminés alimentaires [250,276,281].

Il n'existe pas de procédure validée pour mesurer les pertes endogènes spécifiques, mais elles s'estiment en pratique par différence entre les pertes endogènes totales et basales. Les pertes endogènes totales peuvent être mesurées par les techniques de l'homo-arginine [280] ou de la dilution isotopique, cette dernière étant plus fréquemment utilisée. La méthode de la dilution isotopique vise à mesurer directement le flux endogène d'un acide aminé marqué au ^{15}N, et a été mise en œuvre pour la leucine chez l'Homme [50,88,282] et le porc [175,281,283,284]. Le sujet est perfusé à la leucine ^{15}N jusqu'à atteindre un plateau d'enrichissement isotopique dans les acides aminés plasmatiques. La mesure de

l'enrichissement de la leucine dans le plasma et dans les digesta iléaux permet d'estimer les pertes endogènes à partir de l'équation suivante :

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

Où $\text{Leucine}_{\text{digesta}}$ désigne la quantité de leucine dosée dans les digesta iléaux, et $^{15}\text{N}_{\text{digesta}}$, $^{15}\text{N}_{\text{repas}}$, $^{15}\text{N}_{\text{plasma}}$ correspondent aux enrichissements en ^{15}N respectifs dans les digesta iléaux, le repas, et le plasma. La digestibilité des autres acides aminés doit également être estimée indirectement à partir des résultats de l'acide aminé marqué. Ces deux procédures sont laborieuses, coûteuses et nécessitent un équipement spécialisé. De plus, un seul acide aminé est marqué et est supposé être représentatif des autres. Ainsi, l'usage de la digestibilité standardisée est pour l'instant recommandée en nutrition humaine et animale [37,73], même si sa valeur est inférieure à la digestibilité vraie [175] (**Tableau 9**).

Une autre méthode consiste à discriminer directement les pertes endogènes et exogènes d'azote par marquage isotopique des protéines alimentaires par des isotopes stables, généralement le ^{15}N [73,123] ou le ^{2}H (cf. paragraphe 4.4). On utilise dans ce cas le terme « digestibilité réelle ». Cette technique permet de marquer tous les acides aminés mais présente aussi des inconvénients, dus principalement au coût important et à la disponibilité réduite des protéines marquées. De plus, le marquage des protéines du régime pourrait sous-estimer les pertes endogènes par recyclage rapide des acides aminés alimentaires dans les sécrétions endogènes, mais reste une méthode largement recommandée [284].

Variabilité des pertes endogènes

De nombreux facteurs influencent les sécrétions endogènes intestinales d'acides aminés, comme la composition du régime et sa teneur en protéines, ainsi que les paramètres liés à l'individu tels que le poids corporel et l'âge [37]. Les pertes endogènes basales sont indépendantes des ingrédients du régime. Leur flux journalier augmente avec la prise alimentaire, mais diminue lorsqu'elles sont rapportées à la matière sèche ingérée [285]. Le poids corporel pourrait également contribuer aux variations des pertes endogènes iléales d'acides aminés [286]. Les pertes spécifiques s'ajoutent aux pertes basales en étant induites par des caractéristiques spécifiques des ingrédients du régime. Elles sont minimales lors de l'ingestion de protéines purifiées hautement digestibles, comme la caséine ou la protéine d'œuf, mais peuvent être considérablement augmentées par la présence de fibres et de facteurs antinutritionnels comme les inhibiteurs de la trypsine et la lectine de soja [73,287].

Des études ont montré que la source de protéine alimentaire ingérée impactait les pertes endogènes d'acides aminés. Leterme *et al*. ont mis en évidence que le porc nourri avec du blé aurait plus de pertes

endogènes iléales que sous un régime à base de pois [281]. Le type de protéine alimentaire pourrait moduler la quantité d'azote endogène recueillie dans l'intestin [51,155,288]. D'après une étude de Gaudichon *et al*. évaluant la digestibilité iléale de protéines marquées au ^{15}N chez l'Homme, l'ingestion de protéines de soja induirait un débit iléal d'azote plus élevé que l'ingestion de protéines de lait, par une contribution plus importante des pertes d'acides aminés endogènes [123]. Un phénomène similaire est décrit chez le porc nourri avec des protéines de soja ou de lait [289]. Les facteurs antinutritionnels des végétaux tels que les tanins, les lectines et les inhibiteurs de trypsine ainsi que les fibres seraient à l'origine des pertes endogènes plus importantes [87]. La forme de l'azote alimentaire (protéines, petits peptides ou acides aminés libres) aurait également un effet sur les taux de sécrétion et réabsorption des protéines endogènes dans l'intestin grêle chez l'Homme [290].

Chez l'Homme, les pertes endogènes iléales d'azote sont majoritairement constituées de glycine, de proline, d'acide aspartique et glutamique, et de thréonine [123,282]. La contribution importante de la glycine, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique pourrait provenir des sécrétions biliaires, des mucines et des acides aminés bactériens [291]. La quantité et la composition des pertes endogènes varient selon l'espèce étudiée. Le flux d'azote endogène (mg/g m.s ingérée) est plus élevé de 45% chez l'Homme par rapport au rat (**Tableau 15**) [132]. Sa composition est en revanche relativement similaire entre les deux modèles à l'exception de l'acide glutamique, trois fois plus élevée chez le rat. Chez le porc, la proline a la contribution majoritaire aux pertes endogènes et son flux iléal est doublé par rapport à l'Homme.

Tableau 15. Composition en acides aminés du flux iléal d'azote endogène déterminée chez le rat, le porc et l'Homme nourris par un régime protéiprive (reproduit d'après Deglaire *et al.* [132])

	Rat	Porc	Homme
Nombre d'études	6	9	3
N (µg/g m.s ingérée)	1346 ± 436	1678 ± 188	1952 ± 172
Nombre d'études	3	9	3
AAI (g/16g N)			
His	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,2	2,7 ± 0,5
Ile	2,4 ± 0,1	2,9 ± 0,7	2,6 ± 0,3
Leu	4,1 ± 0,4	4,4 ± 0,6	5,0 ± 0,5
Phe	2,7 ± 0,4	2,5 ± 0,4	3,0 ± 0,5
Lys	3,1 ± 0,5	3,3 ± 1,0	4,8 ± 1,7
Thr	5,9 ± 1,2	5,0 ± 0,9	6,1 ± 0,6
Tyr	2,5 ± 0,2	2,6 ± 1,1	2,9 ± 0,4
Val	3,8 ± 0,3	3,9 ± 1,2	4,6 ± 0,2
Met	-	1,1 ± 0,8	0,8 ± 0,2
Cys	0,8	1,2 ± 0,6	2,6 ± 1,2
Trp	-	0,9 ± 0,5	1
AANI (g/16g N)			
Ala	3,4 ± 0,2	4,6 ± 1,4	3,4 ± 0,3
Asp	10,4 ± 1,1	6,5 ± 0,9	7,1 ± 0,6
Glu	13,5 ± 5,5	7,6 ± 1,8	4,5 ± 1,2
Pro	7,5 ± 0,3	14,4 ± 6,4	5,4 ± 1,0
Ser	7,3 ± 3,2	4,5 ± 0,7	4,7 ± 0,5
Gly	8,7 ± 2,5	8,4 ± 2,3	7,6
Arg	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,6	4,2 ± 1,5

AAI, Acides aminés indispensables ; AANI, Acides aminés non indispensables

4.4. Mesure de la digestibilité iléale des acides aminés chez l'Homme

La digestibilité iléale des acides aminés a été évaluée chez l'Homme au cours des 30 dernières années à l'aide de différents protocoles. Sa détermination directe basée sur la mesure des pertes iléales est généralement menée sur des sources de protéines marquées au ^{15}N, ^{13}C ou ^{2}H, ou à l'aide d'un groupe protéiprive pour estimer les pertes endogènes. Dans le cas de protéines non marquées, l'alimentation par un régime protéiprive chez l'Homme n'est possible que sur une durée très restreinte, insuffisante pour permettre une adaptation des fonctions intestinales, ce qui peut amener à une surestimation des pertes endogènes [292]. L'utilisation des protéines marquées est donc plus précise en étude clinique. La digestibilité des acides aminés peut également être étudiée par une nouvelle méthode indirecte basée

sur l'enrichissement isotopique plasmatique, dite méthode double traceur, en cours de développement [41].

Marquage des protéines alimentaires

Le marquage des protéines végétales à l'azote ^{15}N est réalisé dans la plante en croissance par l'apport d'engrais azotés enrichis, généralement le nitrate d'ammonium ($^{15}NH_3{}^{15}NO_3$) [56,152,154] ou le nitrate de potassium ($K^{15}NO_3$) [155,293]. Il est aussi possible sur les animaux, notamment les ruminants (lait [51,123,294] et viande bovine [153]), chez lesquels les sels d'ammonium sont digérés par les bactéries du rumen, qui produisent alors des acides aminés marqués. Ainsi, l'administration de sulfate d'ammonium enrichi ($(^{15}NH_4)_2SO_4$) par voie orale ou dans le rumen permet au marquage d'être incorporé aux protéines corporelles. Concernant les monogastriques, le marquage des protéines de l'œuf a été mené dans plusieurs études par l'incorporation d'acides aminés ^{15}N dans l'alimentation des poules [179,295]. L'azote 15 permet un marquage uniforme entre les acides aminés, mais il n'est pas approprié pour suivre leurs squelettes carbonés à cause des réactions de transamination qui intervertissent les marqueurs [38]. Ils peuvent en revanche être tracés par le ^{13}C ou le deutérium (^{2}H). Le marquage des végétaux au ^{2}H se fait grâce à l'apport d'eau lourde par arrosage après la floraison [41,43,44], ou dans l'eau de boisson dans le cas des sources animales [42]. Il a surtout été réalisé sur des légumineuses jusqu'à présent mais est applicable aux autres sources de protéines [38]. Van Vliet *et al*. ont notamment démontré la faisabilité du marquage de l'œuf et de la viande de poulet à la L-leucine [5,5,5-$^{2}H_3$] par l'alimentation des poules, pour une utilisation en recherche sur la nutrition humaine [296]. Le marquage au ^{13}C sur l'ensemble des acides aminés est très coûteux et difficilement abordable pour les plantes, qui doivent être placées dans des enceintes sous une atmosphère enrichie en $^{13}CO_2$. Il est peu réalisé sur les animaux de grande taille, pour lesquels le marquage est réalisé par perfusion d'un acide aminé marqué, par exemple dans la mamelle pour le marquage du lait [297,298]. L'incorporation d'un mélange d'acides aminés ^{13}C dans l'alimentation de poules a mené à un marquage intrinsèque mais non uniforme sur tous les acides aminés de l'œuf, et s'est avéré extrêmement couteux [295].

Méthodes de recueil des digesta iléaux (iléostomie, sonde naso-iléale)

Chez l'Homme, les digesta iléaux sont recueillis en continu après ingestion de la protéine à tester par des volontaires iléostomisés ou par des sujets sains intubés avec une sonde naso-iléale. L'iléostomie provoque une modification de l'iléon terminal, qui développe une flore microbienne pour assumer certaines fonctions du gros intestin absent ou dysfonctionnel [247,299,300]. Les effluents collectés par cette méthode ne sont donc pas forcément représentatifs des pertes digestives d'un sujet sain [246,258], et le recrutement de volontaires iléostomisés est laborieux. Une étude menée par Evenepoel *et al*. sur 5 sujets iléostomisés rapporte une digestibilité iléale de 90,9% et 51,3% pour la protéine d'œuf cuite et

crue marquée au ^{15}N [179], plus faible que les valeurs obtenues en modèle animal ou chez l'Homme au niveau fécal [81,86]. Moughan *et al*. ont eu recours au sujet humain iléostomisé pour évaluer la digestibilité iléale des acides aminés de la protéine de soja en comparaison aux protéines de lait, qui se sont toutes deux révélées presque entièrement digestibles et en accord avec la littérature [176]. Cette étude valide également la mesure de la digestibilité en aigüe chez l'Homme, par contraste avec une adaptation au régime qui peut être réalisée sur plusieurs semaines en modèle animal.

La méthode de la sonde naso-iléale a été appliquée dans une série d'études de notre unité et a fourni des données de digestibilité iléale réelle de nombreuses sources de protéine chez le sujet sain adulte. Des valeurs de digestibilité azotée de 89,4%, 91,0%, 91,0%, 60,2%, 94,1%, 95,5%, et 94,1% ont notamment été trouvées pour le pois [56], le lupin [156], l'isolat de protéine de soja [155], la zéine (protéines non marquées) [157], et la caséine [174] respectivement. Cette méthode a également permis d'évaluer la digestibilité iléale réelle des acides aminés de différentes protéines chez l'Homme [123]. Pour la protéine de soja, la digestibilité variait de 89,0% pour la thréonine à 96,8% pour la tyrosine tandis que pour la protéine de lait, elle se situait entre 91,6% pour la glycine et 99,3% pour la tyrosine. Ces méthodes ont l'inconvénient d'être invasives et coûteuses et sont inappropriées pour l'évaluation de routine de la qualité des protéines ou l'étude de populations particulières. La FAO a souligné la nécessité de mettre au point un protocole faiblement invasif basé sur les signatures isotopiques plasmatiques, dite méthode « double traceur », qui est en cours de validation.

Méthode double traceur

La méthode double traceur est une méthode indirecte basée sur une approche multitraceur plasmatique permettant de s'affranchir du recours à la sonde et des difficultés méthodologiques liées à la détermination des pertes endogènes. Elle repose sur l'ingestion simultanée d'une protéine d'intérêt dont on veut déterminer la digestibilité des acides aminés et d'une protéine de référence. Chacune est marquée par un isotope stable, le ^{2}H est recommandé pour la protéine test et le ^{13}C pour la référence [38]. L'usage du ^{15}N pour la protéine test est possible [301] mais à cause des transaminations, le marquage ^{2}H est préférable. Les acides aminés circulants ne sont pas le reflet direct des acides aminés absorbés parce qu'ils sont captés par les tissus et qu'une partie est oxydée, d'où la nécessité de faire intervenir une protéine de référence. Il est nécessaire pour cela de connaître précisément la digestibilité de la référence, et l'hypothèse est faite que l'extraction splanchnique d'un même acide aminé est similaire entre les deux protéines. La comparaison du rapport $^{2}H/^{13}C$ dans le repas et dans le plasma pour un acide aminé donné reflète sa digestibilité dans la protéine d'intérêt relativement à la référence (**Figure 10**). À titre d'exemple, un ratio $^{2}H/^{13}C$ plus faible dans le plasma par rapport au

repas signifie que la digestibilité de l'acide aminé concerné est plus faible pour la protéine d'intérêt que pour la protéine de référence. D'après les recommandations de la FAO, la protéine de référence est une source commerciale de protéine unicellulaire hautement et uniformément enrichie par un isotope stable [38]. Elle doit être hautement digestible et culturellement acceptable. Il n'est pas nécessaire que sa composition en acides aminés soit aussi équilibrée que celles des protéines de haute qualité nutritionnelle, comme la protéine d'œuf ou de lait. Les protéines de microalgues comme la spiruline semblent répondre à ces critères et sont suggérées comme référence de la méthode double traceur dans le rapport de la FAO de 2014 [38].

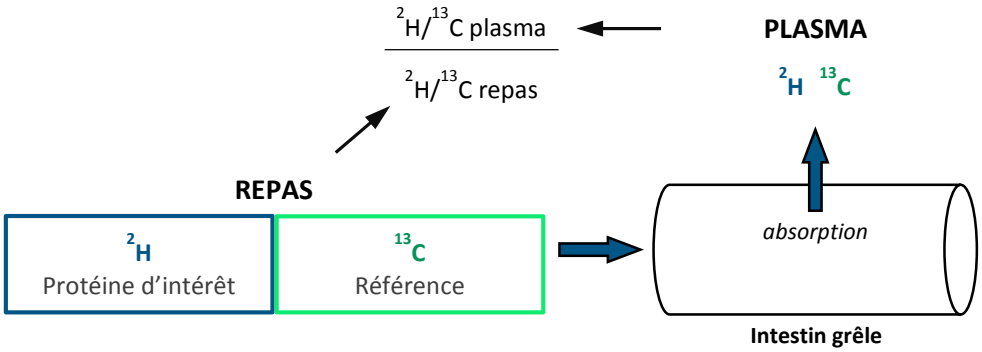

Figure 10. Principe de la méthode double traceur pour la mesure de la digestibilité des acides aminés

La méthode double traceur a été utilisée initialement par Engelen *et al*. pour révéler une malabsorption protéique chez des sujets atteints de mucoviscidose [302]. Elle a été adaptée récemment par l'équipe du St John's Research Institute à Bangalore (Inde) pour évaluer la digestibilité d'acides aminés de diverses protéines marquées au deutérium, avec la spiruline ^{13}C comme référence [41–44]. La digestibilité de la spiruline a été mesurée au préalable par un double traçage faisant cette fois intervenir le ^{13}C en tant que marquage d'intérêt, en prenant pour référence des acides aminés sous forme cristalline marqués au ^{2}H [41]. La digestibilité moyenne des acides aminés obtenue pour la spiruline était de 85,2%, et a été réévaluée à 87,9% dans une étude suivante [45]. Ces valeurs sont faibles par rapport à ce qui est attendu d'une protéine de référence, à savoir une digestibilité proche de 100%. L'étude d'Engelen *et al*. rapportait également une faible digestibilité de 80% pour la spiruline chez l'adulte sain. Le choix de la spiruline en tant que référence a été évalué dans une étude sur la digestibilité de légumineuses par la méthode double traceur chez l'adulte. Des acides aminés algaux ^{13}C ont été testés en tant que référence alternative à la spiruline et les résultats de digestibilité des légumineuses étaient identiques dans les deux cas (pour le haricot mungo, 64% vs 63% de digestibilité en utilisant les AA algaux ou la spiruline comme référence, $P > 0.05$) [43]. La spiruline ou un mélange d'acides aminés libres semblent pouvoir être utilisés l'un comme l'autre en tant que référence dans le cadre de la méthode double traceur. Dans les protocoles menés par l'équipe indienne, les repas sont

administrés sous forme de portions successives pendant 7 heures. Les protéines d'intérêt et de référence sont incorporées dans un repas complet (riz au curry). Les prélèvements sanguins sont réalisés à temps zéro (T0) puis, 5 heures suivant la première ingestion, toutes les demi-heures pendant 3 heures (T5-T8). Les repas continus permettent de générer un plateau d'enrichissement isotopique dans le plasma. Le calcul de la digestibilité s'effectue au plateau, atteint généralement au bout de 6 heures, par l'équation suivante [41] :

$$Dig_{prot}\ (\%) = \frac{{}^{2}H_{plasma}\ /\ {}^{13}C_{plasma}}{{}^{2}H_{repas}\ /\ {}^{13}C_{repas}} \times Dig_{ref} \times F_T \times 100$$

Avec Dig_{prot} et Dig_{ref} la digestibilité respective de la protéine d'intérêt et de la protéine de référence (e.g. spiruline), ${}^{2}H_{plasma/repas}$ et ${}^{13}C_{plasma/repas}$ l'enrichissement respectif en ${}^{2}H$ et en ${}^{13}C$ dans le plasma et le repas par rapport à la valeur basale (T0), et F_T le facteur de correction des réactions de transamination. Cette équation s'applique à un acide aminé donné, son enrichissement spécifique étant mesuré par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse à ratio isotopique (GC-C-IRMS et LC-MS/MS). La méthodologie initialement proposée par la FAO fait intervenir un repas unique, générant non pas un plateau mais un pic d'enrichissement des marqueurs dans le plasma [38]. Les enrichissements plasmatiques peuvent alors être calculés pour chaque acide aminé à partir de l'aire sous la courbe (AUC) sur les 8 heures de prélèvement, et non pas sur un temps réduit.

Ce protocole a permis d'évaluer la digestibilité des acides aminés de protéines de sources animales et végétales, à savoir le pois chiche, le pois jaune, le haricot mungo (écossé ou entier), l'œuf (entier ou isolat), le poulet (blanc de poulet cuit), et la spiruline (**Tableau 9**). Les valeurs de digestibilité moyenne des acides aminés les plus élevées étaient obtenues pour l'œuf et le poulet (92,3% et 92% respectivement) [42] et les plus faibles pour le pois chiche et le haricot mungo (60% et 61,2% respectivement). La digestibilité moyenne obtenue pour le pois jaune était de 71,6%, et les valeurs s'étendaient de 56,1% pour la méthionine à 80,6% pour la phénylalanine [43]. Les résultats obtenus pour les protéines animales sont en adéquation avec les valeurs trouvées par une mesure directe chez l'Homme (e.g. 89,4% [42] vs 90,9% [179] pour l'œuf par la méthode double traceur et iléostomie, respectivement, **Tableau 9**). Dans le cas des sources végétales, la méthode double traceur semble sous-estimer la digestibilité iléale des acides aminés obtenue par la méthode sonde (e.g. 71,6% [43] vs 89,4% [56] pour le pois jaune par la méthode double traceur et sonde, respectivement, soit une sous-estimation de 20%). Les résultats sont également plus bas que les digestibilités iléales évaluées sur les modèles animaux (e.g. 10% de sous-estimation pour le pois-chiche et 20% pour le haricot mungo chez le rat [43,150,303–305]).

La méthode double traceur a l'avantage d'être faiblement invasive, plus rapide, et utilisable à plus grande échelle que la méthode sonde. Elle permet surtout d'étudier les populations particulières et notamment les personnes sensibles (enfants, personnes âgées), pour lesquelles il est possible de réduire le nombre de prélèvements sanguins en se limitant au plateau isotopique (6 h après ingestion d'après Devi *et al*. [41]) ou au pic de l'enrichissement dans le cas d'un repas unique (FAO [38]). Pour que la méthode soit valide, il est cependant nécessaire de s'assurer de l'apparition concomitante des traceurs de la protéine test et de ceux de la protéine de référence dans le plasma [38]. Ainsi, le temps de vidange gastrique est un paramètre à considérer lors de l'élaboration du protocole expérimental. La composition et la texture du repas doivent être choisies de manière à éviter un déphasage entre la protéine d'intérêt et la référence dans l'estomac. La méthode double traceur est encore en phase de développement et nécessite d'être validée par comparaison avec la méthode directe du recueil iléal chez l'Homme, au sein d'un même protocole [38]. Sa validation est d'autant plus nécessaire pour les protéines de digestibilité faible (< 75%) et moyenne (< 85%). Des études comparatives complémentaires peuvent également être menées chez le porc. Les limites de la méthode double traceur sont liées à sa complexité analytique, au recours à des étapes intermédiaires pour la détermination de plusieurs facteurs de corrections (e.g. taux de transamination). Comme toute méthode isotopique, elle engendre des coûts non négligeables liés au protocole de marquage et se limite aux aliments qui peuvent être marqués intrinsèquement au ^{2}H.

Résumé méthodes de mesure de la digestibilité *in vivo*

– –

La digestibilité s'évalue préférablement au niveau iléal, sa mesure fécale sous-estimant les pertes digestives, et individuellement pour chaque acide aminé. Cependant, l'évaluation de la digestibilité iléale est soumise à des difficultés méthodologiques. Les modèles d'étude pertinents sont l'Homme, le porc et le rat, selon cet ordre de préférence. Chez l'Homme et le porc, l'usage d'une sonde naso-iléale ou de méthodes chirurgicales (iléostomie, canule digestive pour le porc) permet de collecter le contenu de l'iléon en continu et de doser les pertes digestives dans leur intégralité. Chez le rat, le recueil des digesta se fait par euthanasie à un temps donné, ce qui nécessite l'utilisation d'un marqueur indigestible pour ramener les pertes à une quantité ingérée appropriée. Il est également envisageable d'utiliser la digestibilité caecale à la place de la digestibilité iléale. Quel que soit le modèle, il est nécessaire de retrancher la part endogène des pertes totales d'azote et d'acides aminés pour mesurer une digestibilité vraie. L'évaluation des pertes endogènes passe généralement par l'administration d'un régime protéiprive ou par d'autres techniques comme l'ingestion de peptides ou la dilution isotopique. La méthode la plus pertinente est la discrimination directe entre les pertes endogènes et exogènes par marquage des protéines alimentaires avec des isotopes stables, généralement le ^{15}N ou le ^{2}H, mais la technique est coûteuse. Chez l'Homme, l'évaluation directe de la digestibilité iléale nécessite la pose d'une sonde naso-iléale très invasive ou le recourt à des volontaires iléostomisés, dont le recrutement est complexe. C'est pourquoi une nouvelle méthode indirecte double traceur basée sur l'enrichissement isotopique plasmatique est suggérée par la FAO. Elle fait intervenir le double marquage d'une protéine d'intérêt et d'une protéine de référence hautement digestible, la digestibilité de la protéine d'intérêt étant calculée à partir de l'enrichissement plasmatique du marqueur de la référence. Cette méthode nécessite d'être validée par comparaison directe avec un protocole de recueil iléal, mais faciliterait l'évaluation de la digestibilité des acides aminés chez l'Homme, notamment pour les populations sensibles (enfants, personnes âgées…).

CHAPITRE 2 – TRAVAUX DE THESE

1. Objectifs généraux

Dans le contexte actuel de transition vers une alimentation plus durable, la stratégie vise notamment à identifier des alternatives végétales aux protéines d'origine animale [306–308,32]. La qualité nutritionnelle de ces nouvelles sources doit être évaluée, tout comme les effets des procédés technologiques dont elles sont issues et des modes de préparation avant consommation. Il est pour cela nécessaire de disposer de méthodes fiables, représentatives de l'Homme, et réalisables en termes de coût et de temps [38]. Parmi les sources alternatives de protéines, le pois présente de nombreux avantages. Sa teneur en protéines est élevée (24% m.s [29]), sa culture nécessite peu d'intrants et permet de réduire les apports azotés [22]. L'évaluation de sa qualité nutritionnelle est indispensable pour valider son potentiel et éventuellement promouvoir sa culture.

Le projet de thèse visait deux objectifs principaux. Le premier consistait à évaluer la qualité nutritionnelle de la protéine de pois, en comparaison à d'autres sources protéiques. Cette évaluation a été faite par la détermination de la digestibilité iléale vraie des acides aminés (AA), en première intention chez le rat, puis chez l'Homme. D'autres critères de qualité nutritionnelle ont également été caractérisés, comme le score chimique, l'UPPN, le bilan azoté et le PER (cf. paragraphe 3. pour les méthodes). Les protéines évaluées en comparaison au pois étaient la caséine de lait, choisie pour sa haute qualité nutritionnelle, et le gluten de blé, une autre source végétale de protéines mais limitante en lysine. Le second objectif de ces travaux était de développer les méthodes d'évaluation de la digestibilité iléale des AA chez le rat et chez l'Homme. Chez le rat, il s'agissait de comparer plusieurs méthodes d'évaluation de la digestibilité des protéines, selon le site de collecte (iléon ou cæcum) et l'utilisation ou non d'un marqueur non-absorbable. Chez l'Homme, il s'agissait de tester la validité de la méthode double traceur en la comparant à la méthode directe, où les digesta sont recueillis par intubation. Les études chez le rat ont été réalisées sur des protéines non marquées, un groupe protéiprive étant constitué pour la mesure des pertes endogènes d'azote et d'AA. En parallèle des études chez l'animal, des protéines de pois et de la caséine doublement marquées au ^{15}N et au ^{2}H ont été produites pour l'étude clinique qui suivait. Ces travaux ont donné lieu à la rédaction de 4 articles, dont un publié dans *The British Journal of Nutrition* en 2020, et 3 en cours de publication ou de soumission. Un récapitulatif des travaux menés pour chaque étude est présenté en **Tableau 16**.

Tableau 16. Récapitulatif des travaux menés pour chaque article rédigé

Article	Modèle	Objectif	Protéines étudiées	Critères évalués	Statut
1- *Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine*	Rat	Evaluation de la qualité des protéines	Protéine de pois Caséine Gluten Protéine de pois + méthionine Protéine de pois + gluten (PER) (Non marquées)	Digestibilité cæcale vraie des AA Digestibilité fécale vraie de N DIAAS PDCAAS Bilan azoté PER	Publié [309]
2- *Cecal digestibility as an approximation of ileal protein digestibility evaluation in rats*	Rat	Développement méthodologique	Protéine de pois Caséine Gluten (Non marquées)	Influence du site de recueil des digesta (cæcum vs iléon) et de l'utilisation d'un marqueur non-absorbable (Cr_2O_3) sur la digestibilité vraie des AA	En cours de soumission
3- *Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans*	Homme	Evaluation de la qualité des protéines	Protéine de pois Caséine de lait (Marquage ^{15}N)	Digestibilité iléale vraie des AA DIAAS UPPN	En cours de soumission
4- *Comparison of dual tracer and ileal sampling methods in the assessment of amino acid digestibility of pea protein and casein in humans*	Homme	Développement méthodologique	Protéine de pois Caséine de lait (Marquage ^{15}N & ^{2}H) AAs algaux libres (Marquage ^{13}C)	Comparaison de la méthode plasmatique double traceur à la méthode directe (sonde naso-iléale) dans l'évaluation de la biodisponibilité digestive des AA	En cours de soumission

AA : acides aminés, Cr_2O_3 : oxyde de chrome, DIAAS : *Digestible Indispensable Amino Acid Score*, N : azote, PDCAAS : *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*, PER : *Protein Efficiency Ratio*, UPPN : Utilisation Protéique Nette

2. Méthodes utilisées

2.1. Production des protéines doublement marquées

Protéine de pois

Des pois jaunes (*Pisum sativum,* var. *kayanne)* ont été cultivés à l'Unité Expérimentale du Domaine d'Epoisses, INRAE (Bretenière, France) sur 3 micro-parcelles de 12 m^2. Le marquage au ^{15}N a été réalisé par 2 apports de 50 g de nitrate d'ammonium marqué ($^{15}NH_4{}^{15}NO_3$, 10%), le premier au stade 4-6 feuilles et le second à l'apparition des boutons floraux (**Figure 11**). Le marquage au ^2H a été réalisé à la mi-floraison par arrosage à l'eau deutérée (^2H_2O, 99%) à une dose de 20 L par parcelle (60 L au total) pendant 5 jours consécutifs. À maturité, 8 kg de pois ont été récoltés et séchés. Après le tri des graines attaquées par un insecte ravageur (bruche), seulement 5 kg de pois ont été conservés. Les protéines ont été extraites au sein des laboratoires de Roquette par un procédé de paillasse comprenant les phases de concassage, de délayage, de précipitation acide, et de neutralisation. Après pasteurisation et lyophilisation, 450 g d'isolat protéique contenant 12% d'azote et doublement marqué au ^{15}N et ^2H ont été obtenus. Des analyses microbiologiques ont été menées sur l'isolat afin de garantir son innocuité sanitaire dans le cadre de l'étude clinique.

Les enrichissements globaux obtenus pour l'isolat de pois étaient de 0,71 atome pourcent (AP) pour le ^{15}N, soit 2 fois l'enrichissement naturel, et de 0,11 AP pour le ^2H, soit 8 fois l'enrichissement naturel. L'enrichissement des AA individuels variait de 0,67 AP (méthionine) à 0,73 AP (lysine) pour le ^{15}N, et de 0,05 AP (aspartate) à 0,11 AP (phénylalanine) pour le ^2H (**Figure 13**).

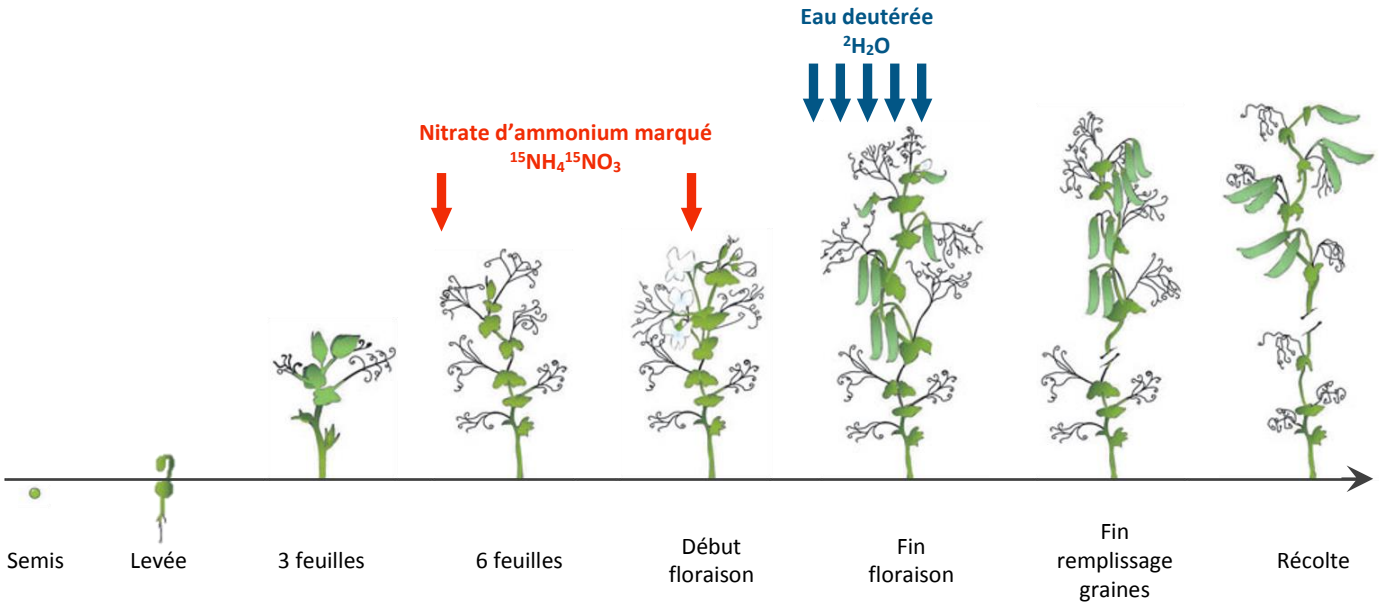

Figure 11. Protocole de marquage des pois sur micro-parcelle

Caséine de lait

Le marquage du lait a été mené au sein de la ferme expérimentale d'AgroParisTech (Thiverval-Grignon) sur une vache laitière de race Prim'Holstein, par un protocole sur 5 jours (J1-J5). Le marquage au ^{2}H a été réalisé par administration d'eau deutérée ($^{2}H_2O$, 99%) pendant 3 jours consécutifs, de J1 à J3, à une dose de 1,8 L/jour (**Figure 12**). Le marquage au ^{15}N a été réalisé par l'apport alimentaire de sulfate d'ammonium marqué ($(^{15}NH_4)_2SO_4$, 99%) à la seringue pendant 4 jours consécutifs, de J2 à J5, à une dose de 100 g/jour. À J5, 40 L de lait marqué ont été collectés sur 2 traites. Après traitement thermique et écrémage, les caséines ont été extraites par ultrafiltration (membrane 10 kDa) suivie d'une microfiltration (membrane 0,1 µm). Après un second traitement thermique et un séchage par lyophilisation, 500 g d'isolat protéique contenant 12,5% d'azote et doublement marqué au ^{15}N et ^{2}H ont été obtenus. Des analyses microbiologiques ont été menées sur l'isolat afin de garantir son innocuité sanitaire dans le cadre de l'étude clinique.

Les enrichissements globaux obtenus pour l'isolat de caséine étaient de 1,75 AP pour le ^{15}N, près de 5 fois l'enrichissement naturel, et de 0,14 AP pour le ^{2}H, soit 10 fois l'enrichissement naturel. L'enrichissement des AA individuels variait de 1,07 AP (tyrosine) à 2,00 AP (aspartate) pour le ^{15}N, et de 0,04 AP (phénylalanine) à 0,18 AP (alanine) pour le ^{2}H (**Figure 13**).

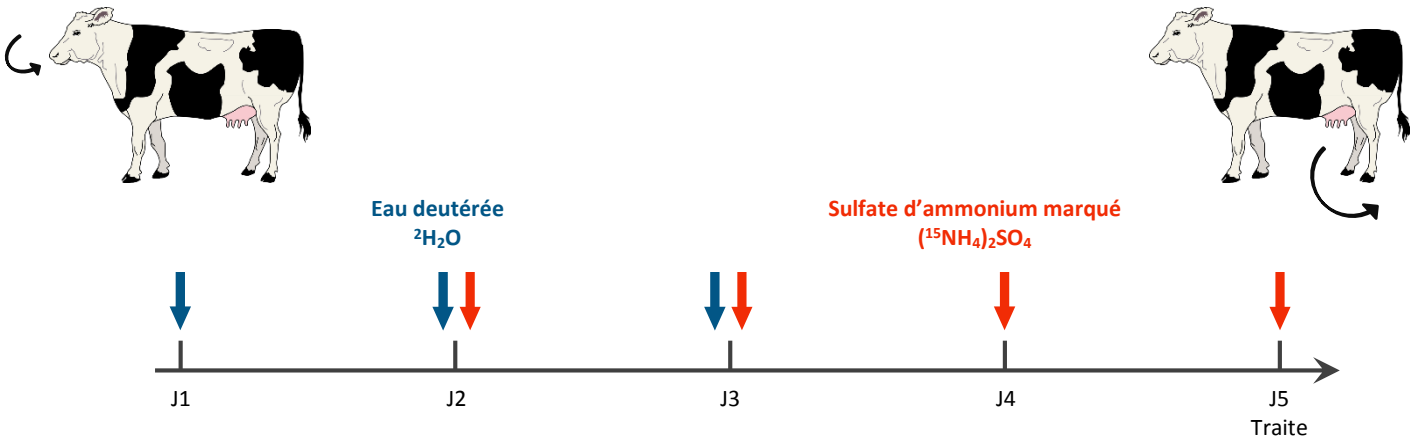

Figure 12. Protocole de marquage du lait

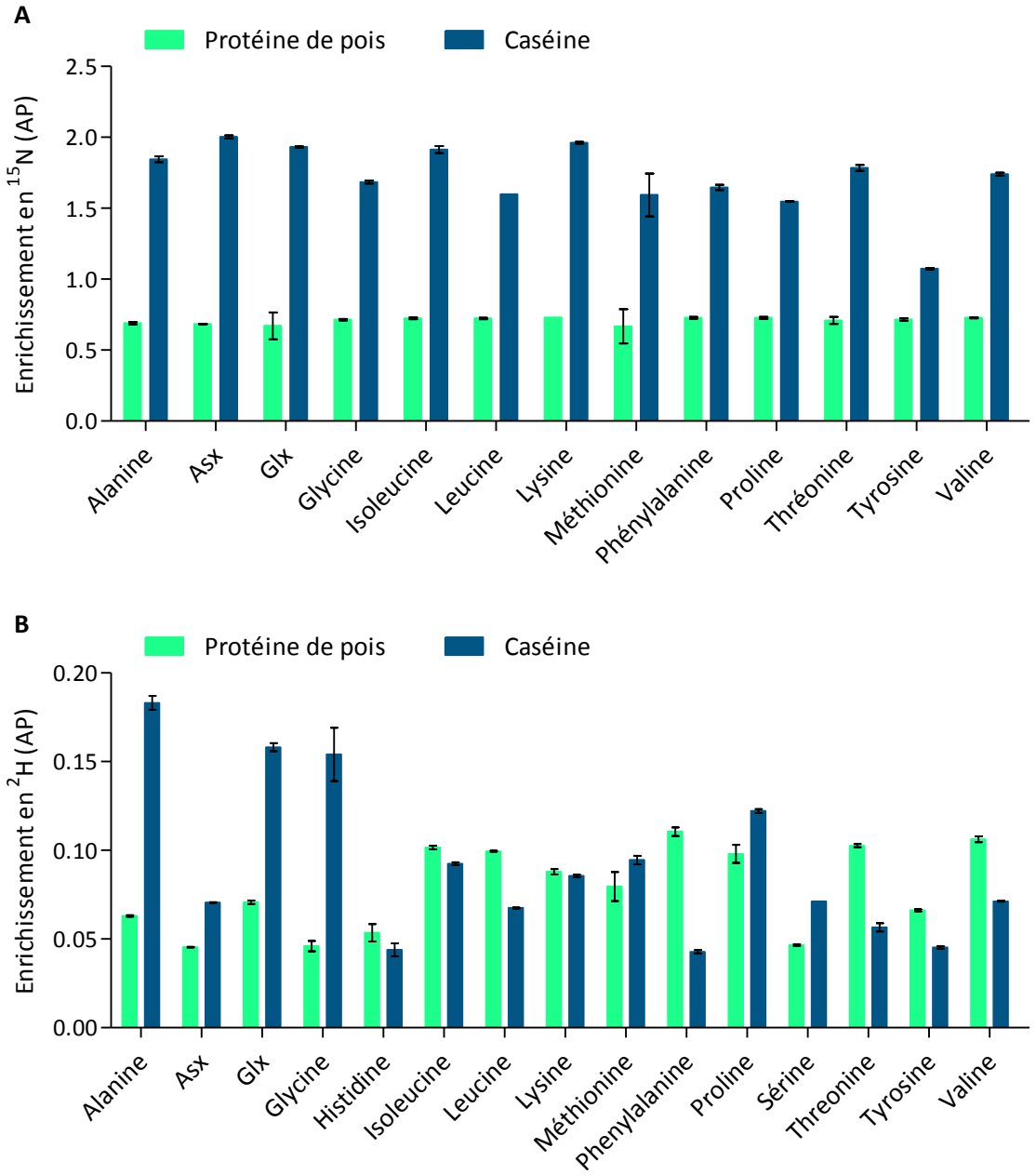

Figure 13. A. Enrichissement en ^{15}N des AA des isolats de pois et de caséine de l'étude clinique.

B. Enrichissement en ^{2}H des AA des isolats de pois et de caséine de l'étude clinique. Asx : asparatate + asparagine, Glx : glutamate + glutamine.

2.2. Mesure de la digestibilité des protéines chez le rat et chez l'Homme

Rat

L'évaluation de la digestibilité fécale de l'azote a consisté à rapporter les pertes azotées fécales à l'azote ingéré [59]. Elle a été menée chez le rat en plaçant les animaux en cages métaboliques pour permettre la collecte exhaustive des fèces et de la nourriture non ingérée, sur une période de 2 jours (Article 1). La pesée quotidienne des gamelles et des restes alimentaires a permis de mesurer précisément la quantité d'azote ingérée.

L'évaluation de la digestibilité iléale de l'azote et des AA chez le rat requiert l'euthanasie de l'animal et le recueil des pertes digestives par dissection à un instant donné (cf. chapitre 1 paragraphe 4.2.). Il n'existe pas de protocole standardisé, et deux méthodes sont couramment mises en œuvre. La première consiste à instaurer un débit intestinal continu par l'administration régulière de repas fractionnés, auxquels est intégré un marqueur non absorbable [122,254,257]. La quantité de digesta iléal collectée est corrigée par le taux de récupération du marqueur dans l'iléon. La deuxième méthode, menée au cours de ces travaux, repose sur l'approximation de la digestibilité iléale par la digestibilité cæcale [171,184], le cæcum étant considéré comme un compartiment de stockage des pertes iléales (Article 1). Ainsi, un repas unique a été administré et les digesta cæcaux et iléaux ont été collectés 6 h plus tard, tout comme le contenu de l'intégralité du tube digestif pour réaliser un bilan de matière et se passer de l'utilisation d'un marqueur [132,258,259]. Un marqueur non-absorbable (oxyde de chrome, Cr_2O_3) a été ajouté aux repas pour calculer la digestibilité selon les deux approches, et les comparer (Article 2).

Les protéines étudiées chez le rat étaient la protéine de pois, la caséine, le gluten et la protéine de pois supplémentée en méthionine. Les isolats protéiques n'étant pas marqués, un groupe protéiprive a été constitué pour estimer les pertes endogènes et évaluer les digestibilités vraies de l'azote et des AA. Les analyses menées au cours des études chez le rat étaient le dosage de l'azote, des AA et du chrome dans les contenus digestifs et les isolats protéiques. Les méthodes isotopiques n'ont pas été utilisées sur ces échantillons.

Homme

La digestibilité iléale de l'azote et des AA a été évaluée chez l'Homme sur des sujets adultes sains, par la méthode directe de la sonde naso-iléale (Article 3). Cette technique est menée depuis 30 ans au sein de notre unité et a donné lieu à de nombreuses études [123,157,153,174,152,126,51,155,177,240]. Le calcul des pertes digestives repose sur la mesure de 3 paramètres : le débit iléal, la concentration en azote et en

AA, et l'enrichissement isotopique des digesta par rapport à l'enrichissement du repas (N et AA). Les pertes digestives sont recueillies en continu par aspiration à travers la sonde, après ingestion des protéines test. La sonde est introduite par le nez dans l'estomac du volontaire, et migre jusqu'à l'iléon terminal en quelques heures (10 à 24h) par les mouvements du péristaltisme. Un marqueur non-absorbable (PEG-4000) est diffusé 20 cm avant la zone de recueil pour permettre la mesure du débit intestinal. Les sondes sont fabriquées au laboratoire selon un protocole rigoureux. Elles mesurent 3 m et sont composées de 3 tubulures, se terminant par une zone de recueil et un ballonnet (**Figure 14.A**). Ce dernier contient un lest et peut être gonflé pour faciliter la migration. Les 3 tubulures sont chargées de la perfusion du marqueur, du recueil des digesta iléaux, et du gonflage du ballonnet, respectivement. La position de la sonde est vérifiée par radiographie (**Figure 14.B**) et par le pH des digesta collectés. La procédure est complexe et le taux de réussite est de 60% uniquement, lié principalement à l'échec du passage de la sonde à travers le nez ou le pylore, et à la mauvaise tolérance de la sonde.

La digestibilité des AA a également été évaluée par la méthode plasmatique double traceur, qu'il s'agissait de tester dans le contexte du recours à des méthodes moins invasives [38]. Ainsi, le protocole mené avait pour objectif la comparaison entre les méthodes directe (intubation) et plasmatique double traceur, sur les mêmes sujets (Article 4). La méthode double traceur repose sur l'ingestion simultanée d'une protéine test et d'une référence de digestibilité connue (protéine ou AA libres), et sur la comparaison de leur taux d'incorporation dans le plasma (cf. chapitre 1 paragraphe 4.4.). Chacune d'elle est marquée par un isotope stable. Au cours de nos travaux, la référence était un mélange d'AA libres d'origine algale marqués au ^{13}C, et non pas la spiruline, dont nous avons estimé la digestibilité trop faible et variable (85,2% et 87,9%) [41,43]. Nous avons comparé 2 techniques de calcul pour la méthode double traceur, à savoir, l'AUC [38] et l'enrichissement moyen au plateau isotopique plasmatique [41]. Pour cette dernière, les plateaux des 2 marqueurs (protéine test et référence) doivent être concomitants (**Figure 15**).

Deux protéines test ont été évaluées au cours de cette étude, la protéine de pois et la caséine, doublement marquées au ^{15}N et au ^{2}H. Le marquage ^{15}N a été utilisé pour la mesure directe de la digestibilité iléale dans les digesta, tandis que le marquage ^{2}H a servi pour la méthode plasmatique double traceur. L'administration des repas a suivi un protocole intermédiaire, répondant aux exigences des deux méthodes. En effet, la méthode directe nécessitait la récupération des pertes iléales du repas test dans leur intégralité (repas unique, en général). Pour la méthode double traceur, il s'agissait de générer des plateaux d'enrichissements isotopiques dans le plasma (repas multiples en continu), avec concomitance entre la protéine test et la référence. Pour cela, 9 repas ont été administrés toutes les

30 min pendant 4 h, et les digestats iléaux ainsi que des échantillons de plasma ont été prélevés pendant 8 h à partir de la première ingestion. La période d'ingestion a ainsi été raccourcie de 7 h à 4 h par rapport aux autres travaux menés sur la méthode double traceur [41–44], pour la collecte exhaustive des pertes digestives, nécessaire à la méthode directe. Les protéines test et la référence (AA libres ^{13}C) ont été incorporées dans de la purée de pomme de terre. La matrice alimentaire a été choisie semi-liquide pour limiter le déphasage entre les protéines test et la référence pendant l'étape gastrique de la digestion, condition nécessaire à la fiabilité de la méthode double-traceur.

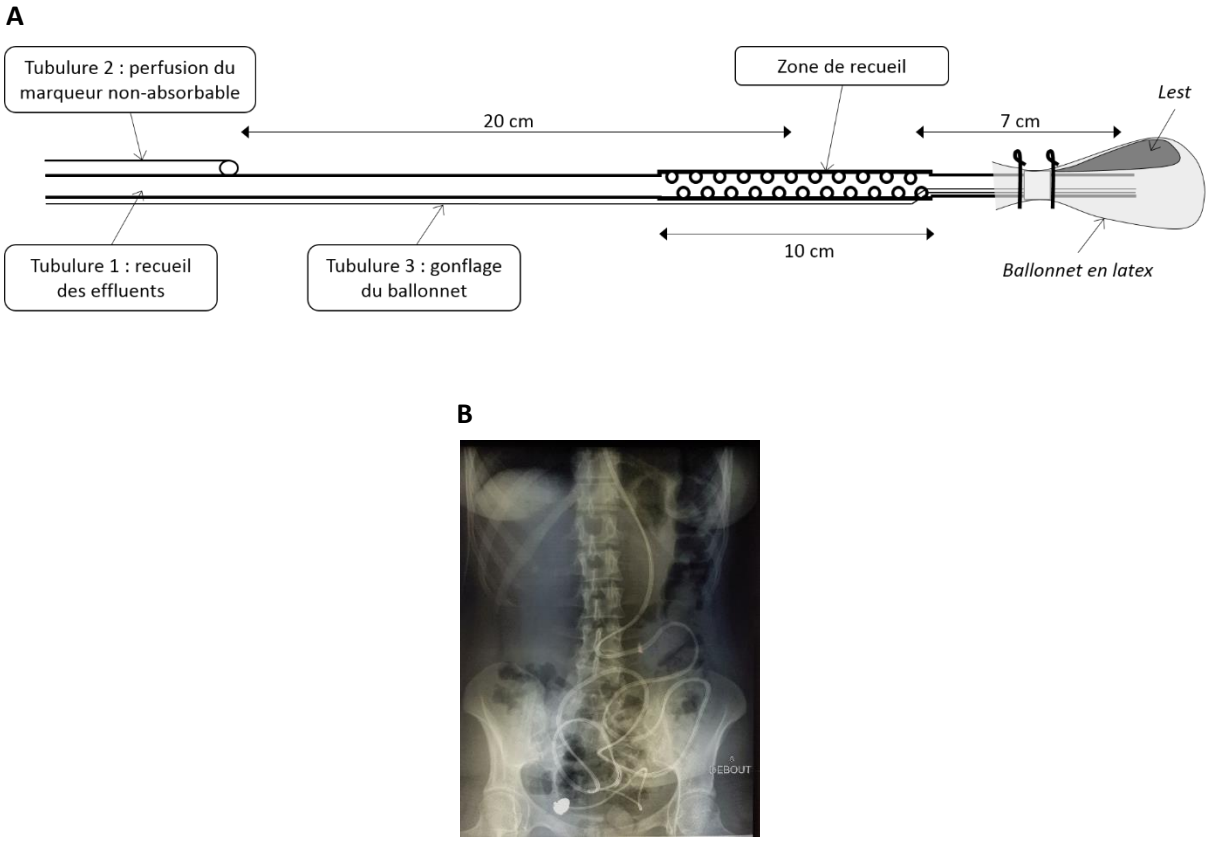

Figure 14. A. Représentation schématique de l'extrémité de la sonde naso-iléale. **B.** Radiographie de la sonde positionnée dans l'iléon terminal d'un volontaire.

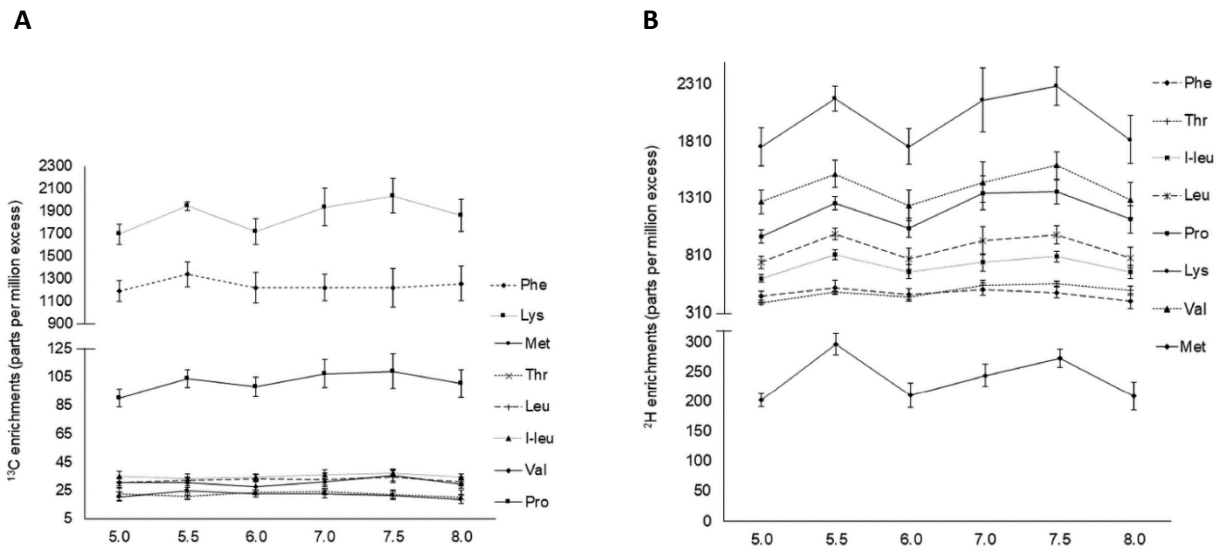

Figure 15. A. Plateau d'enrichissement en ^{13}C des AA plasmatiques. **B.** Plateau d'enrichissement en ^{2}H des AA plasmatiques. Les valeurs sont les moyennes ± ET des enrichissements aux plateaux, entre 5 h et 8 h après l'ingestion du premier repas contenant la protéine test (spiruline ^{13}C) et la référence (mélange d'AA ^{2}H), d'après Devi *et al.* [144].

2.3. Méthodes analytiques

Les techniques analytiques principales mobilisées pour ces travaux étaient la chromatographie (gazeuse et liquide) et la spectrométrie de masse à rapport isotopique. L'analyseur élémentaire (EA) a été utilisé pour mesurer la teneur en azote (N) et en carbone (C). La chromatographie liquide à ultra-haute performance (U-HPLC) a permis de doser les AA. L'EA a été couplé à un spectromètre de masse à rapport isotopique (IRMS) pour évaluer l'enrichissement global en ^{15}N et en ^{13}C. L'enrichissement en ^{15}N, ^{2}H et ^{13}C des AA individuels a été mesuré par chromatographie gazeuse couplée à un four de combustion et à un IRMS (GC-C-IRMS). Les échantillons dosés étaient des digestats et des fèces (lyophilisés et broyés), des isolats protéiques (pois et caséine), du plasma, des urines, de l'air expiré, et de l'urée (urinaire et plasmatique). Les principes de ces méthodes sont présentés ci-dessous.

EA-IRMS

L'EA (ici, Vario Micro Cube, Elementar) mesure la teneur en azote et en carbone dans des échantillons solides ou liquides. Couplé à un IRMS, il permet également de mesurer l'enrichissement en ^{15}N et ^{13}C. L'EA seul et l'EA-IRMS ont été utilisés sur des digestats, des isolats protéiques, des fèces, des urines, et de l'urée plasmatique et urinaire extraite sur résine.

Les échantillons sont encapsulés et subissent une combustion à 950°C en présence d'oxyde de cuivre, un catalyseur chimique (**Figure 16**). La réaction libère des oxydes d'azote (NO, NO_2, NO_3), du CO_2 et de

l'eau, et les éléments secondaires sont piégés par le tube de combustion. Les oxydes d'azote sont réduits en azote élémentaire par le tube de réduction, contenant du cuivre métallique et chauffé à 650°C. L'eau est piégée dans un tube contenant du pentoxyde de phosphore (Sicapent®). Lorsque l'azote est dosé seul, de l'hydroxyde de sodium recouvert de silice est ajouté au piège à eau pour capter le carbone. Les gaz sont quantifiés par un catharomètre (détecteur de conductivité thermique, TCD) en comparaison aux gaz de référence (N_2 et CO_2). En cas de couplage avec un IRMS, le N_2 et le CO_2 sont acheminés dans la source d'ionisation par un gaz porteur (hélium), où ils subissent un impact électronique ($M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$). Des ions à m/z 28, 29 et 30 sont formés dans le cas du N_2, ou à m/z 44, 45 et 46 dans le cas du CO_2. Ces ions sont séparés selon leur masse et leur charge par un champ magnétique et analysés par des détecteurs, l'intensité du signal correspondant au nombre d'ions atteignant chaque détecteur. Les rapports d'intensité donnent les valeurs de $^{15}N/^{14}N$ et de $^{13}C/^{12}C$, et les deltas pour mille (δ) sont calculés par rapport aux gaz de référence (N_2 et CO_2), comme suit :

$$\delta^{15}N = \frac{^{15}N/^{14}N \text{ échantillon} - {}^{15}N/^{14}N \text{ référence}}{^{15}N/^{14}N \text{ référence}} \times 1000$$

$$\delta^{13}C = \frac{^{13}C/^{12}C \text{ échantillon} - {}^{13}C/^{12}C \text{ référence}}{^{13}C/^{12}C \text{ référence}} \times 1000$$

Des standards externes, dosés dans les mêmes conditions que les échantillons, permettent d'ajuster les résultats obtenus. L'atropine, de teneur en azote et en carbone connue, est le standard des analyses d'EA. L'acide glutamique, d'enrichissement en ^{15}N et en ^{13}C connu, est le standard isotopique des analyses d'IRMS.

Les données d'enrichissement en delta pour mille (δ) sont ensuite exprimées en atome pourcent (AP), i.e. le ratio entre l'isotope stable et l'ensemble des atomes :

$$\text{Enrichissement (AP, \%)} = \delta_{\text{référence}} \times \frac{1 + \delta_{\text{échantillon}}/1000}{1 + (\delta_{\text{référence}} \times (1 + \delta_{\text{échantillon}}/1000))} \times 100$$

La référence est le rapport $^{15}N/^{14}N$ dans l'atmosphère pour l'azote, et la norme $^{13}C/^{12}C$ de la Pee Dee Belemnite (PDB) pour le carbone. Dans certains cas, un enrichissement basal est retranché des données d'AP, pour exprimer les données en excès d'enrichissement (APE). Ces valeurs basales sont les enrichissements mesurés dans des échantillons de même nature non marqués (par exemple le temps zéro d'une cinétique).

$$\text{Excès d'enrichissement (APE, \%)} = AP_{\text{échantillon}} - AP_{\text{basal}}$$

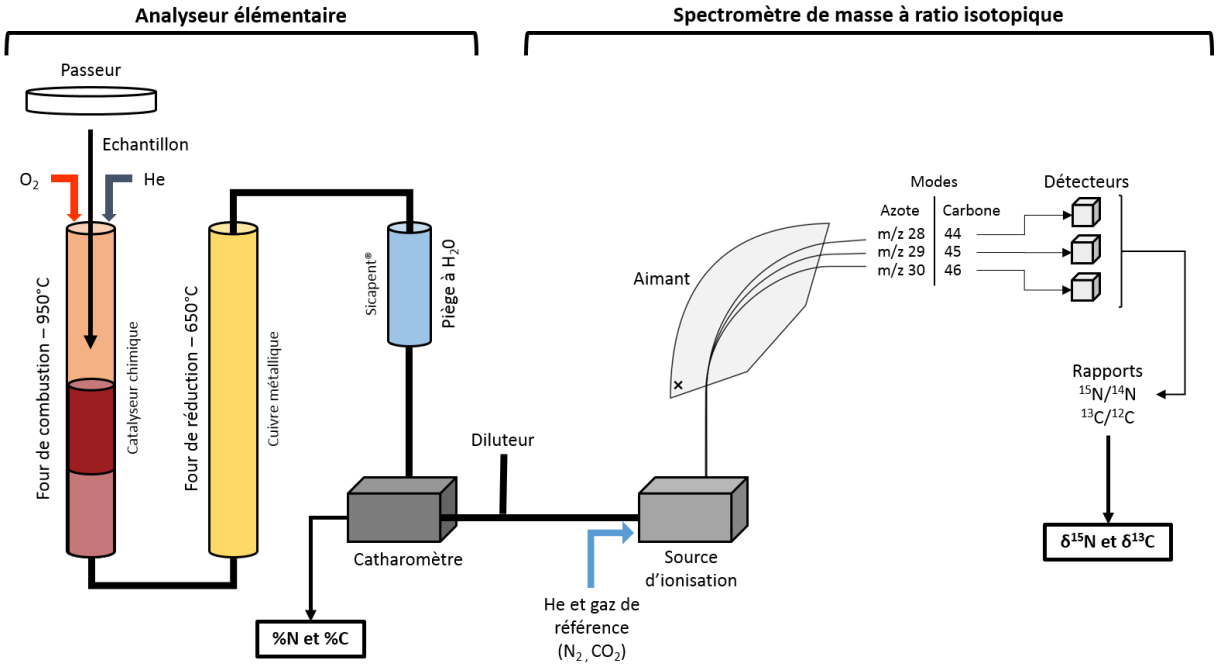

Figure 16. Fonctionnement simplifié de l'EA-IRMS, d'après Tessier [310]

GC-C-IRMS

La technique instrumentale du GC-C-IRMS (ici, Isoprime, GV Instrument) est une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse qui détermine le rapport relatif des isotopes stables de l'azote ($^{15}N/^{14}N$), du carbone ($^{13}C/^{12}C$) et de l'hydrogène ($^{2}H/H$) dans un composé ; les AA dans notre cas. Les composés analysés doivent être extraits du mélange qui les constitue. Ainsi, les AA contenus dans les échantillons de digesta et de plasma sont isolés au préalable sur une résine échangeuse d'ions, après une étape d'hydrolyse acide pour les digesta. Les AA extraits sont ensuite rendus volatils par dérivation avant l'analyse par le GC-C. Contrairement à l'EA-IRMS, l'azote et le carbone sont analysés individuellement, et le GC-C-IRMS doit changer de mode entre les deux mesures. Dans le cadre de nos travaux, les analyses de GC-C-IMRS ont été menées sur des échantillons d'AA extraits de digesta, d'isolats protéiques, et de plasmas.

Après injection des échantillons, les AA sont séparés sur une colonne capillaire (Restek RXi 17) selon leur affinité pour la phase stationnaire, moyennement polaire (**Figure 17**). La température de la colonne suit un programme précis : augmentation de 150°C à 200°C (+4°C/min), et de 200°C à 270°C (+25°C/min), puis maintien à 270°C pendant 10 minutes. Les composés sont dirigés vers le four de combustion via une interface à 350°C. Le four de combustion, chauffé à 950°C en mode N ou à 850°C en mode C, permet leur transformation en gaz analysables (CO_2, NO_x et H_2O) puis réduits, l'eau étant éliminée par une membrane. En mode N, un piège cryogénique d'azote liquide permet d'éliminer les

polluants résiduels (CO_2 et NO). Les échantillons sont ensuite traités par l'IRMS selon le principe décrit précédemment (cf. paragraphe « EA-IRMS »).

L'analyse fournit un chromatogramme du courant ionique (exprimé en nA) représentant chaque AA sous la forme d'un pic (**Figure 18**). La caféine est utilisée en tant que standard isotopique pour s'assurer de la répétabilité des mesures. L'intensité des pics est proportionnelle à la concentration de l'échantillon en atome concerné (N, C ou H). L'intensité est plus élevée en mode C par rapport au mode N, entraînant des pics plus grands, car les atomes de carbone sont plus nombreux que les atomes d'azote dans les molécules. Ainsi, des ajustements dans la concentration des échantillons injectés sont nécessaires selon le mode de l'appareil (N, C, H) et la nature de l'échantillon initial (digesta, isolat protéique, plasma). L'hydrolyse acide menée sur les échantillons de digesta modifie certains AA. La cystéine et le tryptophane sont dégradés [311], et l'asparagine (Asn) et la glutamine (Gln) sont en partie transformées en acide aspartique (Asp) et acide glutamique (Glu), respectivement. Dans ce cas, les pics sont nommés Asx (Asn + Asp), et Glx (Gln + Glu). Dans les échantillons de digesta, l'histidine est peu concentrée et n'est pas détectable. Dans les échantillons de plasma, non hydrolysés, les chromatogrammes contiennent des artéfacts qui nuisent à l'identification de certains pics. C'est notamment le cas pour la méthionine et la cystéine, ce qui entraîne un manque de données fréquent pour ces AA.

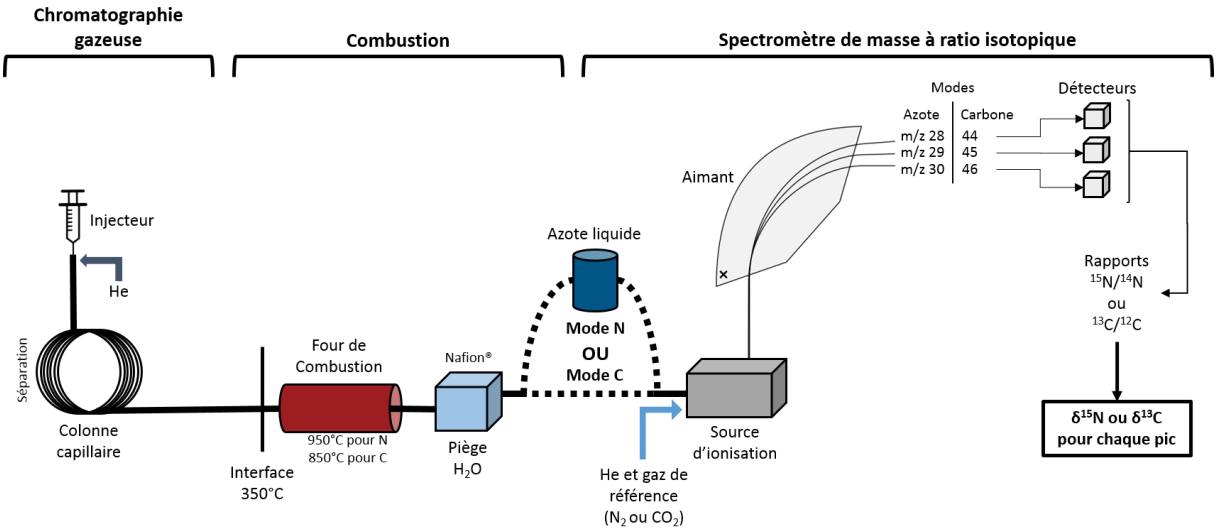

Figure 17. Fonctionnement simplifié du GC-C-IRMS, d'après Tessier [310]

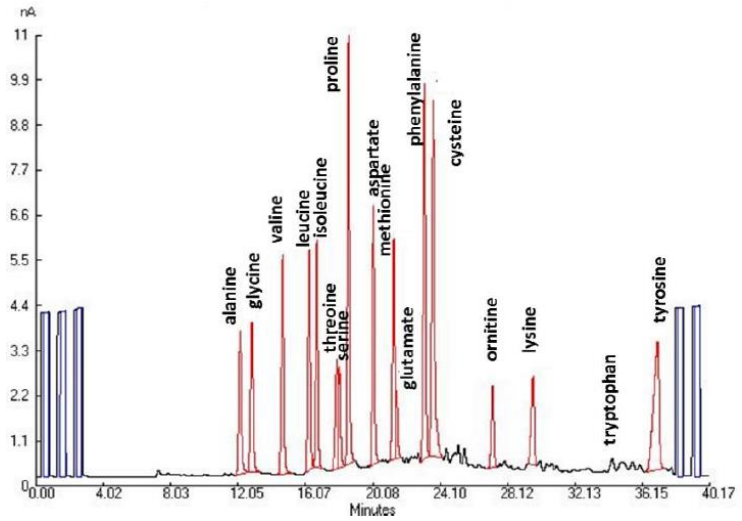

Figure 18. Exemple de chromatogramme obtenu après analyse GC-C-IRMS en mode carbone, d'après Tessier [310]

U-HPLC

L'U-HPLC (ici, Acquity HClass, Waters) a été utilisée pour mesure la teneur en AA d'échantillons dérivés selon le principe de l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) avec une analyse plus rapide (12 minutes/échantillon) et une sensibilité supérieure. Dans le cadre des travaux de thèse, cette technologie a été utilisée sur des échantillons de digesta, d'isolats protéiques et de plasma. Comme pour les analyses de GC-C-IRMS, les digesta et les isolats protéiques nécessitent une hydrolyse acide avant dérivation (AccQ Tag Ultra Waters). Les échantillons de plasma sont, quant à eux, précipités à l'acide sulfosalicylique, la dérivation étant ensuite réalisée sur les surnageants. La norvaline, un AA non protéinogène, est ajoutée aux échantillons en tant que standard interne. Une gamme contenant un mélange d'AA de concentration connue est utilisée. Pour les échantillons de plasma, l'asparagine, la glutamine et le tryptophane sont ajoutés dans la gamme. Ces AA sont dégradés lors de l'hydrolyse acide et ne sont donc pas dosés spécifiquement dans les digesta et les isolats protéiques car ils sont transformés en glutamate et en aspartate. Dans le cas des digesta et des isolats protéiques, l'albumine de sérum bovin est utilisée en tant que standard externe pour calculer les rendements de l'hydrolyse. Pour le dosage des AA soufrés (AAS), une oxydation à l'acide performique est menée au préalable afin de les convertir en composés résistants à l'hydrolyse, i.e. la méthionine sulfone pour la méthionine, et l'acide cystéique pour la cystéine. Pour le dosage du tryptophane, une hydrolyse basique doit être menée à la place de l'hydrolyse acide.

L'U-HPLC est composé de 4 modules (**Figure 19**), dont le SM-FTN (*Sample Manager - Flow Through Needle*) où a lieu le prélèvement des échantillons. Le QSM contient les pompes (*Quaternary Solvent*

Manager), qui modulent le choix et le débit des solvants, créant ainsi le gradient des solvants parcourant le système. Le troisième module est constitué par la colonne (AcQ-Tag amino acid C18 column, Waters), chauffée à 43°C. Le dernier module est le détecteur à barrette de diodes PDA (*Photodiode Array Detector*), responsable de la détection des AA. Les gradients sont assurés par 3 solutions, l'éluant A (Waters), un mélange d'acétonitrile (98%) et d'acide formique (2%), et de l'eau ultra pure. Des solutions supplémentaires sont dédiées au rinçage et au conditionnement du système. L'échantillon injecté traverse la colonne, et les AA contenus dans la phase mobile sont séparés selon leur affinité pour la phase stationnaire au fur et à mesure du gradient. Les AA sont détectés par ultraviolet à une longueur d'onde de 260 nm.

L'analyse fournit un chromatogramme (**Figure 20**) et la concentration de chaque AA est déterminée à partir des aires sous courbes relativement à la gamme, et corrigée par la teneur en norvaline. Une correction par le rendement de l'hydrolyse est également appliquée à partir des concentrations en AA obtenues pour l'échantillon d'albumine de sérum bovin.

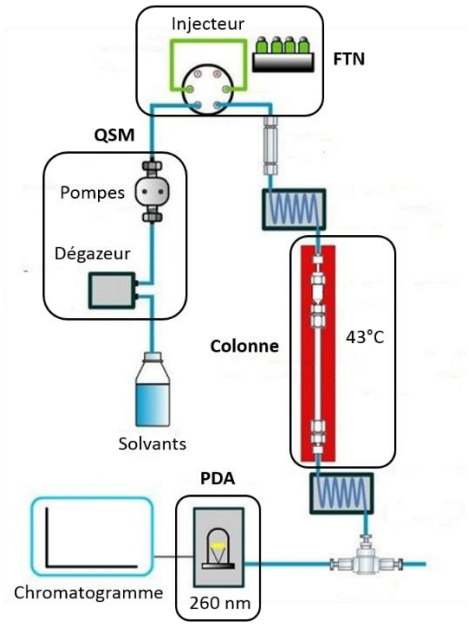

Figure 19. Fonctionnement simplifié de l'UPLC, d'après Tessier [310], adapté de CHROMacademy (www.chromacademy.com)

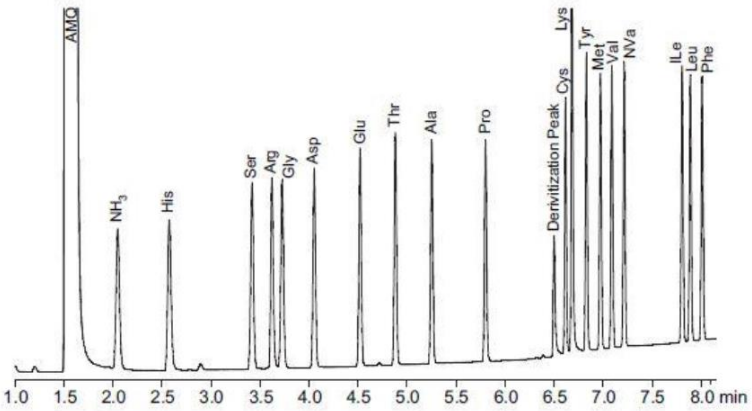

Figure 20. Exemple de chromatogramme obtenu après analyse U-HPLC, d'après Waters

Spectrophotométrie d'absorption atomique (flamme)

L'analyse du chrome par un spectrophotomètre d'absorption atomique flamme (ici, contrAA® 800, Analytik Jena) a été utilisée en partenariat avec un autre laboratoire (UMR GENIAL, INRAE) dans le cadre de l'étude animale. Il s'agissait de doser le chrome dans les contenus digestifs des rats afin de mesurer le taux de récupération du marqueur non-absorbable (Cr_2O_3). Les échantillons de digesta ont été réduits en cendres dans un four à 550 °C, puis solubilisés dans de l'acide nitrique, avant d'être injectés dans le spectrophotomètre de flamme, programmé à une longueur d'ondes de 357 nm.

Cette technique analytique utilise le principe selon lequel les éléments en phase gazeuse absorbent la lumière à des longueurs d'onde très précises, ce qui permet de les détecter de manière hautement spécifique. L'échantillon liquide (solution aqueuse ou organique) est aspiré dans une flamme où il est ionisé dans la phase gazeuse. Une lumière de longueur d'onde spécifique à l'élément analysé (357 nm pour le chrome) traverse la flamme. La quantité de lumière absorbée est mesurée par un détecteur, et un signal électronique est produit. L'absorption étant proportionnelle à la concentration de l'élément, le traitement du signal permet de déterminer la quantité de l'élément dans l'échantillon à partir de l'absorbance mesurée.

3. Articles

3.1. Article 1 : Évaluation multicritères de la qualité de la protéine de pois chez le rat : comparaison avec la caséine, le gluten et la protéine de pois seule ou supplémentée en méthionine

Article publié dans *The British Journal of Nutrition* le 27 juillet 2020

Résumé

Objectifs

L'objectif de cette étude était d'évaluer la qualité nutritionnelle d'un isolat de protéine de pois chez le rat et d'évaluer l'impact de la supplémentation en méthionine (Met). Plusieurs régimes protéiques ont été étudiés : protéine de pois, caséine, gluten, combinaison protéine de pois/gluten (80%/20%) et protéine de pois supplémentée en Met.

Méthodes

Étude 1 : De jeunes rats Wistar mâles (n = 8/groupe) ont été nourris *ad libitum* avec les régimes expérimentaux pendant 28 jours. Le PER a été mesuré.

Étude 2 : Des rats Wistar mâles adultes (n = 9/groupe) ont été nourris avec les régimes expérimentaux pendant 10 jours. Un groupe a reçu un régime protéiprive pour déterminer les pertes endogènes d'azote. Les rats ont été placés dans des cages métaboliques pendant 3 jours pour évaluer le bilan azoté, la digestibilité fécale vraie de l'azote, et calculer le PDCAAS. Ils ont ensuite reçu un repas calibré et ont été euthanasiés 6 heures plus tard pour la collecte du contenu digestif. La digestibilité cæcale vraie des acides aminés (AA) et le DIAAS ont été calculés.

Résultats

La supplémentation en Met a permis d'augmenter le PER de la protéine de pois (2,52 contre 1,14, $P < 0,001$) jusqu'au PER de la caséine (2,55). La digestibilité cæcale vraie moyenne des AA était de 94% pour la protéine de pois. Le DIAAS était de 0,88 pour la protéine de pois et de 1,10 avec la supplémentation en Met, de 1,29 pour la caséine et de 0,25 pour le gluten.

Conclusion

La protéine de pois s'est révélée hautement digestible chez le rat dans nos conditions expérimentales, et la supplémentation en Met lui a permis d'atteindre une qualité protéique qui n'était pas différente de celle de la caséine.

Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine

Authors and institutions

Florence M. Guillin[1,2], Claire Gaudichon[1], Laetitia Guérin-Deremaux[2], Catherine Lefranc-Millot[2], Dalila Azzout-Marniche[1], Nadezda Khodorova[1], Juliane Calvez[1]

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

[2]Roquette, 62080, Lestrem, France

Corresponding author

Juliane Calvez

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

Phone number: +33 1 44 08 86 77

Email: juliane.calvez@agroparistech.fr

Abbreviations

AA: amino acid, IAA: indispensable amino acid, SD: standard deviation

Keywords

Protein and amino acid digestibility, protein balance, protein efficiency ratio, PDCAAS, DIAAS

Abstract

The objective of this study was to assess the nutritional quality of pea protein isolate in rats and to evaluate the impact of methionine (Met) supplementation. Several protein diets were studied: pea protein, casein, gluten, pea protein-gluten combination and pea protein supplemented with Met.

Study 1: Young male Wistar rats (n = 8/group) were fed the test diets *ad libitum* for 28 days. The Protein Efficiency Ratio (PER) was measured. *Study 2:* Adult male Wistar rats (n = 9/group) were fed the test diets for 10 days. A protein-free diet group was used to determine nitrogen (N) endogenous losses. The rats were placed in metabolic cages for 3 days to assess N balance, true fecal N digestibility, and to calculate the Protein Digestible-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS). They were then given a calibrated meal and euthanized 6 hours later for collection of digestive contents. The true cecal amino acid (AA) digestibility was determined and the Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) was calculated. Met supplementation increased the PER of pea protein (2.52 vs. 1.14, $P < 0.001$) up to the PER of casein (2.55). Mean true cecal AA digestibility was 94% for pea protein. The DIAAS was 0.88 for pea protein and 1.10 with Met supplementation, 1.29 for casein and 0.25 for gluten. Pea protein was highly digestible in rats under our experimental conditions, and Met supplementation enabled generation of a mixture that had a protein quality that was not different from that of casein.

Introduction

In response to the increasing global demand for proteins, on the one hand, and the depletion of natural resources, on the other, it is necessary to find sustainable alternatives to animal proteins that are of good nutritional quality and are environmentally sound [(1)]. The plant protein market is growing and the use of legumes in food products has increased. Among them, pea protein is an option due to its substantial protein content, its relatively good AA profile and its cultivation benefits [(2)]. Evaluation of the nutritional quality of dietary proteins relies on several factors, such as the ability to ensure normal growth, the amino acid (AA) composition of the protein (known as the chemical score), the digestibility and the biological value of absorbed nitrogen and AA [(3)]. Digestibility refers to the ratio between the amount of AA absorbed by the small intestine and the amount ingested. The digestibility of nitrogen can be assessed at the fecal level, although a small part of nitrogen in forms other than AA can be absorbed in the colon [(4)]. However, ileal digestibility is preferred to fecal digestibility in determining AA digestibility because microbial activity modifies the remaining AA fraction in the colon [(5–7)] and colonic absorption of AA has not yet been demonstrated convincingly [(8)]. Several quality scores allow ranking of a protein on both its digestibility and its AA composition, such as the Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS), which has recently been recommended over the Protein Digestible-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) by the FAO [(9)]. It is based on the measurement of the chemical score and

the ileal digestibility for each AA, the latter being methodologically challenging. Growing pigs and rats are the recommended animal models for the determination of true ileal digestibility of AA [9].

Pea contains, on average, 24% to 28% protein (dry matter basis) [10,11]. Its AA composition is characterized by a limiting content of methionine (Met) [12], but the total sulfur AA (SAA) content is adequate [13] and meets the recommendation in the reference pattern defined by the FAO [9]. It is suggested that plant proteins have impaired digestibility due to the presence of both indigestible fractions in their sequence and anti-nutritional factors [14]. However, isolates are generally digested well, and it has been reported that pea protein isolate demonstrates good digestibility in humans [15]. It can be assumed that supplementing pea protein with Met could improve its nutritional quality.

The aim of this study was to evaluate the nutritional quality of pea protein isolate in rats, alone or complemented to increase sulfur AA (SAA) content, through the measurement of various quality indexes: the Protein Efficiency Ratio (PER), which assesses the ability to ensure growth; the nitrogen balance; the true fecal nitrogen digestibility and the true cecal AA digestibility; the PDCAAS; and the DIAAS. This study also aimed to compare the nutritional quality of pea protein to two widely consumed protein sources: milk casein and wheat gluten.

Methods

This study was conducted in compliance with the EU directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the Ethics Committee in Animal Experiment of INRA Jouy-en-Josas (Comethea, registration number: 17-20) and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS #11921-2017091818236657). The rats were obtained from Envigo laboratories and were housed under controlled conditions (room temperature 22 ± 2°C, photoperiod 12 h light:12 h dark) in individual cages.

Diets and proteins

All the experiments started after a 6-day adaptation period during which the animals were fed a standard chow diet. The rats were randomly split into experimental groups according to diets (**Table 1**). All diets were isocaloric (3.7 kcal/g), isonitrogenous and provided the same amount of carbohydrates and fat. They differed from each other in the protein source, only. Pea protein isolate (NUTRALYS® S85F) and hydrolyzed wheat gluten (NUTRALYS® W) were provided by Roquette (Lestrem, France). Micellar casein isolate (PRODIET® 85B) was obtained from Ingredia (Arras, France). The rats had free access to water throughout the duration of the experiment.

The AA composition of tested proteins is presented in **Table 2**. SAA content of pea protein is lower than casein and gluten but meets requirements according to the older child, adolescent, and adult reference pattern defined by the FAO (23 mg/g protein requirement). The amount of test protein was calculated using the nitrogen-to-protein conversion factor of 6.25 (total N content × 6.25).

Study 1: PER and body composition

Young Wistar male rats weighing 58 ± 3 g at the beginning of the experiment were fed *ad libitum* with a diet containing 10% protein (N x 6.25) for 28 days. They were divided into five groups (n = 8/group) according to the protein source: pea protein, casein, wheat gluten, pea-gluten combination (80% pea protein - 20% gluten, chemical score 100%), and pea protein supplemented with Met up to the concentration in casein (28 mg/g protein). Fresh food was given each day 1 hour before the photoperiod shift from light to dark. Body weight and dietary intake were measured daily. The PER was calculated from the ratio between weight gain (g) and protein intake (g) throughout the experimental period. At day 29, the rats were euthanized by intracardiac puncture under isoflurane anesthesia for evaluation of body composition and naso-anal length. Abdominal (epididymal, mesenteric, retroperitoneal) and subcutaneous fat pads were excised and weighed to determine fat mass, and the bodies were stripped to assess lean body mass (muscles and bones).

Table 1. Composition of the experimental diets

	Study 1		Study 2 & 3 – protein diets		Study 2 – protein-free diet	
	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy
Protein	75	10	105	14	0	0
Starch	590	67	564	64	658	75
Sucrose	98	11	93	10	109	12
Soybean oil	38	11	38	11	45	12
Mineral mix [1]	35	0	35	0	35	0
Vitamin mix [1]	10	0	10	0	10	0
Cellulose	50	1	50	1	50	1
Choline	2.3	0	2.3	0	2.3	0

DM: dry matter

[1] Formulated from AIN-93M [16]

Table 2. Indispensable amino acid composition of crude proteins and amino acid requirements according to FAO 2013 [9]

	IAA content, mg/g protein [1]					Older child, adolescent, adult reference pattern (mg/g protein requirement)
	Pea protein	Casein	Gluten	Pea protein + gluten [2]	Pea protein + Met [3]	
Histidine	24.7	26.8	19.4	23.6	24.6	16
Isoleucine	46.2	48.9	34.8	43.9	46.0	30
Leucine	81.0	91.0	67.7	78.3	80.7	61
Lysine	71.1	75.6	15.2	59.9	70.8	48
SAA [4]	23.4	33.6	38.0	26.3	41.9	23
of which Methionine	12.1	28.6	15.6	12.8	30.5	-
AAA [5]	91.4	99.6	83.7	89.8	91.0	41
Threonine	35.7	40.8	25.4	33.6	35.6	25
Valine	52.8	64.6	40.1	50.3	52.6	40

The amount of protein in each isolate was 86% for pea protein and casein, 88% for gluten, 87% for pea protein + gluten and pea protein + Met (on dry matter, total N content × 6.25). SAA: sulfur amino acids, AAA: aromatic amino acids

[1] Values are means of 3 samples.

[2] The mixture was composed of 80% pea protein and 20% gluten.

[3] The supplementation reached methionine concentration in casein.

[4] Methionine and cysteine

[5] Phenylalanine and tyrosine

Study 2: protein digestibility and nitrogen balance

Protein and AA digestibility were assessed by two different tests on the same animals. The first evaluated nitrogen fecal digestibility and nitrogen balance in metabolic cages. The second assessed AA cecal digestibility in a postprandial test.

Forty-five Wistar male rats weighing 252 ± 5 g were fed a diet containing 14% protein (N x 6.25) for 10 days. They were divided into five groups (n = 9/group): pea protein, casein, gluten, pea protein supplemented with Met to meet the concentration in casein (28 mg/g protein), and a protein-free diet. The rats were housed on a reversed light cycle (dark period from 7 a.m. to 7 p.m.) in cages with wire bottoms to prevent coprophagia. They were trained to eat a calibrated meal containing 4 g (dry weight) of their usual diet in a short time by providing the meal at 9 a.m. for 30 minutes, only, and before commencing a 2-hour fast, as described previously [17]. They were subsequently fed *ad libitum* from 11

a.m. to 5 p.m. and fasted until the next calibrated meal. Beginning on day 7, they were housed in metabolic cages for 3 days, and after 1 day of habituation urine and feces were collected for 2 days. Dietary intake was measured daily. Nitrogen content of diets, feces and urine was measured with an elementary N analyzer based on the Dumas method (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France) to calculate nitrogen balance: $N_{ingested}$ (mg) – $N_{excreted}$ (mg) and $N_{excreted} = N_{feces} + N_{urine}$. Fecal nitrogen digestibility was calculated as follows:

$$\text{True oro-fecal N digestibility (\%)} = \frac{N_{ingested} - (N_{feces} - N_{endogenous})}{N_{ingested}} \times 100$$

Endogenous losses of nitrogen in feces were estimated from rats fed the protein-free diet.

The PDCAAS was calculated as indicated by the FAO/WHO Expert Consultation [18]:

$$\text{PDCAAS} = \text{Lowest AA ratio} \times \text{true fecal protein digestibility (\%)}$$

$$AA_i \text{ ratio} = \frac{\text{mg } AA_i \text{ in 1g of the test protein}}{\text{mg } AA_i \text{ in 1g of the reference protein}}$$

The postprandial test started at day 10, when the rats were given a calibrated meal of 4 g and were euthanized 6 h later by intracardiac puncture under isoflurane anesthesia. Gastro-intestinal segments were identified as stomach, proximal intestine, ileum (defined as the last 10 cm of the small intestine), cecum, and colon. The luminal contents of these segments were collected entirely, weighed, stored at -20°C and freeze-dried.

Indispensable amino acids (IAAs) in cecum, ileum, stomach contents and tested proteins were assayed on hydrolyzed protein by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) to calculate AA digestibility. More specifically, samples were hydrolyzed in HCl 6N at 110 °C for 24 h. Norvaline was added as an internal standard. AAs in samples were derivatized using the AccQ-Tag Ultra Derivatization kit (Waters, Milford, USA). The AA analysis was performed on a UHPLC (Acquity UPLC H-Class Plus, Waters, Milford, USA) with a PDA detector (260 nm) and an AccQTag amino acid C18 column (Waters, Milford, USA). A specific protocol was carried out for SAA analysis, as they can be partially destroyed during acid hydrolysis. Indeed, Met and cysteine were oxidized to methionine sulfone and cysteic acid using performic acid prior to HCl hydrolysis, as described by Rutherfurd *et al*. [19]. Cecal digestibility was calculated for each IAA individually:

$$\text{True oro-cecal IAA digestibility} = \frac{IAA_{ingested} - (IAA_{ileum} + IAA_{cecum} - IAA_{endogenous})}{IAA_{ingested}} \times 100$$

where $IAA_{endogenous}$ are the endogenous losses of IAA in ileum and cecum. The endogenous losses of IAA were estimated in the protein-free group. Because some residual amounts of AA were recovered in the stomach and thus did not entered into the digestive process, $IAA_{ingested}$ excluded this residual amount.

The DIAAS was calculated as prescribed by the FAO [9]: DIAAS = lowest IAA ratio

$$IAA_i \text{ ratio} = \frac{\text{mg digestible } IAA_i \text{ in 1g of the test protein}}{\text{mg } IAA_i \text{ in 1g of the reference protein}}$$

where Digestible IAA_i content (g/kg protein) = IAA_i content (g/kg protein) × True oro-cecal IAA_i digestibility (%).

The reference protein IAA profile used for PDCAAS calculation was the adult AA requirement pattern from the 2007 WHO/FAO/UNU report [20]. The reference profile used for DIAAS calculation was the requirement pattern for the older child, adolescent, and adult defined by the FAO (2013) [9].

Statistical analysis

A power calculation was performed to determine the sample size required to detect significant differences with a statistical power of 90% and α level set at 0.05. According to former studies, interindividual variability in protein digestibility measured at ileal or cecal level in rats was around 1.5%, and the difference in digestibility between animal and plant protein isolates was generally about 2.5% [21–24], leading to a sample size of 9 animals per group (G*Power 3.1). On the same principle, the difference in PER between pea and casein was estimated to be approximately 1 point [25,26], hence the inclusion of 8 rats per group in the study.

The values are expressed as means ± standard deviation (SD). Comparisons were made between all protein sources for each nutritional quality parameter (PER, nitrogen balance, fecal and cecal digestibility) using a two-way ANOVA with a random series effect (when the experiment was carried out in several series). For study 1, the influence of the protein source on body weight gain and energy intake was tested using a mixed model with time as a fixed effect and two random effects (animal and series). Casein diet was chosen as the control group for each test. When an overall significant difference was observed ($P < 0.05$), a side-by-side comparison was made between diets using Bonferroni correction.

Results

PER and body composition

An effect of protein source was observed on PER ($P < 0.0001$). The PER of pea protein was 1.14, greater than gluten (0.47; $P = 0.0001$) and lower than casein (2.55; $P < 0.0001$, **Table 3**). The combination of pea protein and gluten had a PER of 1.60 and was greater than pea protein and gluten individually ($P = 0.01$ and $P < 0.0001$), but lower than casein ($P < 0.0001$). The PER of pea protein supplemented with Met (2.52) was not different from PER of casein. Weight gain of the rats fed casein and pea protein

supplemented with Met were not different and greater (P < 0.0001) than the weight gain in the other groups from the 14th day of study (**Figure 1**). Weight gain was also greater in the pea protein group compared to the gluten group, with a difference at day 28 (P = 0.01). All the groups had a dietary intake that met their energy requirements according to the nutritional requirements for a growing rat (kcal/day) = 225 × body weight $^{0.75}$ [27], except for the gluten group from the 15th day on (data not shown).

At day 28, the rats fed casein and pea protein supplemented with Met were larger than rats in other groups (P < 0.001, **Table 4**). Casein rats had higher fat mass than rats fed gluten (P = 0.01) and the mix of pea protein and gluten (P = 0.03). However, there was no difference in lean mass between groups.

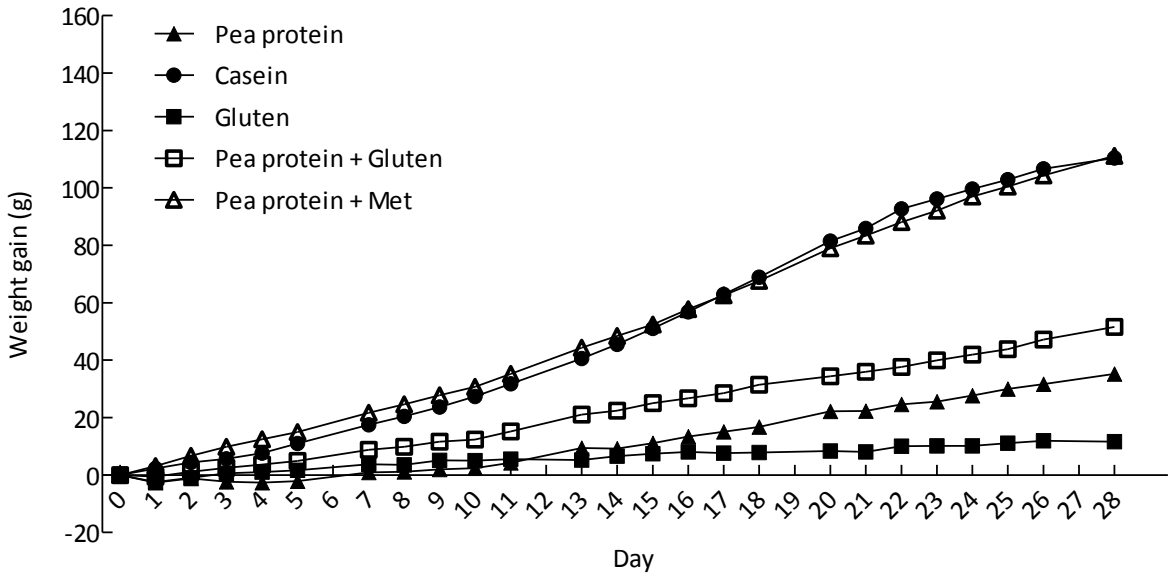

Figure 1. Body weight gain relative to initial weight over time

Values are means, n = 8 per group. Pea protein + gluten mixture was composed of 80% pea protein and 20% gluten. The supplementation of pea protein + methionine (Met) group reached methionine concentration in casein. There was a significant effect of the protein source (P < 0.001), time (P < 0.001) and protein source*time (P < 0.001) on body weight gain. Significant difference from pea protein + Met started at day 7 for pea protein, at day 8 for gluten, and at day 11 for pea protein + gluten (P < 0.05). Significant difference from casein started at day 9 for pea protein, at day 10 for gluten and at day 14 for pea protein + gluten (P < 0.05). Significant difference between gluten and pea protein + gluten started at day 17 (P < 0.05). Significant difference between pea protein and gluten started at day 28 (P < 0.05).

Table 3. PER of protein sources, alone or in combination [1]

	Body weight gain over 28 days (g)	Total energy intake over 28 days (kcal)	PER
Pea protein	35.3 ± 14.2 [a]	1176.1 ± 236.5 [a]	1.14 ± 0.27 [a]
Casein	110.4 ± 21.5 [b]	1715.9 ± 227.5 [b]	2.55 ± 0.27 [b]
Gluten	11.6 ± 4.8 [c]	986.1 ± 136.4 [c]	0.47 ± 0.19 [c]
Pea protein + gluten [2]	51.6 ± 10.3 [a]	1257.1 ± 180.0 [a]	1.60 ± 0.16 [d]
Pea protein + Met [3]	111.2 ± 34.6 [b]	1695.3 ± 309.5 [b]	2.52 ± 0.33 [b]

PER: protein efficiency ratio, Met: methionine. Values are means ± SD

[1] There was an effect of the protein source ($P < 0.001$), n = 8 per group.

[2] The mixture was composed of 80% pea protein and 20% gluten.

[3] The supplementation reached methionine concentration in casein.

[a, b, c, d] Different superscript letters in the same column indicate significant differences (post-hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$).

Table 4. Body composition of rats at the end of the experiment (day 28) [1]

	Body weight (g)	Fat mass (% body weight)	Lean mass (% body weight)	Naso-anal length (cm)
Pea protein	119.3 ± 15.9 [ac]	9.43 ± 2.12 [ab]	40.21 ± 1.36	17.8 ± 0.9 [ac]
Casein	194.6 ± 21.4 [b]	11.81 ± 2.34 [a]	39.79 ± 1.72	19.8 ± 0.6 [b]
Gluten	95.1 ± 5.8 [c]	7.94 ± 1.34 [b]	39.51 ± 1.41	16.7 ± 0.4 [c]
Pea protein + gluten [2]	133.9 ± 11.6 [a]	8.40 ± 0.96 [b]	40.25 ± 2.50	18.3 ± 0.6 [a]
Pea protein + Met [3]	194.1 ± 38.3 [b]	10.46 ± 3.14 [ab]	41.59 ± 2.02	19.7 ± 1.0 [b]

Met: methionine. Values are means ± SD

[1] There was an effect of the protein source for body weight, fat mass and naso-anal length (body weight: $P < 0.001$, P = fat mass: $P = 0.002$, naso-anal length: $P < 0.001$, carcass weight: NS), n = 8 per group.

[2] The mixture was composed of 80% pea protein and 20% gluten.

[3] The supplementation reached methionine concentration in casein.

[a, b, c] Different superscript letters in the same column indicate significant differences (post-hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$).

Protein digestibility

In study 2, all rats gained weight throughout the 10 days of the experiment, except for those in the protein-free group. At day 10 the rats fed casein and pea protein supplemented with Met had greater body weights than rats in other groups ($P < 0.001$, pea protein: 278.6 g; casein: 300.6 g; gluten: 278.3 g; pea + Met: 302.3 g). Overall dietary intake was not different between groups throughout the 10 days of the study, except for protein-free rats, which had lower intakes. Nitrogen balance over 2 days was greater for rats fed casein and pea protein supplemented with Met compared to rats fed pea protein and gluten (casein vs. pea: $P = 0.01$; casein vs. gluten: $P = 0.03$; pea+Met vs. pea: $P = 0.001$; pea+Met vs. gluten: $P = 0.003$, **Table 5**). The protein-free group had a negative nitrogen balance. Rats fed pea protein and gluten had greater nitrogen urinary losses than rats fed casein and pea supplemented with Met ($P <0.001$ and $P < 0.0001$). True fecal nitrogen digestibility of pea protein was 96.0 ± 1.0, and 95.3 ± 1.2 when supplemented with Met. Fecal digestibility was greater for pea protein, supplemented or not, and for gluten compared to casein ($P < 0.001$).

In the study dedicated to postprandial AA digestibility, the mean meal size ingested prior to euthanasia was 3.8 ± 0.4 g dry matter. The endogenous losses of AA were calculated by measuring the AA content of stomach, ileum and cecum digesta in rats fed the protein-free diet (**Supplemental table 1**). The highest endogenous losses were for glutamic acid and the lowest were for Met and histidine. True cecal AA digestibility values for each protein source were determined (**Table 6**), except for tryptophan. Mean true cecal digestibility of all AAs was 94.6 ± 4.1% for pea protein and 87.5 ± 3.4% for pea protein supplemented with Met, 87.0 ± 5.0% for casein and 94.4 ± 3.6% for gluten. For pea protein, the highest cecal digestibility was for arginine (96.9 ± 2.7%). For pea protein and gluten, the lowest digestibility was found for their limiting AAs, Met (84.2 ± 9.7%) and lysine (80.2 ± 16.6%) respectively.

IAA ratios were calculated using the AA requirement pattern of the older child, adolescent, and adult and the true cecal AA digestibility of proteins (**Table 7**). For casein and pea protein supplemented with Met, the ratios were ≥ 1 for all IAA. The lowest IAA ratio was SAA for pea protein (0.88) and lysine for gluten (0.25). With Met supplementation, the DIAAS of pea protein increased to 1.10. The DIAAS obtained for casein was 1.29. The untruncated PDCAAS of pea protein was 1.02, whereas it was 1.43 for casein and only 0.32 for gluten.

Table 5. Nitrogen balance over 2 days and true fecal nitrogen digestibility measured for 4 protein sources after a one-week adaptation period to the diet and a one-day adaptation period to the metabolic cage [1]

	Body weight (g)	Nitrogen balance over 2 days (mg N)	Urinary nitrogen losses over 2 days (mg N)	True fecal nitrogen digestibility (%)
Pea protein	278.6 ± 5.8 [a]	458.4 ± 84.6 [a]	429.2 ± 77.6 [a]	96.0 ± 1.0 [a]
Casein	300.6 ± 13.6 [b]	606.6 ± 68.2 [b]	284.3 ± 57.7 [b]	93.7 ± 1.1 [b]
Gluten	278.3 ± 4.9 [a]	467.4 ± 172.1 [a]	495.6 ± 76.7 [a]	95.7 ± 0.6 [a]
Pea protein + Met [2]	302.3 ± 14.6 [b]	640.9 ± 100.4 [b]	307.3 ± 92.3 [b]	95.3 ± 1.2 [a]
Protein-free	226.1 ± 7.6 [c]	-60.5 ± 12.9 [c]	44.3 ± 11.7 [c]	-

N: nitrogen, Met: methionine. Values are means ± SD

[1] There was an effect of the protein source on body weight ($P < 0.001$), nitrogen balance and fecal digestibility ($P < 0.001$), n = 9 per group. Endogenous losses of nitrogen were estimated using protein-free group.

[2] The supplementation reached methionine concentration in casein.

[a, b, c] Different superscript letters in the same column indicate significant differences (post-hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$).

Table 6. True cecal amino acid digestibility measured for 4 protein sources [1]

	Protein source, %			
	Pea protein	Casein	Gluten	Pea protein + Met [2]
Alanine	92.8 ± 5.7 [a]	85.4 ± 6.0 [ab]	88.5 ± 9.9 [ab]	80.5 ± 5.3 [b]
Arginine	96.9 ± 2.7 [a]	91.2 ± 3.8 [b]	92.6 ± 4.5 [ab]	93.4 ± 1.9 [ab]
Aspartic acid	95.6 ± 3.6 [a]	86.7 ± 5.2 [a]	83.2 ± 13.3 [a]	87.8 ± 3.7 [a]
Glutamic acid	96.0 ± 3.3 [a]	84.7 ± 4.4 [b]	97.6 ± 1.5 [a]	90.3 ± 3.0 [c]
Histidine	96.4 ± 2.7 [a]	94.7 ± 2.4 [a]	93.9 ± 3.7 [ab]	90.8 ± 2.4 [b]
Isoleucine	93.4 ± 3.8 [a]	79.3 ± 5.7 [b]	92.0 ± 4.9 [a]	84.7 ± 3.6 [b]
Leucine	93.7 ± 3.8 [a]	92.8 ± 2.6 [a]	93.7 ± 3.6 [a]	86.4 ± 3.2 [b]
Lysine	95.6 ± 3.3 [a]	93.3 ± 2.2 [a]	80.2 ± 16.6 [b]	88.8 ± 3.2 [ab]
Methionine	84.2 ± 9.7 [a]	89.6 ± 4.8 [a]	91.8 ± 4.2 [a]	87.0 ± 4.7 [a]
Cysteine	90.1 ± 11.6 [ab]	91.7 ± 8.2 [ab]	95.3 ± 3.4 [b]	79.1 ± 10.9 [a]
Phenylalanine	95.0 ± 3.0 [a]	94.9 ± 2.3 [a]	95.2 ± 2.7 [a]	88.7 ± 2.7 [b]
Serine	93.8 ± 6.0 [ac]	73.0 ± 5.7 [b]	95.1 ± 2.6 [a]	88.1 ± 3.7 [c]
Tyrosine	93.6 ± 4.7 [a]	94.9 ± 2.3 [a]	93.0 ± 4.1 [a]	86.1 ± 3.6 [b]
Threonine	92.2 ± 5.5 [a]	87.7 ± 4.7 [ab]	88.6 ± 7.8 [a]	80.6 ± 5.2 [b]
Valine	93.1 ± 4.3 [a]	86.3 ± 4.3 [bc]	91.1 ± 5.9 [ab]	83.8 ± 3.9 [c]
Average amino acid digestibility [3]	94.6 ± 4.1 [a]	87.0 ± 5.0 [b]	94.4 ± 3.6 [a]	87.5 ± 3.4 [b]

Met: methionine. Values are means ± SD

[1] There was an effect of the protein source on the average amino acid digestibility ($P < 0.001$), n = 9 per group. Endogenous losses of amino acids were estimated using protein-free group.

[2] The supplementation reached methionine concentration in casein.

[3] Average digestibility was calculated from the mean amino acid digestibilities weighted by the proportion of each amino acid in the protein.

[a, b, c] Different superscript letters in the same column indicate significant differences (post-hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$).

Table 7. Digestible indispensable amino acid reference ratios calculated using true cecal amino acid digestibility values and lowest untruncated PDCAAS calculated using true fecal nitrogen digestibility values [1]

	IAA ratios, DIAAS and PDCAAS			
	Pea protein	Casein	Gluten	Pea protein + Met [2]
Histidine	1.49	1.59	1.14	1.39
Isoleucine	1.44	1.29	1.07	1.30
Leucine	1.24	1.38	1.04	1.14
Lysine	1.42	1.47	0.25	1.31
SAA [3]	0.88	1.34	1.55	1.56
AAA [4]	2.10	2.31	1.93	1.95
Threonine	1.32	1.43	0.90	1.15
Valine	1.23	1.39	0.91	1.10
DIAAS	0.88	1.29	0.25	1.10
PDCAAS	1.02	1.43	0.32	1.29

DIAAS: Digestible Indispensable Amino Acid Score, PDAAS: Protein Digestible-Corrected Amino Acid Score, Met: methionine, SAA: sulfur amino acids, AAA: aromatic amino acids

[1] The DIAAS ratios were calculated using the amino acid requirement pattern for the older child, adolescent, adult according to the FAO 2013 [(9)] (grams per kilogram protein). The PDCAAS were calculated using the adult amino acid requirement pattern from the 2007 WHO/FAO/UNU report [(20)].

[2] The supplementation reached methionine concentration in casein.

[3] Methionine and cysteine

[4] Phenylalanine and tyrosine

Discussion

The present study enabled a complete evaluation of the nutritional quality of pea protein isolate using various quality indexes and a comparison with other proteins from both animal and plant sources. It also provided thoughts on methodologies regarding the measurement of ileal protein digestibility in rats without use of isotope labelling.

Validated by the FAO, the PER method has been used for decades to evaluate protein quality through the ability to support growth due to its low cost, its effectiveness, and the existence of a standardized

protocol [26]. It is still used as the reference method for protein quality evaluation in Canada [28]. The present study showed that Met supplementation enabled pea protein to reach a PER that was not different from that of casein and resulted in body weight gain of rats that was not different from that of rats fed the casein diet. Furthermore, the PER obtained for casein was in accordance with the theoretical value of 2.50 [26], which testifies to the reliability of the study. The lower PER of pea protein can thus be attributed to its low concentration in Met. The present data supported results by Bajaj *et al.* [25], who established a positive correlation between the albumin content of green pea and PER, explained by the greater content in SAA compared to globulin. The PER of pea protein was twofold higher than the PER of gluten, indicating a better effectiveness in promoting animal growth. It also appeared that the lysine deficiency of cereals could be more problematic than the Met deficiency of legumes. The combination of pea protein and gluten enabled the significant increase of the PER of both sources when measured individually, but was not sufficient to reach the value for casein and pea protein supplemented with Met. These results are consistent with protein Met content as the value for gluten is not high enough to reach the Met concentration of casein. The combination of legume and cereal proteins would be more effective with a cereal featuring a greater Met content than gluten. However, growing rats have greater SAA requirements than humans, therefore it is important to point out that none of the diets in the study met the Met requirement set at 6.5 mg/g diet (for a diet containing 4 kcal/g and composed of 10% water) [29]. Casein provides only 70-87% of the SAA requirements of rats [18]. The low PER of gluten is due to its large deficiency in lysine, and the rats were unable to compensate with an increase in dietary intake. Indeed, the food intake of gluten rats was lower than their energy requirements after two weeks of experimentation. This disinterest in their diet has been observed in other studies and could be a behavioral response to the IAA-deficiency [30,31]. Moreover, gluten given to young rats as a single source of protein leads to reduced growth and lower fat mass. The PER method has been widely used since 1919, but other predictors of nutritional quality are now preferred. PER has indeed major limitations, one of them being that it underestimates the value of some plant proteins for human growth and, on the contrary, overestimates the value of some animal proteins due to higher IAA needs of young rats compared to humans [18].

Nitrogen balance provides information about the protein status of individuals consuming test meals. After ingestion of a protein-free diet for 10 days, the balance was negative due to the absence of nitrogen intake and the maintenance of nitrogen losses. Rats fed pea protein and gluten had greater nitrogen urinary losses and thus lower nitrogen balances than rats fed casein, probably because of a protein synthesis limitation due to the deficiency in Met and lysine, respectively. Supplementing pea protein with Met is sufficient to obtain a comparable nitrogen balance as rats fed casein. Fecal nitrogen digestibility of pea protein without and with Met supplementation was greater than 95%, leading to a

PDCAAS over 1. Those results are comparable with a previous study on the same pea protein isolate, where true nitrogen digestibility was 97.3% and the PDCAAS was 0.93 for adults [23]. We observed a greater fecal digestibility for pea protein isolate than in other studies addressing protein digestibility of whole pea (89.0%[24], 87.9%[32]). The purification of protein and the resulting elimination of anti-nutritional factors and fiber can explain this difference [14,33]. Mean cecal AA digestibility of pea protein was greater than digestibility of casein and gluten. Cecal AA digestibility of pea was lowest for SAA, which is consistent with Sarwar *et al.* where the true digestibility of methionine and cysteine was 44% lower than the digestibility of the protein [21]. Pea protein had lower SAA content than casein and gluten but still met the requirements of the older child, adolescent and adult defined by the FAO [9]. The DIAAS of pea protein was 0.88 due to the lower cecal digestibility of SAA. The DIAAS of gluten was low due to the limiting content in lysine. Nevertheless, Met supplementation up to the Met concentration in casein enabled an increase of pea protein DIAAS to 1.10, and thus counteracted the limitation and improved its nutritional quality. The PDCAAS and DIAAS of pea protein in our experimental conditions were greater than figures obtained by Rutherfurd *et al.* [24] for a pea protein concentrate (0.89 and 0.82, respectively) using the 1 to 2-year-old child reference pattern defined by the FAO [18]. In addition, we found that PDCAAS overestimated the DIAAS for all protein sources, as described by Rutherfurd *et al.* in growing rats [24] and by Mathai *et al.* in pigs [34]. Indeed, protein (N) digestibility is overestimated at the fecal, compared to ileal, level due to microbial activity. Cecal digestibility was used as a proxy for ileal digestibility and this is a limitation of our study. We determined cecal digestibility because of the low amount of ileal content that can be sampled at a unique time point in rats and the difficulty of finding a reliable indigestible marker, which leads to uncertainties [35,36]. The method we used was developed previously [17] and consists of collecting gastrointestinal contents from all segments of the gastrointestinal tract 6 h after meal intake. It facilitates a compromise between complete digestion and minimal duration of fermentation of digesta in the cecum. However, we cannot exclude the possibility that the values of cecal AA digestibility have been over- or underestimated in comparison to ileal digestibility.

Surprisingly, fecal nitrogen digestibility and mean AA cecal digestibility of casein were lower than for pea and gluten. This low fecal digestibility was due to the fecal nitrogen losses that were significantly greater in the casein group (data not shown). However, casein is known to be highly digestible: comparable studies using rats observed fecal digestibility of 99% for casein [22] or 98% for milk protein concentrate, which is composed mainly of casein [24]. The low digestibility of casein determined in our study might be explained by an underestimation of endogenous losses of nitrogen and AA. The greater digestibility found for pea protein and gluten could also result from rat metabolic adaptation in response to the respective Met and lysine deficiencies in their diets.

The assessment of AA digestibility is highly dependent on an accurate evaluation of intestinal endogenous AA losses [37], which we measured through the protein-free diet method. The endogenous losses of nitrogen and AA are affected by animal and dietary factors [38]. Among them, specific losses influenced by diet composition contribute to more than 50% of the total endogenous IAA [39]. Different methods can be used to estimate endogenous losses and they have been studied principally in pig models. The protein-free diet method is one of the reference methods to measure endogenous nitrogen and AA losses, but it has some limitations, the main one being its non-physiological nature [40]. The lack of gut stimulation induced by the absence of protein in the diet may lead to abnormal protein metabolism [41] and underestimation of the endogenous gut nitrogen losses [38]. Indeed, it was found that feeding pigs a protein-free diet causes a quantitative reduction in endogenous nitrogen secretion [42]. As casein is known to be a high quality protein, the low digestibility we found may have come from the calculation of the endogenous losses. An underestimation of the endogenous losses would lead to overestimated exogenous losses and thus to an underestimated digestibility. The same hypothesis can be made concerning the rats fed pea protein supplemented with Met, as mean cecal AA digestibility was lower for supplemented pea protein compared to pea protein alone. Furthermore, rats fed casein and pea protein supplemented with Met had higher body weights than rats fed pea protein and gluten, a consequence of a better response to the nutritional needs explained by the well-balanced amino acid profiles of their dietary protein sources. It is thus possible that endogenous losses were greater in these groups. Indeed, pea and gluten groups might have had reduced endogenous nitrogen and AA losses due to the limiting content of Met and lysine in their respective diets. Thus, underestimation of endogenous losses induced by the protein-free diet method may explain the lower AA digestibility obtained for casein and pea protein supplemented with Met. Moreover, the duration of the protein-free diet we used in our study before assessing digestibility could have driven rat metabolisms towards a reduction of endogenous losses. As reviewed by Jansman *et al.*, the length of the pre-test period, which usually lasts no longer than 7 days, may impact the amount of nitrogen and AA composition of ileal endogenous losses [41]. However, the duration of the feeding period in our study is in accordance with the FAO protocol for determining the true digestibility in rats, which recommends 9 days of diet (4-day preliminary period and 5-day balance period) [18]. Besides, a minimum 7-day period was necessary to measure nitrogen balance.

Another method could have been carried out to measure endogenous losses, such as the enzymatically hydrolyzed casein method used by Rutherfurd *et al*. to study the impact of protein structure on endogenous ileal AA and true ileal AA digestibility in rats [43]. Each of these methods, however, has limitations and requires making questionable assumptions. According to Stein *et al.*, despite its criticisms, the protein-free diet method is still recommended over the other methods [44].

In conclusion, pea protein isolate was highly digestible under the experimental conditions carried out in this study, for both nitrogen and AAs. The DIAAS obtained for pea protein was 0.88, showing that this protein isolate has a good nutritional quality. Moreover, Met supplementation reaching the concentration in casein increased the DIAAS to 1.10, covering AA requirements. Some differences between the digestibility values of tested proteins might be attributed to the method chosen to measure endogenous losses of nitrogen and AA, even though the protein-free diet method is widely used. This study demonstrated that supplementing pea protein with Met was enough to improve its nutritional quality in terms of capacity to ensure growth and digestibility.

Acknowledgments

We thank Morgane Dufay, Catherine Chaumontet and Romain Tessier from UMR PNCA for their contributions to animal testing.

Financial support

The project was funded by Roquette.

Conflict of interest

C.G., N.K., D.A.M. and J.C. declare that they have no conflict of interest. F.G., L.G.D. and C.L.M. are employed by Roquette.

Authorship

The authors' responsibilities were as follows: C.G., J.C., L.G.D., and C.L.M. contributed to the conception and design of the study; F.G., J.C. and N.K. conducted the research; F.G. and J.C. analyzed the data; F.G. wrote the original draft of the paper; J.C., C.G., L.G.D., and C.L.M. reviewed and edited the manuscript; C.G. and D.A.M. administered the project; and all authors read and approved the final manuscript.

References

(1) Millward DJ, Layman DK, Tomé D, et al. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. Am J Clin Nutr 2008;87(5):1576S–1581S.

(2) Davis J, Sonesson U, Baumgartner DU, et al. Environmental impact of four meals with different protein sources: Case studies in Spain and Sweden. Food Res Int 2010;43(7):1874–84.

(3) Tome D. Criteria and markers for protein quality assessment – a review. Br J Nutr 2012;108(S2):S222–9.

(4) Lee WT, Weisell R, Albert J, et al. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods proposed by an FAO expert working group in 2014. J Nutr 2016;146(5):929–32.

(5) Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. Pharmacol Res 2013;68(1):95–107.

(6) Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. Br J Nutr 2012;108(S2):S238–46.

(7) 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(S2):S247–57.

(8) van der Wielen N, Moughan PJ, Mensink M. Amino acid absorption in the large intestine of humans and porcine models. J Nutr 2017;147(8):1493–8.

(9) Report of an FAO expert consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

(10) Hood-Niefer SD, Warkentin TD, Chibbar RN, et al. 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(1):141–50.

(11) Gueguen, J. BJF, Cerletti, P. Proteins of some legume seeds: soyabean, pea, faba bean and lupin. In: New and Developing Sources of Food Proteins. London: Chapman & Hall; 1994. page 145–193.

(12) 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(1):107–110.

(13) Mariotti F, Pueyo ME, Tome D, et al. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. 2001;131:1706–1713.

(14) 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(S2):S315–32.

(15) Gausserès N, Mahé S, Benamouzig R, et al. The gastro-ileal digestion of 15 N-labelled pea nitrogen in adult humans. Br J Nutr 1996;76(1):75–85.

(16) 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(11):1939–51.

(17) Tessier R, Khodorova N, Calvez J, et al. 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 2019;00:1–8.

(18) Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Protein quality evaluation. Bethesda, Md., USA 4-8 December 1989. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1991.

(19) Rutherfurd SM, Gilani GS. Amino Acid Analysis. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, et al., editors. Current Protocols in Protein Science. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009. page 11.9.1-11.9.37.

(20) Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, Weltgesundheitsorganisation, FAO, et al., 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.

(21) Gilani GS, Peace RW, Botting HG, et al. Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. Plant Foods Hum Nutr 1989;39(1):23–32.

(22) Gilani GS, Sepehr E. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. J Nutr 2003;133(1):220–225.

(23) Yang H, Guérin-Deremaux L, Zhou L, et al. Evaluation of nutritional quality of a novel pea protein. Agro Food Ind Hi-Tech 2012;23(8):10.

(24) Rutherfurd, S M, Fanning, A C, Miller, B J, et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. J Nutr 2015;145(2):372–9.

(25) Bajaj S, Mickelson O, Lillevik HA, et al. Prediction of protein efficiency ratio of peas from their albumin content 1. Crop Sci 1971;11(6):813–5.

(26) Chapman, D G, Castillo, R, Campbell, J A. Evaluation of protein in foods: 1. A method for the determination of protein efficiency ratios. Can J Biochem Physiol 1959;37.

(27) Peterson, A D, Baumgardt, B R. Influence of level of energy demand on the ability of rats to compensate for diet dilution. J Nutr 1971;101:1069–74.

(28) Government of Canada CFIA. Elements within the Nutrition Facts Table [Internet]. [cited 2020 Jan 2];Available from: https://www.inspection.gc.ca/food/requirements-and-guidance/labelling/industry/nutrition-labelling/elements-within-the-nutrition-facts-table/eng/1389206763218/1389206811747?chap=7#s10c7

(29) Gahl MJ, Finke MD, Crenshaw TD, et al. Use of a four-parameter logistic equation to evaluate the response of growing rats to ten levels of each indispensable amino acid. J Nutr 1991;121(11):1720–1729.

(30) Gietzen DW, Hao S, Anthony TG. Mechanisms of food intake repression in indispensable amino acid deficiency. Annu Rev Nutr 2007;27(1):63–78.

(31) McCoy, R H, Meyer, C E, Rose, W C. Feeding experiments with mixtures of highly purified amino acids. 8. Isolation and identification of a new essential amino acid. 1935;112:283–302.

(32) Nosworthy MG, Neufeld J, Frohlich P, et al. Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses. Food Sci Nutr 2017;5(4):896–903.

(33) Le Gall M, Warpechowski M, Jaguelin-Peyraud Y, et al. Influence of dietary fibre level and pelleting on the digestibility of energy and nutrients in growing pigs and adult sows. animal 2009;3(3):352–9.

(34) 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). Br J Nutr 2017;117(4):490–9.

(35) Fuller MF, Tomé D. In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. J AOAC Int 2005;88(3):923–34.

(36) Deglaire A, Moughan PJ. Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. Br J Nutr 2012;108(S2):S273–81.

(37) Stein HH, Pedersen C, Wirt AR, et al. Additivity of values for apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in mixed diets fed to growing pigs. J Anim Sci 2005;83(10):2387–2395.

(38) Nyachoti, C M, de Lange, C F M, McBride, B W, et al. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. Can J Anim Sci 1997;77(1):149–63.

(39) Digestive physiology in pigs: proceedings of the 5. International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, Wageningen (Doorwerth), Netherlands, 24-26 April 1991. 1991;

(40) Low AG. Nutrient absorption in pigs. J Sci Food Agric 1980;31(11):1087–1130.

(41) Jansman AJM, Smink W, van Leeuwen P, et al. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum of pigs. Anim Feed Sci Technol 2002;98(1):49–60.

(42) Buraczewska L. Secretion of nitrogenous compounds in the small intestine of pigs. Acta Physiol Pol 1979;30:319–26.

(43) Rutherfurd SM, Cui J, Goroncy AK, et al. Dietary protein structure affects endogenous ileal amino acids but not true ileal amino acid digestibility in growing male rats. J Nutr 2015;145(2):193–8.

(44) Stein HH, Sève B, Fuller MF, et al. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. J Anim Sci 2007;85(1):172–80.

Supplemental data

Supplemental table 1. Endogenous flow of amino acid and nitrogen in the digestive tract 6 hours after ingestion of a 4 g protein-free meal [1]

	Stomach (mg)	Ileum (mg)	Cecum (mg)
Alanine	0.83 ± 0.57	0.31 ± 0.17	2.12 ± 0.58
Arginine	1.26 ± 1.07	0.26 ± 0.11	1.76 ± 0.39
Aspartic acid	1.68 ± 1.15	0.62 ± 0.29	4.18 ± 1.03
Glutamic acid	2.75 ± 1.99	0.75 ± 0.33	4.77 ± 1.01
Histidine	0.35 ± 0.22	0.11 ± 0.05	0.71 ± 0.14
Isoleucine	0.71 ± 0.50	0.20 ± 0.09	1.46 ± 0.31
Leucine	1.46 ± 1.14	0.35 ± 0.15	2.43 ± 0.51
Lysine	0.72 ± 0.18	0.30 ± 0.14	2.09 ± 0.50
Methionine	0.31 ± 0.19	0.09 ± 0.04	0.86 ± 0.29
Cysteine	1.21 ± 0.92	0.19 ± 0.09	1.36 ± 0.44
Phenylalanine	0.76 ± 0.55	0.19 ± 0.08	1.37 ± 0.28
Serine	1.50 ± 1.20	0.34 ± 0.15	1.58 ± 0.34
Tyrosine	0.80 ± 0.67	0.18 ± 0.08	1.28 ± 0.30
Threonine	0.97 ± 0.64	0.39 ± 0.18	1.94 ± 0.39
Valine	0.98 ± 0.65	0.30 ± 0.13	2.05 ± 0.40
Nitrogen	3.43 ± 2.35	1.17 ± 0.58	7.12 ± 1.54

SD, standard deviation

[1] Values are means on 9 rats fed with a protein-free diet for 10 days prior to collection of digesta.

3.2. Article 2 : Utilisation de la digestibilité cæcale comme approximation de la digestibilité iléale des protéines chez le rat

Article en cours de soumission

Résumé

Objectifs

Le modèle rat peut être utilisé pour évaluer la digestibilité des protéines rapidement et en première intention. Il est recommandé d'évaluer la digestibilité des protéines et des AA au niveau iléal. Cependant, il n'existe pas de méthode standardisée pour évaluer la digestibilité iléale chez le rat, car le recueil des digesta iléaux ne peut pas être effectué en continu. L'objectif de l'étude est de comparer plusieurs méthodes d'évaluation de la digestibilité des protéines, selon le site de collecte (iléon ou cæcum) et selon l'utilisation ou non d'un marqueur non-absorbable.

Méthodes

Trente-six rats mâles Wistar ont reçu un repas calibré contenant de la caséine, du gluten, ou de la protéine de pois comme unique source de protéines. Un régime protéiprive a été inclus pour la mesure des pertes endogènes (n = 9/groupe). De l'oxyde de chrome (Cr_2O_3) a été ajouté dans le repas comme marqueur non-absorbable. L'ensemble du contenu digestif a été recueilli 6 h plus tard. La teneur en azote et en chrome (Cr) a été mesurée dans les régimes alimentaires et les digesta.

Résultats

Malgré un recueil exhaustif du contenu de l'ensemble du tube digestif, la récupération du Cr_2O_3 était incomplète et variable selon le régime (81%, 68%, 25% et 75% pour la caséine, le gluten, la protéine de pois et le groupe protéiprive, respectivement). Le groupe protéine de pois a été exclu des calculs de digestibilité suite à la mauvaise récupération du Cr_2O_3 pour ce groupe. La digestibilité vraie de l'azote était variable selon la méthode, entre 94% et 96% pour le gluten et entre 89% et 94% pour la caséine. Aucune différence significative n'a été constatée entre les méthodes.

Conclusion

Bien qu'aucune des méthodes testées ne soit optimale, les résultats suggèrent que la mesure des pertes digestives au niveau cæcal peut être utilisée pour déterminer la digestibilité des AA chez le rat sans utiliser de marqueur non-absorbable. La digestibilité cæcale pourrait alors approximer la digestibilité iléale. L'utilisation du contenu cæcal permettrait d'augmenter la quantité de digesta disponible pour les analyses, et éviterait les biais liés à la récupération du marqueur.

Cecal digestibility as an approximation of ileal protein digestibility evaluation in rats

Authors and institutions

Florence M. Guillin[1,2], Claire Gaudichon[1], Laetitia Guérin-Deremaux[2], Catherine Lefranc-Millot[2], Nadezda Khodorova[1], Stéphane Besançon[3], Juliane Calvez[1]

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

[2]Roquette, 62080, Lestrem, France

[3]UMR GENIAL, AgroParisTech, INRAE, Université Paris-Saclay, 91300, Massy

Corresponding author

Juliane Calvez

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

Phone number: +33 1 44 08 86 77

Email: juliane.calvez@agroparistech.fr

Abbreviations

AA: amino acid, AAS: atomic absorption spectrophotometry, AIA: acid-insoluble ash, Cr: chromium, Cr_2O_3: chromium oxide, Cr-cecum: cecal digestibility calculated from non-absorbable marker recovery, Cr-ileum: ileal digestibility calculated from non-absorbable marker recovery, N: nitrogen, No marker-cecum: cecal digestibility calculated without using a marker, SD: standard deviation, TiO_2: titanium dioxide

Keywords

Protein digestibility, cecum, indigestible marker, chromium oxide

Abstract

Objective

The rat model can be used to assess protein digestibility rapidly and in first intention. It is recommended to evaluate protein and amino acid (AA) digestibility at the ileal level. However, there is no standardized method for ileal digestibility evaluation in rats, as the collection of ileal digesta cannot be performed continuously. The objective of the study is to compare several methods for assessing protein digestibility, depending on the collection site (ileum or cecum) and whether or not a non-absorbable marker is used.

Methods

Thirty-six Wistar male rats were given a calibrated meal containing either casein, gluten, or pea protein as a sole source of protein. A protein-free diet was included for measurements of endogenous losses (n = 9/group). Chromium oxide (Cr_2O_3) was added in the meal as a non-absorbable marker. The entire digestive content was collected 6 h later. Nitrogen and chromium (Cr) content was measured in diets and digesta.

Results

Despite exhaustive collection of intestinal tract content, Cr_2O_3 recovery was incomplete and variable depending on the diet (81%, 68%, 25% and 75% for casein, gluten, pea protein and protein-free groups, respectively). Pea protein group was removed from digestibility calculations due to a poor Cr_2O_3 recovery. Depending on the method, true N digestibility ranged from 94% to 96% for gluten and from 89% to 94% for casein. No significant difference was found between the methods.

Conclusion

Although none of the methods tested is optimal, the results may suggest that evaluation of digestive loss at the cecal level can be used to determine digestibility in rats without using a non-absorbable marker, and cecal digestibility can be an approximation of ileal digestibility. The use of cecal content would increase the amount of digesta available for analysis and avoid bias related to marker recovery.

Introduction

Digestibility is a main criteria of protein quality and can be evaluated in human nutrition using animal models such as pigs and rats [(1)]. Its methodological stakes relies on the measurement of the digestive losses of nitrogen and amino acid (AA). As AAs are absorbed in the small intestine, it is recommended to evaluate the nitrogen and AA losses in the ileum content rather than in the feces, to avoid bias

induced by the activity of the colonic microbiota [2]. The laboratory rat is the simplest model for ileal digestibility assessment *in vivo* and is widely used in practice [3]. However, the digesta cannot be collected continuously by means of a cannula or ileostomy techniques in rats, as it is carried out in pigs. Thus, the digestive content has to be collected at a unique sample time after meal ingestion and complete quantitative collection of ileal digesta containing dietary losses is not possible. To correct for this incomplete collection, a non-absorbable marker is usually used. The marker needs to be totally indigestible and should have a high recovery rate, defined as the ratio between the quantity collected from the total collection and the quantity that was ingested [4]. Some commonly used non-absorbable markers are chromium oxide (Cr_2O_3), titanium dioxide (TiO_2), or acid-insoluble ash (AIA) [5]. However, there are several issues concerning the use of non-absorbable markers in digestibility studies. The recovery rate may be variable across markers [6,7], from complete recovery [8] to a rate substantially below 100% [4,9,10]. Therefore, the choice of marker may affect the measurement of ileal digestibility. Some studies have also shown that other components of the diet may interact with the non-absorbable marker recovery [9,11,12]. Moreover, large quantity of digesta are usually needed to assay the non-absorbable marker and the methodology may not be easily implemented. Another difficulty in the evaluation of the ileal digestibility in rats lies in the low amount of digestive content in ileum [13]. Indeed, according to previous studies on digestibility, the ileum of the rat is generally limited to the 20 [3,14–17] or the 10 [18,19] last cm of the small intestine . Consequently, only a small volume of digestive content is available for analyses.

An alternative technique for ileal digestibility is to use cecal digestibility as an approximation for ileal digestibility [20]. Like in other rodent species, the cecum of the rat is large [21] and accumulates the digesta leaving the small intestine before it enters the colon. It can therefore be assumed that a large part of the losses of dietary nitrogen and AAs can be collected in the cecum after an appropriate digestion time, which may dispense with the use of an indigestible marker. Indeed, in several studies, most of the dietary nitrogen is found in the cecum 5 to 6 hours after ingestion, which appeared to be an optimal time to collect the digesta [19,22]. This method has been used in previous studies and yielded close digestibility values when compared to studies using ileal sampling. For instance, nitrogen digestibility of whey protein isolate has been determined to be 98.3 ± 0.5% when assessed at cecal level [23] and 99.0 ± 0.5% at ileal level in rats [15]. This intermediate method avoids the bias related to marker utilization and enables to collect a large amount of digesta for multiple analyses. However, the different methods have not been compared within the same study. The aim of this work was to compare several methods for assessing the true protein ileal digestibility in rats, depending on the collection site (ileum or cecum) and the presence or absence of a non-absorbable marker. The marker

chosen in the study was Cr_2O_3, and three different protein sources were tested: milk casein, wheat gluten and pea protein isolate.

Methods

This study was conducted in compliance with the EU directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the Ethics Committee in Animal Experiment of INRA Jouy-en-Josas (Comethea, registration number: 17-20) and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS #11921-2017091818236657). The rats were obtained from Envigo laboratories and were housed in individual cages under controlled conditions (room temperature 22 ± 2°C, photoperiod 12 h light:12 h dark).

Diets and proteins

All the experiments started after a 6-day adaptation period during which the animals were fed a standard chow diet. The rats were randomly split into experimental groups according to diets (**Table 1**). All diets were isocaloric (3.7 kcal/g), isonitrogenous and provided the same amount of carbohydrates and fat. They differed from each other in the protein source, only. Pea protein isolate (NUTRALYS® S85F) and hydrolyzed wheat gluten (NUTRALYS® W) were provided by Roquette (Lestrem, France). Micellar casein isolate (PRODIET® 85B) was obtained from Ingredia (Arras, France). The amount of test protein was calculated using the nitrogen-to-protein conversion factor of 6.25 (total N content × 6.25). The rats had free access to water throughout the duration of the experiment.

Rats and experimental design

Thirty-six Wistar male rats weighing 250 ± 5 g were fed a diet containing 14% protein for 10 days. They were divided into four groups (n = 9/group): casein, gluten, pea protein and a protein-free diet. The rats were housed on a reversed light cycle (dark period from 7 a.m. to 7 p.m.) in cages with wire bottoms to prevent coprophagia. They were trained to eat a small calibrated meal in a short time at the beginning of the dark period, as described previously [18]. After a 10-day habituation period to the diets, the rats were given a calibrated meal of 4 g (dry weight) of their respective diets containing 16 mg of Cr_2O_3 (10.9 mg of Cr) and were euthanized 6 h later by intracardiac puncture under isoflurane anesthesia. Gastro-intestinal segments were identified as stomach, proximal intestine, ileum (defined as the last 10 cm of the small intestine), cecum, and colon. The luminal content of each segment was collected entirely, weighed, stored at -20 °C and freeze-dried. The feces lost from the test meal were identified by the green color of Cr_2O_3 and picked up from 3 h after ingestion to euthanasia.

Table 1. Composition of the experimental diets

	Casein diet		Gluten diet		Pea diet		Protein-free diet	
	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy	g/kg DM	% of energy
Micellar casein isolate	105	14	0	0	0	0	0	0
Hydrolyzed wheat gluten	0	0	105	14	0	0	0	0
Pea protein isolate	0	0	0	0	105	14	0	0
Starch	564	64	564	64	564	64	658	75
Sucrose	93	10	93	10	93	10	109	12
Soybean oil	38	11	38	11	38	11	45	12
Mineral mix [1]	35	0	35	0	35	0	35	0
Vitamin mix [1]	10	0	10	0	10	0	10	0
Cellulose	50	1	50	1	50	1	50	1
Choline	2.3	0	2.3	0	2.3	0	2.3	0

DM, dry matter

[1] Formulated from AIN-93M [24]

Chemical analysis

Nitrogen (N) content of diets, digesta and feces was measured with an elementary N analyzer based on the Dumas method (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France). Endogenous losses of nitrogen were estimated in each segment from rats fed the protein-free diet to calculate a true digestibility. Cr content was assessed in each segment (stomach, proximal intestine, ileum, cecum, and colon), feces and test diets on an atomic absorption spectrophotometer (contrAA® 800, Analytik Jena). The samples were turned to ashes at 550 °C and solubilized in nitric acid prior to reading at 357 nm in flame mode.

Calculations

Three methods were tested: ileal digestibility calculated from non-absorbable marker recovery (Cr-ileum), cecal digestibility calculated from non-absorbable marker recovery (Cr-cecum), and cecal digestibility calculated with the assumption that we quantitatively collected all the dietary losses and that a large majority remained in the cecum 6 h after meal ingestion (no marker-cecum).

Recovery of Cr was calculated as follows:

$$\text{Cr recovery in segment (\%)} = \frac{Cr_{segment}}{Cr_{ingested}} \times 100$$

Distribution of ingested meal throughout the digestive tract was determined based on Cr recovery distribution. Cecal and ileal nitrogen digestibilities in the marker techniques (Cr-cecum, Cr-ileum) were calculated as follows:

$$\text{True N digestibility segment } \textit{(ileum or cecum)} = \frac{(\text{Cr recovery in segment} \times N_{ingested}/100) - N_{dietary}\text{ segment}}{\text{Cr recovery in segment} \times N_{ingested}/100}$$

Cecal nitrogen digestibility in the no marker technique was calculated as follows:

$$\text{True cecal N digestibility} = \frac{N_{ingested} - (N_{ileum\ dietary} + N_{cecum\ dietary})}{N_{ingested}} \times 100$$

$N_{dietary}$ in ileum and cecum was defined as: $N_{dietary} = N_{total} - N_{endogenous}$

$N_{endogenous}$ were the endogenous losses of nitrogen in ileum and cecum, measured through the digestive losses in protein-free group. In the no marker technique, $N_{ingested}$ excluded the residual amount of dietary nitrogen recovered in the stomach.

Statistical analysis

The values are expressed as means ± standard deviation (SD). The animal trial was split into two series for practical purpose. The influence of the protein group on Cr recovery was assessed using a two-way ANOVA with a random series effect. When an overall significant difference was observed ($P < 0.05$), a side-by-side comparison was made between diets using Bonferroni correction.

The influence of the intestinal segment (ileum or cecum) on true nitrogen digestibility was tested for each protein using a mixed model with method and protein as fixed effects and two random effects (animal and series). When an overall significant difference was observed ($P < 0.05$), a side-by-side comparison was made between methods. The influence of the site of collection digesta (segment effect) was tested by comparing the results from Cr-ileum and Cr-cecum methods. The influence of the use of a non-absorbable marker (marker effect) was tested by comparing the results from Cr-cecum and no marker-cecum methods.

Results

The quantity of digesta collected in the different segments of the gastro-intestinal tract is presented in **Figure 1.A**. In the ileum, between 39 ± 25 mg of digesta for pea group and 60 ± 35 mg for gluten group was collected 6 h after meal ingestion, with a mean of 53 ± 9 mg for all rats. In the cecum, large amount of digesta was collected, varying from 411 ± 94 mg for protein-free group to 510 ± 143 for casein group and with a mean of 453 ± 43 mg for all rats.

Cr recovery in the entire digestive tract was incomplete and variable depending on the diet, reaching 81 ± 11% for casein group, 68 ± 15% for gluten group, and 75 ± 12% for protein-free group (**Table 2**). Total Cr recovery was only 25 ± 12% in pea protein group, much lower than in the other groups ($P < 0.001$). Consequently, pea protein group was removed from the study for digestibility measurements. The majority of ingested Cr was found in the cecum of the rats. This result was in accordance with the high amount of digesta collected in this segment, representing in average 42% of the total digestive content after 6 h of digestion (**Figure 1.A**). When expressed as the percentage of total marker recovery along the digestive tract (excluding stomach), 80% of the meal was located in the ileum and cecum 6 h after ingestion for casein and gluten groups, and 65% for protein-free group.

The total N recovered from the digestive tract of the rats came in majority from the proximal intestine, with a high contribution of endogenous N, according to the values obtained in protein-free group (**Figure 1.B**). Dietary nitrogen stands for the digestive losses of N from the test proteins. The amount of dietary N was obtained by removing the N content found in the digesta of protein-free rats from the N content in the other groups, for each segment. The proximal intestine and the cecum concentrated the majority of the dietary N, with a strong inter-individual variability (**Table 3**). The quantity found in ileum was low explained by the small amount of digestive content in this segment (only 4% in average, **Figure 1.A**).

Four rats had to be removed from the calculation of ileal digestibility for Cr-ileum method in casein group and three rats in gluten group because digestive content in ileum was lacking for Cr analysis, resulting in $n = 5$ and $n = 6$ in casein and gluten groups respectively. True N digestibility ranged from 93% to 96% for gluten and from 89% to 94% for casein (**Table 4**). The protein source showed an effect on digestibility ($P < 0.05$) even though the inter-individual variability was notable. The digestibility of gluten appeared to be higher than the digestibility of casein. No significant difference was found between the methods for both proteins, and the variability was high, especially in casein group. The choice of gastro-intestinal segment for the assessment of digestive losses (ileum or cecum) had no effect on digestibility results, as shown by side-by-side comparison between Cr-ileum and Cr-cecum

methods (P = 0.44 and 0.93 in casein and gluten groups respectively). The use of the non-absorbable marker Cr_2O_3 in the calculations had no effect on true digestibility, as revealed by the comparison between Cr-cecum and no marker-cecum methods (P = 0.13 and 0.30 in casein and gluten groups respectively).

Table 2. Cr recovery (%) in the gastro-intestinal segments of the rats for each diet group determined by AAS [1]

%	Stomach	Proximal intestine	Ileum	Cecum	Colon + feces	Total
Protein-free	3.4 ± 7.4	2.3 ± 2.9	3.2 ± 2.7 [ac]	43.5 ± 18.4 [a]	23.7 ± 21.7 [a]	75.3 ± 12.0 [a]
Casein	4.5 ± 8.7	2.0 ± 2.6	5.5 ± 2.2 [ab]	56.7 ± 16.2 [a]	13.2 ± 11.4 [ab]	81.2 ± 10.7 [a]
Gluten	1.5 ± 0.9	2.4 ± 3.7	9.5 ± 3.9 [b]	50.0 ± 13.4 [a]	8.0 ± 8.8 [b]	68.1 ± 15.4 [a]
Pea protein	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.9	2.3 ± 1.6 [c]	19.5 ± 12.2 [b]	3.9 ± 2.2 [b]	25.0 ± 12.3 [b]
Group effect, P-value	*n.s.*	*n.s.*	*P < 0.001*	*P < 0.001*	*P = 0.01*	*P < 0.001*

AAS, atomic absorption spectrophotometry; Cr; chromium; data are presented as mean ± standard deviation.

[1] There was a significant effect of the protein source on Cr recovery in ileum, in cecum, in colon and feces, and in total Cr recovery (n = 9 rats/group). The protein source had no effect on Cr recovery in stomach and in proximal intestine. Different superscript letters in the same column indicate significant differences (post-hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, P < 0.05).

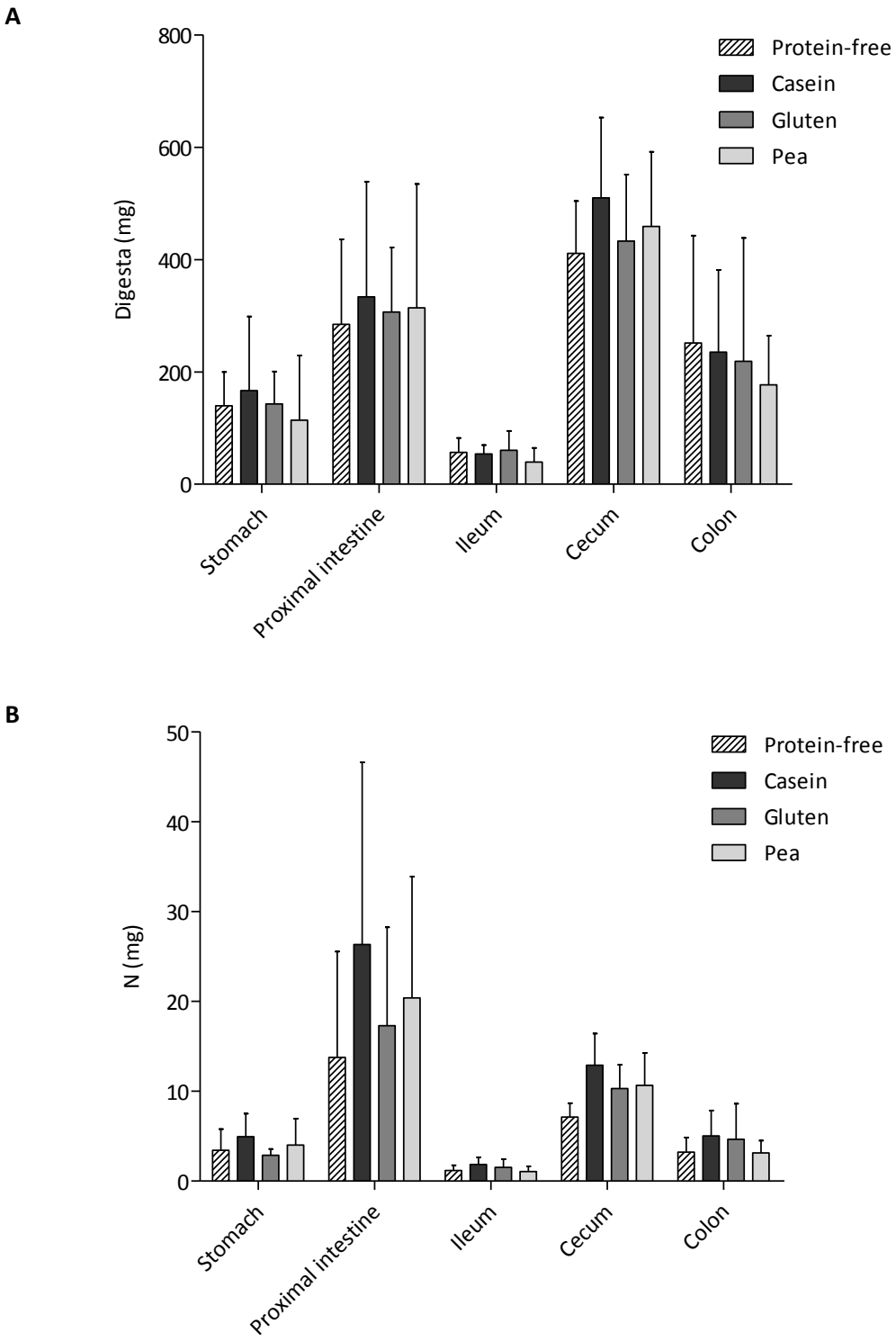

Figure 1. A. Quantity of digesta in each gastro-intestinal segment of the rats, 6h after meal ingestion. **B.** Total N collected in each gastro-intestinal segment of the rats according to their diet group, assessed by elementary analysis based on the Dumas method. Data from the protein free group are the endogenous losses of N. Values are means ± SD, n = 9 per group.

Table 3. Dietary N in each gastro-intestinal segment of the rats according to their diet group, found by difference from the total N and N from protein-free group

Diet	Dietary N content, mg				
	Stomach	Proximal intestine	Ileum	Cecum	Colon & feces
Casein	1.7 ± 2.4	14.8 ± 18.1	0.7 ± 0.8	5.8 ± 3.5	2.3 ± 2.1
Gluten	0.1 ± 0.3	5.9 ± 8.9	0.5 ± 0.8	3.3 ± 2.4	1.7 ± 3.8

SD, standard deviation

Table 4. True N digestibility of proteins calculated from three methods, using different gastro-intestinal segments for N losses assessment (ileum or cecum) and with or without the use of Cr_2O_3 marker

Diet	Cr-ileum method	Cr-cecum method	No marker-cecum method	P segment effect	P marker effect
Casein	93.7 ± 4.8	89.0 ± 5.2	91.6 ± 4.3	*n.s.*	*n.s.*
Gluten	93.6 ± 5.8	93.0 ± 4.6	95.5 ± 3.0	*n.s.*	*n.s.*

SD, standard deviation; Cr-ileum, ileal digestibility calculated from marker technique; Cr-cecum, cecal digestibility calculated from marker technique; No marker-cecum, cecal digestibility calculated without the use of Cr

Rats were removed from the calculation of ileal digestibility, n = 5 in casein group and n = 6 in gluten group for Cr-ileum method; n = 9 per group for Cr-cecum and No marker-cecum methods.

Discussion

A main objective of the study was to evaluate the effectiveness of the use of a non-absorbable marker for ileal digestibility assessment. In the present study, the recovery rate of Cr_2O_3 was incomplete and considerably below 100% in some cases, in line with other studies in pigs where Cr_2O_3 recovery was around 75% [(4)], 60% [(25)], or varying between 73% and 86% [(26)]. Another weakness of Cr_2O_3 was the high variability of its recovery rate, which was also described in previous studies [(10,26,27)]. In the present study, the assessment of Cr content in the test meals was consistent with the theoretical amount (10 mg of Cr vs 10.9 mg expected), validating our analytical method for Cr analysis. However, when performed in the digesta, the results were highly variable depending on the diet, as showed by the recovery rates ranging from 25% for rats fed pea protein to 81% for rats fed casein. The food matrix

appeared to have a strong influence on Cr determination, which was a significant weakness for a marker. Vicente *et al.* also highlighted the interaction between sample type and marker, where Cr_2O_3 was more affected than the other markers tested [28]. The complexity in chemical determination of chromium (Cr) content could explain this variability [26,29]. Cr is susceptible to interact with other cations [30]. Interference with iron in atomic absorption spectrophotometry (AAS) trials has been described previously [31]. Gunčaga *et al.* showed that the presence of traces of iron in feces samples may decrease the readings by 10 to 20% during AAS [32]. The composition of pea protein isolate and especially its iron content (0.2 g/kg) could have interfered with Cr analysis during AAS on digesta samples, leading to a low recovery rate of the marker. As a comparison, the iron content of the hydrolyzed wheat gluten we used was much lower (< 0.01 g/kg). Consequently, the Cr_2O_3 marker method do not seem optimal in the determination of ileal digestibility. Testing other non-absorbable markers would be necessary for further discussion about the effectiveness of the marker technique in general. For the present study, Cr_2O_3 was chosen because of its current use as a non-absorbable marker for digestibility studies in animal models and the applicability of Cr analysis in our laboratory. Titanium dioxide (TiO_2) and acid-insoluble ash may display higher recovery rates [27]. In a study carried out by Jagger *et al*. in pigs using several non-absorbable markers, Cr_2O_3 recovery was 75% when TiO_2 recovery reached 98% [4]. In the rat model, the recovery value of the marker is generally not assessed because the collection of digestive content is limited to the ileum [15–17]. In our study, the complete collection of digesta along the entire digestive tract enabled to calculate the recovery rate of the marker.

Cecal and ileal digestibilities were lower for casein compared to gluten, which is surprising as casein is known to be highly digestible [15,33]. This result can be explained by the use of a protein-free group to estimate the endogenous losses of nitrogen, as described in our previous study [18]. Indeed, this method is limited by the lack of gut stimulation due to the absence of protein in the diet, which may lead to a reduction in the secretion of proteolytic enzymes [34] and thus an underestimation of endogenous losses [35–38]. Moreover, the protein-free group method do not provide individualized measurements of endogenous losses, while they may vary with the source of dietary protein [39]. The low lysine content of gluten could have led to a reduced production of endogenous N losses in rats fed gluten compared to the rats fed casein, explaining the differences of digestibility we obtained between the groups.

The comparison between the methods revealed that neither the selected segment nor the use of an indigestible marker had an effect on true digestibility results. Interindividual variability was major in the two marker methods, explained by the variable recovery rate of Cr and the reduced number of rats and leading to a high SD for protein digestibility results. The SD was lower in no marker-cecum technique. The results we obtained suggest that true digestibility could be assessed in cecum instead

of ileum and without using a marker. However, none of the method is optimal and they all lead to some uncertainties. The limitations of marker method in ileal digestibility measurements are related to the low and variable recovery rate of the marker. Variability is explained by the analytical complexity of Cr determination, including the influence of the food matrix, and the interindividual differences. Marker technique benefit is also negatively impacted by the large amount of sample needed for Cr analysis compared to the limited amount of digesta available in the ileum (around 50 mg in our study). For the other markers, the quantity of sample needed for analyses are also important for accurate measurements [40,41]. Cecal digestibility method also induces its own bias. It neglects the dietary losses of N in proximal intestine and colon, which may overestimate digestibility. The entire content of the digestive tract has to be collected and analyzed. Furthermore, cecum microbial activity may less than in the colon but yet existing [42,43], which could impact the results especially for amino acid digestibility assessment. However, evaluating protein digestibility at the cecum level enables to avoid the bias induced by the variation in recovery rate of marker. It also decreases the number of analytical methods, limiting the analysis to N content determination. The quantity of digesta provided by cecum 6 h after ingestion (around 450 mg in this study, 9 times higher than in ileum) is a significant advantage especially when proteins are labelled, as isotopic analysis for AA digestibility assessment requires large amounts of samples (100mg for GCC-IRMS analyses, 10mg for UPLC analysis).

The results suggested that true cecal digestibility could approximate true ileal digestibility and dispense with the use of a non-absorbable marker, provided that the amount of N in each segment of the digestive tract is known. It would bring notable benefits, such as increasing the amount of digesta available for analysis and avoiding bias related to marker recovery.

Acknowledgments

We thank Morgane Dufay, Catherine Chaumontet and Romain Tessier from UMR PNCA for their contributions to animal testing.

Financial support

The project was funded by Roquette.

Conflict of interest

C.G., N.K., S.B. and J.C. declare that they have no conflict of interest. F.G., L.G.D. and C.L.M. are employed by Roquette.

Authorship

The authors' responsibilities were as follows: C.G., J.C., L.G.D., and C.L.M. contributed to the conception and design of the study; F.G., J.C., S.B. and N.K. conducted the research; F.G. and J.C. analyzed the data; F.G. wrote the original draft of the paper; J.C., C.G., L.G.D., and C.L.M. reviewed and edited the manuscript; C.G. administered the project; and all authors read and approved the final manuscript.

References

(1) Report of an FAO expert consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

(2) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a FAO Expert Working Group. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods, 2-5 March 2014, Bangalore, India. 2014.

(3) Rutherfurd 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(7–8):292–300.

(4) Jagger S, Wiseman J, Cole DJA, et al. Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. Br J Nutr 1992;68(3):729–39.

(5) Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. Br J Nutr 2012;108(S2):S238–46.

(6) Wang T, Adeola O. Digestibility index marker type, but not inclusion level affects apparent digestibility of energy and nitrogen and marker recovery in growing pigs regardless of added oat bran1. J Anim Sci 2018;96(7):2817–25.

(7) Olukosi OA, Bolarinwa OA, Cowieson AJ, et al. Marker type but not concentration influenced apparent ileal amino acid digestibility in phytase-supplemented diets for broiler chickens and pigs1. J Anim Sci 2012;90(12):4414–20.

(8) Fairweather-Tait SJ, Minihane AM, Eagles J, et al. Rare earth elements as nonabsorbable fecal markers in studies of iron absorption. Am J Clin Nutr 1997;65(4):970–6.

(9) Köhler T, Huisman J, Hartog LAD, et al. Comparison of different digesta collection methods to determine the apparent digestibilities of the nutrients at the terminal ileum in pigs. J Sci Food Agric 1990;53(4):465–75.

(10) Mroz Z, Bakker GCM, Jongbloed AW, et al. Apparent digestibility of nutrients in diets with different energy density, as estimated by direct and marker methods for pigs with or without ileo-cecal cannulas. J Anim Sci 1996;74(2):403–12.

(11) Yin Y-L, McEvoy JDG, Schulze H, et al. Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrients as evaluated with PVTC-cannulated or ileo-rectal anastomised pigs fed diets containing two indigestible markers. Livest Prod Sci 2000;62(2):133–41.

(12) Wang T, Ragland D, Adeola O. Combination of digestibility marker and fiber affect energy and nitrogen digestibility in growing pigs. Anim Feed Sci Technol 2017;230:23–9.

(13) Deglaire A, Moughan PJ. Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. Br J Nutr 2012;108(S2):S273–81.

(14) Rutherfurd, S M, Moughan, P J. The Digestible Amino Acid Composition of Several Milk Proteins: Application of a New Bioassay. J Dairy Sci 1997;81:909–17.

(15) Rutherfurd, S M, Fanning, A C, Miller, B J, et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. J Nutr 2015;145(2):372–9.

(16) Han F, Han F, Wang Y, et al. Digestible indispensable amino acid scores of nine cooked cereal grains. Br J Nutr 2019;121(1):30–41.

(17) Rutherfurd SM, Montoya CA, Moughan PJ. Effect of Oxidation of Dietary Proteins with Performic Acid on True Ileal Amino Acid Digestibility As Determined in the Growing Rat. J Agric Food Chem 2014;62(3):699–707.

(18) Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, et al. Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine. Br J Nutr 2020;1–9.

(19) Tessier R, Khodorova N, Calvez J, et al. 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 2019;00:1–8.

(20) AFSSA. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. 2007.

(21) Snipes RL. Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. Anat Embryol (Berl) 1981;162(4):455–74.

(22) Oberli M, Douard V, Beaumont M, 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(2):1700570.

(23) Lacroix M, Léonil J, Bos C, et al. Heat Markers and Quality Indexes of Industrially Heat-Treated [15N] Milk Protein Measured in Rats. J Agric Food Chem 2006;54(4):1508–17.

(24) 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(11):1939–51.

(25) Moughan PJ, Butts CA, van Wijk H, et al. An acute ileal amino acid digestibility assay is a valid procedure for use in human ileostomates. J Nutr 2005;135(3):404–9.

(26) Yin Y-L, McEvoy JDG, Schulze H, et al. Studies on cannulation method and alternative indigestible markers and the effects of food enzyme supplementation in barley-based diets on ileal and overall apparent digestibility in growing pigs. Anim Sci 2000;70(1):63–72.

(27) Kavanagh S, Lynch PB, O'Mara F, et al. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. Anim Feed Sci Technol 2001;89(1–2):49–58.

(28) Vicente F, Sarraseca A, de Vega A, et al. Performance of several Cr and Yb analytical techniques applied to samples of different biological origin (digesta or faeces). J Sci Food Agric 2004;84(15):2035–40.

(29) Goullé J-P, Saussereau É, Mahieu L, et al. Validation du dosage du chrome par ICP-MS avec cellule de collision dans les matrices biologiques et concentrations usuelles. Ann Toxicol Anal 2011;23(4):211–6.

(30) García E, Cabrera C, Lorenzo ML, et al. Estimation of chromium bioavailability from the diet by an in vitro method. Food Addit Contam 2001;18(7):601–6.

(31) Kinson K, Hodges RJ, Belcher CB. The determination of chromium in low-alloy irons and steels by atomic absorption spectrophotometry. Anal Chim Acta 1963;29:134–8.

(32) Gunčaga J, Lentner C, Haas HG. Determination of chromium in feces by atomic absorption spectrophotometry. Clin Chim Acta 1974;57(1):77–81.

(33) Gilani GS, Sepehr E. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. J Nutr 2003;133(1):220–225.

(34) Fuller MF, Tomé D. In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. J AOAC Int 2005;88(3):923–34.

(35) Butts CA, Moughan PJ, Smith WC. Endogenous amino acid flow at the terminal ileum of the rat determined under conditions of peptide alimentation. J Sci Food Agric 1991;55(2):175–187.

(36) Leterme P, Monmart T, Théwis A, et al. Effect of Oral and Parenteral N Nutrition vs N-Free Nutrition on the Endogenous Amino Acid Flow at the Ileum of the Pig. J Sci Food Agric 1996;71(2):265–71.

(37) Moughan PJ, Leenaars GSM. Endogenous amino acid flow in the stomach and small intestine of the young growing pig. J Sci Food Agric 1992;60(4):437–42.

(38) Moughan PJ, Butts CA, Rowan AM, et al. Dietary peptides increase endogenous amino acid losses from the gut in adults. Am J Clin Nutr 2005;81(6):1359–65.

(39) Stein HH, Sève B, Fuller MF, et al. Invited review: Amino acid bioavailability and digestibility in pig feed ingredients: Terminology and application. J Anim Sci 2007;85(1):172–80.

(40) Short FJ, Gorton P, Wiseman J, et al. Determination of titanium dioxide added as an inert marker in chicken digestibility studies. Anim Feed Sci Technol 1996;59(4):215–21.

(41) McCarthy JF, Aherne FX, Okai DB. Use of HCL insoluble ash as an index material for determining apparent digestibility with pigs. Can J Anim Sci [Internet] 2011 [cited 2021 Jan 8];Available from: https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.4141/cjas74-016

(42) Noack J, Dongowski G, Hartmann L, et al. The Human Gut Bacteria Bacteroides thetaiotaomicron and Fusobacterium varium Produce Putrescine and Spermidine in Cecum of Pectin-Fed Gnotobiotic Rats. J Nutr 2000;130(5):1225–31.

(43) Islam KBMS, Fukiya S, Hagio M, et al. Bile Acid Is a Host Factor That Regulates the Composition of the Cecal Microbiota in Rats. Gastroenterology 2011;141(5):1773–81.

3.3. Article 3 : Digestibilité iléale réelle des acides aminés de la protéine de pois en comparaison à la caséine chez l'Homme sain

Article en cours de soumission

Résumé

Objectifs

Il est nécessaire de proposer des alternatives végétales aux protéines animales qui soient de bonne qualité nutritionnelle, ce qui implique une digestibilité élevée. Le pois est un bon candidat en raison de sa teneur élevée en protéines et de son profil en AA équilibré. Cette étude avait pour objectif de déterminer la digestibilité iléale réelle des AA et de l'azote (RID_{AA} et RID_N) d'un isolat de protéine de pois par rapport à la caséine de lait chez l'Homme. Leur qualité nutritionnelle a également été évaluée par le calcul du DIAAS et de l'UPPN.

Méthodes

Quinze volontaires adultes en bonne santé ont été intubés avec une sonde naso-iléale à triple lumière. Ils ont ingéré les repas test, qui consistaient en 9 portions successives de purée de pommes de terre contenant la protéine de pois ou la caséine, intrinsèquement marquée au ^{15}N. Un marqueur non absorbable, le PEG-4000, a été perfusé dans l'iléon pour estimer le débit du fluide intestinal. Des échantillons de digesta iléal, de plasma et d'urine ont été prélevés régulièrement sur une période de 8 heures après le repas. La teneur en PEG-4000 des digesta a été mesurée par une méthode turbidimétrique. Les teneurs en AA et N des digesta et des protéines test ont été mesurées par U-HPLC et EA. L'urée a été extraite des échantillons de plasma et d'urine. L'enrichissement en ^{15}N a été évalué dans les digesta, l'urée et les protéines test par EA-IRMS et dans les AA individuels par GC-C-IRMS.

Résultats

La RID_{AA} moyenne était de 93,6 ± 2,9% pour la protéine de pois et de 96,8 ± 1,0% pour la caséine, sans différence entre les sources (P = 0,22). La leucine, la valine, la lysine et la phénylalanine étaient significativement moins digestibles dans le pois que dans la caséine. La RID_N était de 92,0 ± 2,7% et de 94,0 ± 1,7% pour la protéine de pois et la caséine, respectivement, et n'était pas différente entre les groupes (P = 0,11). Le DIAAS était de 1,00 pour la protéine de pois et de 1,45 pour la caséine. L'UPPN était de 71,6 ± 6,2% pour la protéine de pois et de 71,2 ± 4,9% pour la caséine (P = 0,88).

Conclusion

Bien que certains AA soient moins digestibles dans la protéine de pois que dans la caséine, les indices de biodisponibilité RID et UPPN n'étaient pas différents entre les deux sources. Le DIAAS de 1 obtenu pour la protéine de pois a révélé sa capacité à répondre aux besoins en AA. Cette étude a démontré le potentiel de l'isolat de protéine de pois en tant que protéine de haute qualité nutritionnelle.

Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans

Authors and institutions

Florence M. Guillin[1,2], Claire Gaudichon[1], Laetitia Guérin-Deremaux[2], Catherine Lefranc-Millot[2], Gheorghe Airinei[1], Nadezda Khodorova[1], Robert Benamouzig[1], Pierre-Henri Pomport[3], Juliette Martin[4], Juliane Calvez[1]

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

[2] Roquette, 62080, Lestrem, France

[3] Ferme expérimentale AgroParisTech, route de la ferme, 78850, Thiverval-Grignon, France

[4] Unité expérimentale du domaine d'Epoisses, INRAE, U2E, 21110, Bretenière, France

Corresponding author

Juliane Calvez

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

Phone number: +33 1 44 08 86 77

juliane.calvez@agroparistech.fr

Abbreviations

AA: amino acid, AP: atom percent, APE: atom percent excess, Asx: asparagine + aspartate, DAA: dispensable amino acid, DIAAS: digestible indispensable amino acid score, DW: dry weight, EA: elementary analyzer, GC-C-IRMS: gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, Glx: glutamine + glutamate, IAA: indispensable amino acid, IRMS: isotopic ratio mass spectrometry, F: ileal flow rate, N: nitrogen, NPPU: net postprandial protein utilization, n.s.: non-significant, PEG: polyethylene glycol, RID: real ileal digestibility, SAA: sulfur amino acid, SD: standard deviation, TBW: total body water, U-HPLC: ultra-high performance liquid chromatography.

Keywords

Ileal digestibility, amino acid, pea protein, casein, human, stable isotopes

Abstract

Objective

It is necessary to propose plant alternatives to animal proteins that are of good nutritional quality, implying a high digestibility. Pea is a good candidate regarding its high protein content and its well-balanced amino acid (AA) profile. This study was aimed at assessing the real ileal AA and nitrogen (N) digestibility (RID_{AA} and RID_N) of pea protein isolate as compared to milk casein in humans and at evaluating their nutritional quality through the calculation of the digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and the determination of the net postprandial protein utilization (NPPU).

Methods

Fifteen healthy adult volunteers were equipped with a triple-lumen naso-ileal tube. They ingested the test meals, which consisted of 9 successive portions of mashed potatoes containing either pea protein or casein, intrinsically labelled with ^{15}N. A non-absorbable marker, PEG-4000, was perfused in the ileum to estimate the intestinal fluid flow rate. Ileal content, plasma and urine samples were collected regularly over an 8-h postprandial period. PEG-4000 content of the digesta was measured by a turbidimetric method. AA and N content of digesta and test proteins were measured using U-HPLC and EA. Urea was extracted from plasma and urine samples. ^{15}N enrichment was assessed in digesta, urea and test proteins using EA-IRMS and in individual AA using GC-C-IRMS.

Results

Mean RID_{AA} was 93.6 ± 2.9% for pea protein and 96.8 ± 1.0% for casein, with no difference between the sources (P = 0.22). Leucine, valine, lysine and phenylalanine were significantly less digestible in pea than in casein. RID_N was 92.0 ± 2.7% and 94.0 ± 1.7% for pea protein and casein, respectively, and were also not different (P = 0.11). The DIAAS was 1.00 for pea protein and 1.45 for casein. The NPPU was 71.6 ± 6.2% and 71.2 ± 4.9% for pea protein and casein, respectively (P = 0.88).

Conclusion

Although some AA are less digestible in pea protein than in casein, the indexes of bioavailability, RID and NPPU, were not different. The DIAAS of 1 obtained for pea protein revealed its ability to meet all AA requirements. This study demonstrated the potential of pea protein isolate as a high quality protein.

Introduction

Adequate protein intake is of major importance in the nutrition field, as protein is an indispensable nutrient with no structure exclusively dedicated to storage. For environmental purpose, it has been recommended to reduce the consumption of food of animal origin in favor of plant products in the western countries [1]. In particular, the legume family offers the possibility to reduce nitrogen inputs during cultivation. However, most of plant proteins are considered to be of poorer digestibility as compared to animal sources [2–6], which can be explained by the presence of antinutritional factors that interact with proteolytic enzymes [7–9]. Remarkably, products from legumes (soy, pea, lupin…) have displayed good digestibility in humans, pigs or rats [8,10–15], particularly when consumed in a purified form such as protein flour, concentrate or isolate [16,17]. Among them, pea protein offers a valuable option due to its high protein content (24% [18]) and its relatively balanced AA profile [19], despite the admitted deficiency in sulfur amino acids (SAA) of legumes.

For protein quality evaluation, the FAO recommends the use of the digestible indispensable amino acid score (DIAAS), based on the IAA composition of the protein and their individual ileal digestibilities [20]. It implies that digestibility should be assessed individually for each AA in the terminal ileum digesta instead of feces, to avoid metabolization of the residual dietary AA by the colonic microbiota [21]. Data of IAA digestibility in humans are limited because the measurement of ileal losses is challenging [22,23]. Naso-ileal intubation technique enables to collect the digestive content at the end of the small intestine [24]. When combined with ^{15}N-labelled proteins, it allows to differentiate the dietary and the endogenous fractions among the losses of AA and determine real ileal digestibility (RID) of AA.

Our preliminary study on rats revealed that pea protein was highly digestible (94.6% mean true cecal AA digestibility) and we obtained a DIAAS of 0.88 [25]. Casein is the main protein of milk, representing 77-78% of total milk proteins [26]. It is considered as a reference in terms of nutritional quality, with a digestibility ranging from 94 to 100%, depending on the studies [10,14,27,28].

The aim of the present study was to evaluate the RID of pea protein in humans in comparison to milk casein, using ^{15}N-labelling of dietary proteins and naso-ileal intubation technique. We calculated the DIAAS and assessed the net postprandial protein utilization (NPPU) as indicators of protein quality.

Methods

Test proteins and experimental meals

We compared two purified test proteins that were labelled with ^{15}N. Three micro-plots of yellow peas (*Pisum sativum*) were fertilized with two supplies of ^{15}N-labelled ammonium nitrate ($^{15}NH_4{}^{15}NO_3$) at stages 4/6 leaves and floral buds. The labelling protocol was carried out at Unité Expérimentale du Domaine d'Epoisses, INRAE (Bretenière, France). The seeds were harvested at maturity, air dried and ground to flour. The protein fraction was extracted under pH neutralization, heat-treated and freeze-dried. For casein, a lactating cow was fed ^{15}N-labelled ammonium sulfate $(^{15}NH_4)_2SO_4$) for 4 days, at the experimental farm of AgroParisTech (Thiverval-Grignon, France). Labelled-milk was collected at day 5, skimmed and pasteurized. The casein fraction was extracted under ultrafiltration followed by microfiltration, heat-treated and freeze-dried. The protein isolates were tested for microbiological contamination. Nitrogen (N) content was 12% and 12.5% for pea protein isolate and casein isolate respectively. ^{15}N enrichment was 0.72 atom percent (AP) for pea protein isolate and 1.78 AP for casein isolate. ^{15}N enrichments of individual AA in the protein isolates (**Figure 1**) were uniform among AAs and mean ^{15}N AA enrichment was 0.71 AP for pea protein isolate and 1.75 AP for casein. The AA composition of test proteins is given in **Figure 2**. The test meals were composed of mashed potatoes (Picard®) containing one of the test protein (pea protein or casein). The meal was split into 12 portions and given in 9 mini-meals, the first one being a loading dose of 4 portions. Each volunteer received a total of 45 g DW of potato and 4 g of N from the test protein (35 g of pea protein isolate or 31 g of casein isolate). They were given a glass of water hourly and were not allowed to ingest any other food during the 8 h of postprandial sampling period.

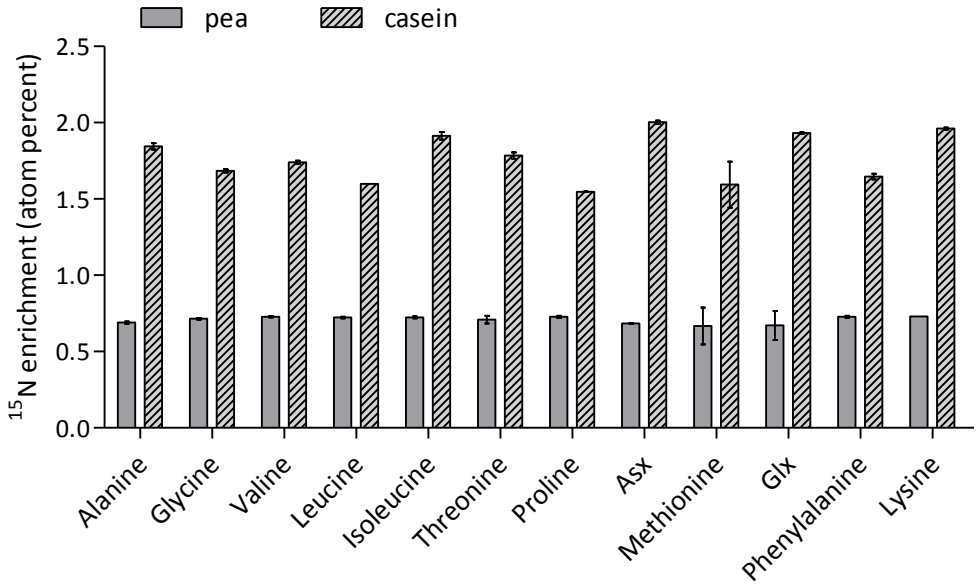

Figure 1. ^{15}N enrichment of amino acids in labelled protein isolates

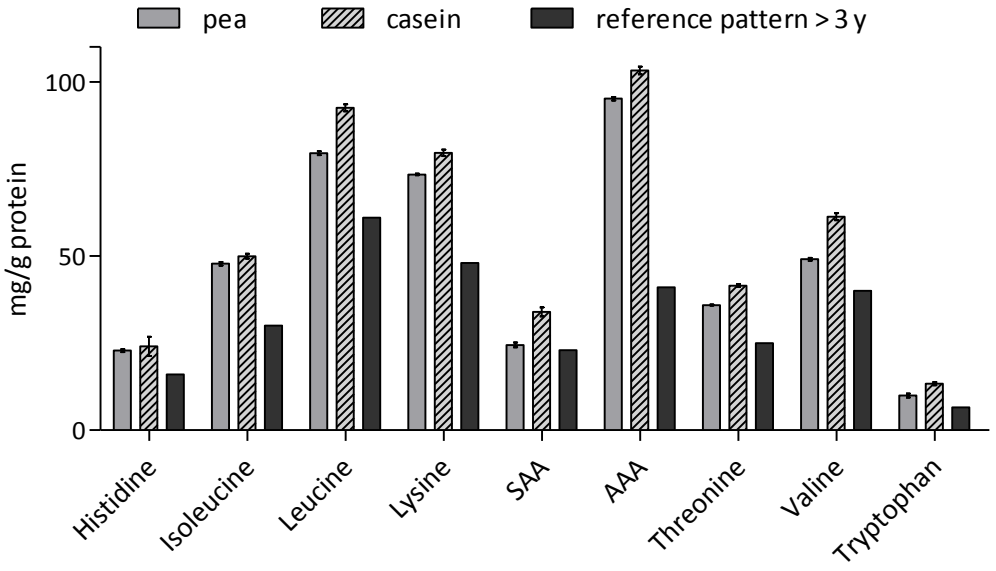

Figure 2. AA composition of test protein isolates. Values are means ± SD on 3 measurements. Protein content was calculated from N content using 6.25 conversion factor. The reference pattern was the older child, adolescent, adult profile defined in the 2013 FAO report [20].

Subjects

This study was approved by the Ethical Committee Sud-Est III and was registered at www.clinicaltrials.gov database (NCT04072770). The clinical trial was conducted in the Human Nutrition Research Center of Avicenne Hospital (APHP, Bobigny, France). After signing a written informed consent, 26 healthy volunteers with no history of gastrointestinal disorder or food allergy participated in the study. Several subjects did not complete the protocol or had to be excluded and the final sample size was n = 15 (age, 36 ± 8.3 years old; body mass index, 23.6 ± 2.4 kg/m^2, **Table 1**). The main causes of exclusion during the procedure were failure of migration of the tube through the pylorus, pain or vomiting, and insufficient migration in the small intestine. Two volunteers were removed afterwards because of unusable samples (**Figure 3**).

Table 1. Anthropometric data of the volunteers (n = 15)

	Pea protein	Casein	Total
n	8	7	15
Sex (F/M)	5/3	5/2	10/5
Age (years)	36.0 ± 9.8	36.0 ± 7.0	36.0 ± 8.3
BMI (kg/m^2)	23.5 ± 2.7	23.7 ± 2.2	23.6 ± 2.4
TBW (L)	33.9 ± 5.8	33.1 ± 7.2	33.5 ± 6.2

BMI: body mass index; TBW: total body water assessed by impedancemetry

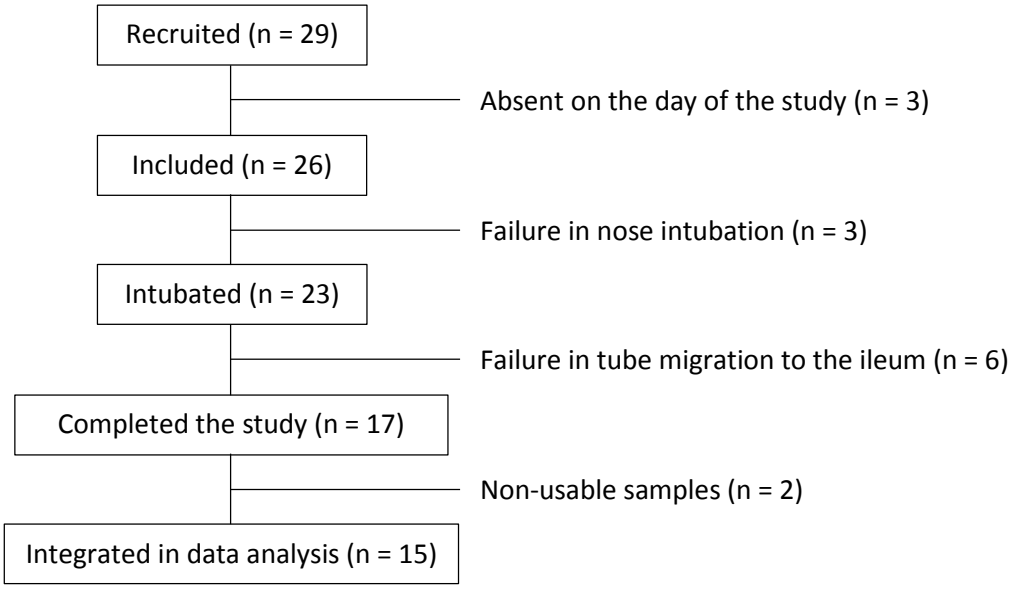

Figure 3. Participant flowchart, causes of failure and exclusion criteria

Experimental protocol

The volunteers were admitted in the hospital for 2 days (**Figure 4**), with a maximum of 2 volunteers at the same time. The morning of day 1, a triple-lumen tube (polyvinyl chloride tubing, total length 2.5 m) was placed into their stomach through their nose under local anesthesia and migrated along the digestive tract for 24 h with intestinal peristalsis. The progression was facilitated by inflating a terminal balloon through one of the three lumens once the tube had reached the small intestine. The passage of the tube through the pylorus was checked by radiography in the early afternoon of day 1. The volunteers ate a standard hospital meal after the radiography and had dinner at 20:00, before fasting overnight. At the beginning of day 2, a second radiography was performed to check the migration of the tube to the terminal ileum. Correct position of the tube was also confirmed by measuring the pH of the intestinal effluent, which was collected by aspiration with a syringe through the second lumen of the tube. Polyethylene glycol 4000 (PEG-4000; 20 g/L) was used as a non-absorbable marker to calculate the intestinal flow rate. It was integrated in a saline solution and perfused in the ileum at a rate of 1 mL/min through the third lumen, 20 cm above digesta collection. A catheter was placed into the forearm vein of the volunteers for blood sampling. The protocol was single-blinded, the volunteers receiving either pea protein or casein. The 9 test meals were given every 30 min for 4 h and were consumed in a limited amount of time (5 min). The ileal content was collected continuously from 30 min before the ingestion of the first test meal to the end of the procedure, 8 h later. The digesta were pooled every 30 min, sampled in jars with addition of protease inhibitor (diisopropylfluorophosphates), frozen at -20 °C, and freeze-dried until analysis. Blood samples were taken every 30 min for the first 4 h, then hourly. Urine was recovered every 2 h during the whole procedure, weighed and stored at -

20°C. A fraction was kept at 4°C with thymol oil and liquid Vaseline and processed the day after for urea extraction.

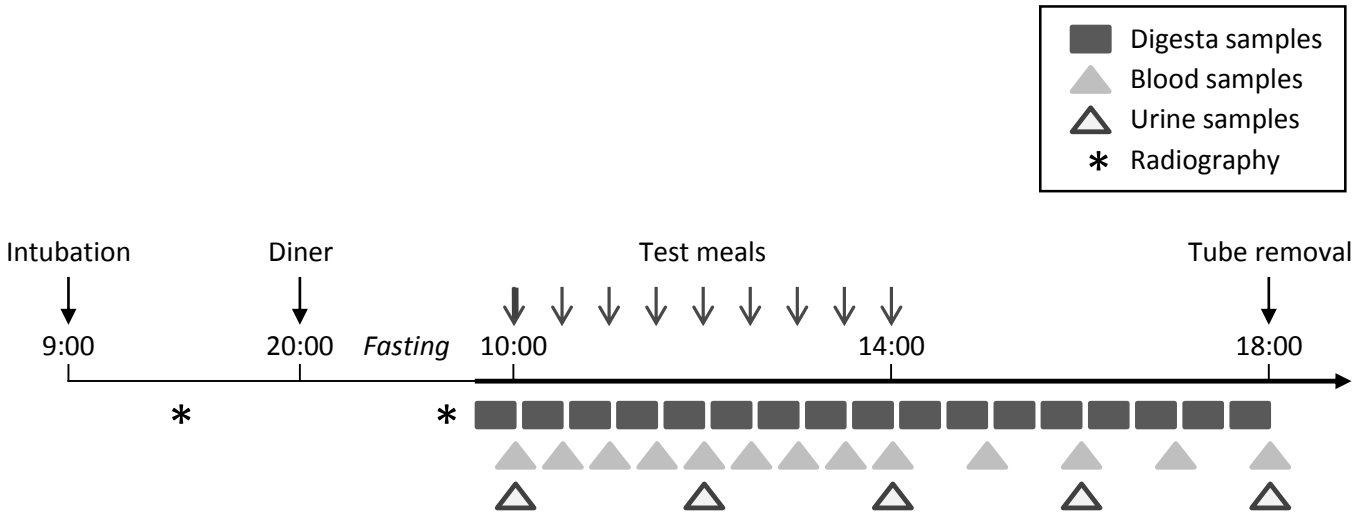

Figure 4. Experimental design of the study

Analytical procedure

The PEG-4000 content of the digesta was measured by a turbidimetric method [29] to determine the ileal flow rate.

Nitrogen content of digesta and test proteins (pea and casein) was measured with an elementary analyzer (EA) based on the Dumas method (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France). The analyzer was coupled with an isotopic ratio mass spectrometry (IRMS) (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) to measure ^{15}N enrichment in digesta and test proteins. Atropine (Thermo Electron, Milano, Italy) was used as elemental standard and L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) was used as isotopic standard.

Nitrogen digestibility and nitrogen utilization were evaluated using ^{15}N recovery in digesta, urea pools (plasma and urine), and test proteins. Urea content in plasma and urine was assessed with Urease-Berthelot method (Urea assay, Randox, Crumlin, UK). Urine was separated from ammonia and treated by urease (Urease from Jack Bean type III, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Urinary urea was isolated on a sodium form of cation exchange resin (Dowex® 50WX8 sodium form 100-200 mesh, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Urea fraction of plasma was treated with urease and separated from amino acid fraction by the use of sodium form cation exchange resin like for urinary urea. The resin was eluted by $KHSO_4$ (2.5 M) and the supernatant was assayed for ^{15}N enrichment of plasmatic and urinary urea using EA-IRMS.

Real ileal digestibility of AA was assessed from AA content and ^{15}N enrichment of individual AA in digesta and test proteins. For AA content measurements (other than tryptophan), 10 mg of digesta or protein were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. Norvaline was added prior to hydrolysis as an internal standard. For the analysis of sulfur AAs (SAA) in test proteins (pea and casein), performic acid oxidation was carried out before hydrolysis to convert methionine and cysteine to the acid-stable derivatives, methionine sulfone and cysteic acid respectively [30]. Tryptophan content was determined in protein isolates (pea and casein). A base hydrolysis (barium hydroxide 2N) was carried out on 15 mg of samples for 20 h at 110°C, with 5-methyl-tryptophan as an internal standard. Calibration standards were composed of an AA mixture (Waters), with addition of specific AAs (norvaline, methionine sulfone, cysteic acid, tryptophan, 5-methyl-tryptophan). Hydrolysates and standards were derivatized using the AccQTag Ultra Derivatization Kit (Waters) according to the manufacturer's protocol. The AA quantification was performed on an Acquity HClass ultra-high performance liquid chromatography (U-HPLC) system with a photodiode array detector (PDA detector; Waters). The AA were separated with an AccQ-Tag AA C18 column (2.1 × 100 mm; 1.7 µm bead size; Waters) and quantified as mmol/g of dry matter.

For AA isotopic enrichments, 90 mg of digesta and protein samples were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. AAs were isolated using a hydrogen form resin (Dowex® 50WX8 hydrogen form 100-200 mesh, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and derivatized with ethyl chloroformate [31]. ^{15}N enrichment of isolated AAs was analyzed by gas chromatography (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) via the GC5 Isoprime interface. The combustion furnace temperature was 950°C. The GC column (RXI-17, 30 m long, 0.25 µm i.d., 0.5 µm film thickness; Restek) temperature program started at 150 °C, increased by 4°C per min up to 200°C and by 25°C per min up to 270 °C, the final temperature being maintained for 10 min. The inlet temperature was set at 270°C.

Calculations

The ileal flow rate (F) was evaluated each 30 min as follows:

$$F\ (\text{mL/30min}) = \frac{[\text{PEG}]_{\text{solution}}}{[\text{PEG}]_{\text{digesta}}} \times \text{perfusion flow rate} \times 30$$

Where $[\text{PEG}]_{\text{solution}}$ and $[\text{PEG}]_{\text{digesta}}$ are the concentration of PEG-4000 in the perfused solution and in the digestive contents, respectively. The flow rate of the PEG perfusion was 1 mL/min.

The total nitrogen flow rate ($N_{\text{tot ileum}}$) in the ileum was assessed for each period:

$$N_{\text{tot ileum}}\ (\text{mmol/30min}) = \frac{N \times DM \times F}{14 \times 10}$$

Where N was the percentage of nitrogen measured in the ileal sample, DM was the dry matter of the ileal sample (g/100g), F was the ileal flow rate (mL/30min), and 14 was the molar mass of nitrogen (g/mol).

The dietary nitrogen flow rate ($N_{diet\ ileum}$) referred to N from the ingested test protein (pea or casein) remaining in the ileum after absorption:

$$N_{diet\ ileum}\ (mmol/30min) = N_{tot\ ileum} \times \frac{APE_{ileum}}{APE_{meal}}$$

Where $N_{tot\ ileum}$ was the total nitrogen flow (mmol/30min), and APE (atom percent excess) the amount of ^{15}N enrichment gained in the digesta compared to the basal value (in AP). Basal enrichment was defined for each volunteer independently as the enrichment in the t = 0 digesta sample.
The endogenous nitrogen ($N_{endo\ ileum}$, mmol/30min) was the difference between $N_{tot\ ileum}$ and $_{Ndiet\ ileum}$.

Real ileal digestibility of nitrogen (RID_N) was calculated as follows:

$$RID_N\ (\%\ N_{ingested}) = \frac{N_{ingested} - \Sigma N_{diet\ ileum}}{N_{ingested}} \times 100$$

Where $N_{ingested}$ was the amount of N ingested from the test meals and $\Sigma N_{diet\ ileum}$ was the cumulative dietary nitrogen recovered in the ileum over the 8 h of protocol (mmol).

Real ileal digestibility was also determined for each AA (RID_{AA}). The quantity of dietary AA in digesta ($AA_{i\ diet}$) was calculated for each period of time (t):

$$AA_{i\ diet}\ (t)\ (mmol) = [AA_i]_{ileum}\ (t) \times DM\ (t) \times F(t) \times \frac{APE_{i\ ileum}\ (t)}{APE_{meal}}$$

Where $[AA_i]_{ileum}$ was the quantity of AA_i in the digesta at t period (mmol/g), DM was the dry matter of digesta (g/100mL), F was the ileal flow rate (mL/30min) and APE the amount of ^{15}N enrichment gained in AA_i in the digesta as compared to the basal value (in AP) at t period. Basal enrichment in AA_i was defined for each volunteer independently as AA_i enrichment in the t = 0 digesta sample.

Real ileal digestibility of AA (RID_{AA}) was calculated for each AA as follows:

$$RID_{AAi}\ (\%\ AA_{i\ ingested}) = 1 - \frac{\Sigma AA_{i\ diet}}{AA_{i\ ingested}} \times 100$$

Where $\Sigma AA_{i\ diet}$ was the sum of dietary AA_i over 8 h (mmol) and $AA_{i\ ingested}$ was the amount of $AA_{i\ ingested}$ by the volunteer (mmol). Average AA digestibility was calculated from the mean of AA digestibilities weighted by the proportion of each AA in the protein. RID was assessed for 12 AA and could not be calculated for histidine, tryptophan, cysteine, serine and tyrosine. The missing AAs are explained by their low recovery or absence in the digesta hydrolysates produced for GCC-IRMS analyses or a co-elution with other components in the chromatography column.

The DIAAS was calculated as prescribed by the FAO [20]: DIAAS = lowest IAA ratio

$$IAA_i \text{ ratio} = \frac{\text{mg digestible } IAA_i \text{ in 1g of the test protein}}{\text{mg } IAA_i \text{ in 1g of the reference protein}}$$

Where digestible IAA_i content (g/kg protein) = IAA_i content (g/kg protein) × RID_{AAi} (%). The reference profile used for DIAAS calculation was the requirement pattern of the older child, adolescent, and adult defined in the 2013 FAO report [20]. The nitrogen-to-protein conversion factor used was 6.25. IAA ratio for His and Trp was calculated using the mean digestibility of all AA.

The dietary nitrogen incorporation into the different body nitrogen pools (digesta, body urea, urinary urea) was expressed as a percentage of the ingested amount and calculated using the following equation [32]:

$$N_{diet}\ (t)\ (\%\text{ of ingested nitrogen/30min}) = N_{tot}\ (t) \times \frac{APE\ (t)}{APE_{meal} \times N_{ingested}} \times 100$$

The Net Postprandial Protein Utilization (NPPU) was the amount of N retained in the body after 8 h and was calculated as follows:

$$NPPU\ (\%\text{ of } N_{ingested}) = \frac{N_{ingested} - (\Sigma N_{diet\ ileum} + \Sigma N_{diet\ urinary\ urea} + N_{diet\ body\ urea})}{N_{ingested}} \times 100$$

Where $N_{diet\ urinary\ urea}$ was nitrogen content in urinary urea, obtained by multiplying the volume of urine by urinary urea concentration. $N_{diet\ body\ urea}$ was the remaining dietary N in the plasma urea, defined as plasma urea nitrogen concentration at t = 8 h multiplied by total body water (TBL), and corrected by the water content of blood (92%). TBL was measured by bio-impedancemetry (Nutriguard-M®, Data Input, Germany).

Statistical analysis

The values are expressed as mean ± standard deviation (SD). Difference between pea protein and casein groups was evaluated with a two-sided Student t test. Digestive and N flows were analyzed using a mixed model with the diet group as a fixed effect and time as a repeated effect. Overall significant difference was observed for $P < 0.05$.

Results

N flows and RID

The ileal flow rate of digesta was in average 25.9 ± 9.7 mL/30min for pea protein group and 29.4 ± 7.6 mL/30min for casein group (**Figure 5.A**). In total, 439.5 and 500.0 mL of digesta flowed through the terminal ileum over the 8 h of protocol in pea protein and casein group, respectively. The endogenous N flow through the terminal ileum over the 8 h of protocol was 48.5 ± 9.4 and 36.1 ± 12.7 mmol in pea

protein and casein group, respectively (**Figure 5.B**). The dietary N flow was in average 1.7 ± 1.1 mmol/30min and 1.4 ± 0.9 mmol/30min for pea protein and casein group, respectively (**Figure 5.C**). No significant difference of flow (ileal, endogenous or dietary N) was found between the two groups, but we observed a trend of a higher dietary N flow in pea protein group (P = 0.06). The ileal and N flows varied over time (time effect P = 0.02, P = 0.006 and P = 0.008 for ileal, endogenous N and dietary N respectively), as they increased with meal ingestion and decreased at t = 6 h, following the ingestion of the last meal (t = 4 h). This time effect was particularly visible for dietary N flow. The dietary N appeared in the ileum 1 h and 1.5 h after the ingestion of the first meal in pea protein and casein groups, respectively. It increased for 5 h in pea protein group and for 6 h in casein group, before decreasing until the end of the protocol. During the protocol, the volunteers ingested in average 292 and 280 mmol of N in pea protein and casein group, respectively. Mean cumulated dietary N recovered in the ileum was 23.4 ± 7.9 mmol in pea protein group and 16.8 ± 4.9 mmol in casein group (P = 0.08). Consequently, RID_N of pea protein was 92.0 ± 2.7% and RID_N of casein was 94.0 ± 1.7% with no significant difference between the protein sources (P = 0.11).

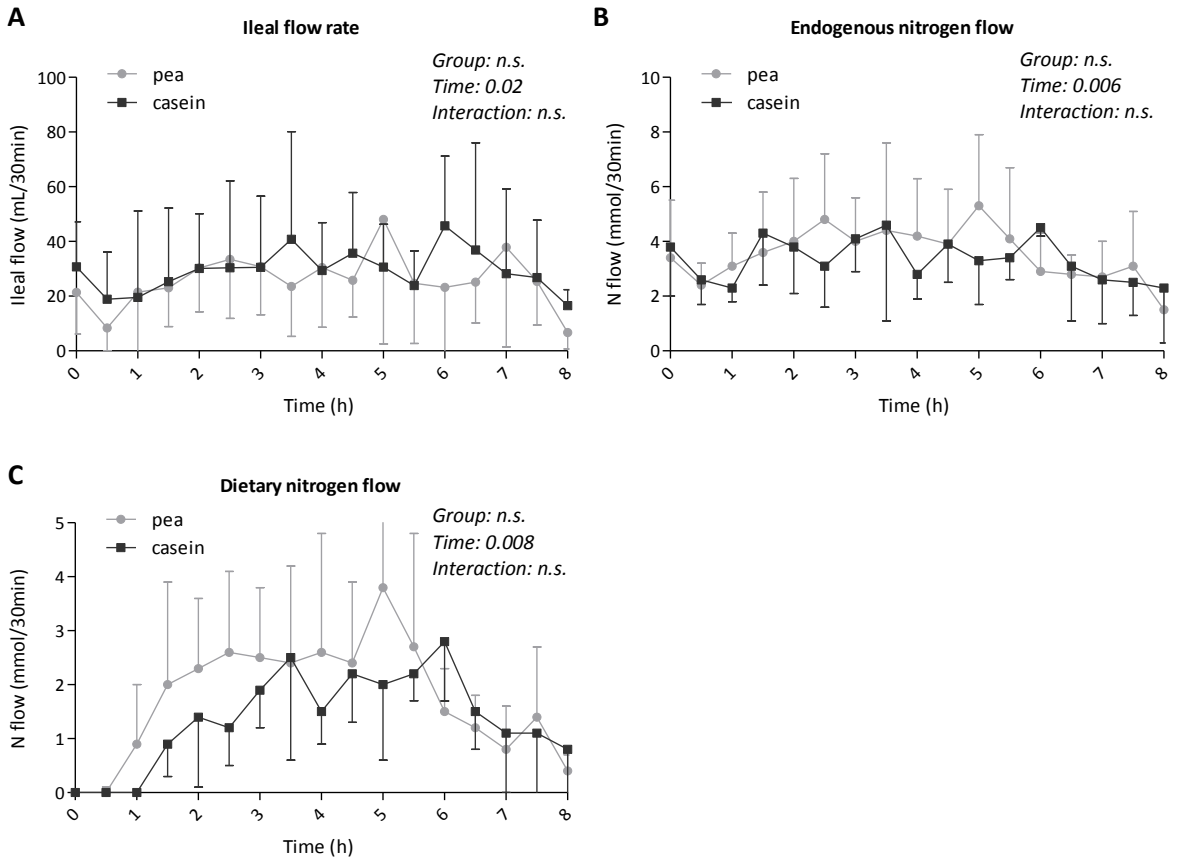

Figure 5. A. Ileal flow rate of digesta, excluding perfusion of PEG-4000 solution. **B.** Endogenous nitrogen flow in the ileum. **C.** Dietary nitrogen flow in the ileum. Values are means ± SD, n = 8 in pea protein group, n = 7 in casein group. N: nitrogen, NS: non-significant

Ileal AA digestibility and DIAAS

RID was variable depending on the AA. For pea protein, RID_{AA} ranged from 90.2 ± 3.7% for glycine to 95.8 ± 2.0% for Glx. For casein, RID_{AA} ranged from 94.4 ± 2.2% for isoleucine to 98.6 ± 0.4% for leucine (**Table 2**). RID_{AA} of leucine, lysine, phenylalanine, valine, Asx, glycine and proline were significantly higher for casein compared to pea protein. However, the difference between mean RID_{AA} of pea protein (93.6 ± 2.9%) and casein (96.8 ± 1.0%) did not reach significance (P = 0.22).

IAA ratios were all higher for casein as compared to pea protein (**Table 3**). The DIAAS, defined as the lowest IAA ratio, was 1.00 for pea protein and 1.45 for casein and both corresponded to methionine ratios.

Table 2. Real ileal digestibility (RID, %) of AA and DIAAS obtained for pea protein compared to casein

	Pea protein	Casein	P
N	92.0 ± 2.7	94.0 ± 1.7	n.s.
Mean IAA	93.4 ± 3.6	97.0 ± 2.1	0.02
Isoleucine	92.9 ± 3.8	94.4 ± 2.2	n.s.
Leucine	94.4 ± 2.8	98.6 ± 0.4	0.002
Lysine	93.9 ± 2.6	98.0 ± 0.5	0.001
Methionine	93.9 ± 5.2	98.3 ± 0.9	n.s.
Phenylalanine	94.6 ± 2.8	99.2 ± 0.3	< 0.001
Threonine	91.8 ± 4.0	94.6 ± 1.3	n.s.
Valine	92.5 ± 3.8	96.1 ± 1.3	0.03
Mean DAA	92.9 ± 3.5	96.3 ± 1.8	0.01
Alanine	92.7 ± 3.9	96.1 ± 1.3	n.s.
Asx	93.0 ± 2.9	96.4 ± 1.2	0.01
Glx	95.8 ± 2.0	95.9 ± 1.8	n.s.
Glycine	90.2 ± 3.7	95.2 ± 1.4	0.006
Proline	92.3 ± 3.2	97.7 ± 0.5	< 0.001
Mean all AA	93.6 ± 2.9	96.8 ± 1.0	n.s.

Asx: asparagine + aspartate, IAA: indispensable amino acid, DAA: dispensable amino acid, Glx: glutamine + glutamate, n.s.: non-significant

Values are means ± SD, n = 8 in pea protein group, n = 7 in casein group. Histidine, tryptophane, cysteine, serine and tyrosine digestibilities could not be evaluated. Mean digestibility of all AA was weighted by the proportion of each AA in the protein isolates.

Table 3. IAA ratios and DIAAS of pea protein compared to casein

	Pea protein	Casein	P
Histidine	1.40	1.53	-
Isoleucine	1.64 ± 0.07	1.75 ± 0.04	0.004
Leucine	1.30 ± 0.04	1.57 ± 0.01	< 0.001
Lysine	1.59 ± 0.04	1.81 ± 0.01	< 0.001
Methionine	1.00 ± 0.06	1.45 ± 0.01	< 0.001
Phenylalanine	2.23 ± 0.07	2.54 ± 0.04	< 0.001
Threonine	1.47 ± 0.06	1.75 ± 0.02	< 0.001
Valine	1.19 ± 0.05	1.55 ± 0.02	< 0.001
Tryptophan	1.41	1.95	-
DIAAS	1.00 ± 0.06	1.45 ± 0.01	< 0.001

DIAAS : digestible indispensable amino acid score, IAA : indispensable amino acid

RID used for His and Trp ratios was mean RID of all AA, and thus P-values could not be calculated. Cystein and tyrosine were not included.

Urea pools and NPPU

The appearance of N into body urea started immediately after the ingestion of the first meal (**Figure 6.A**) and increased until the last ingestion at t = 4 h, in both groups. No difference was observed between proteins (P = 0.38). The transfer to dietary N into urinary urea also started after the ingestion of the first meal (**Figure 6.B**) and increased until the end of the protocol (t = 8 h), in both groups. No difference was observed between proteins (P = 0.35).

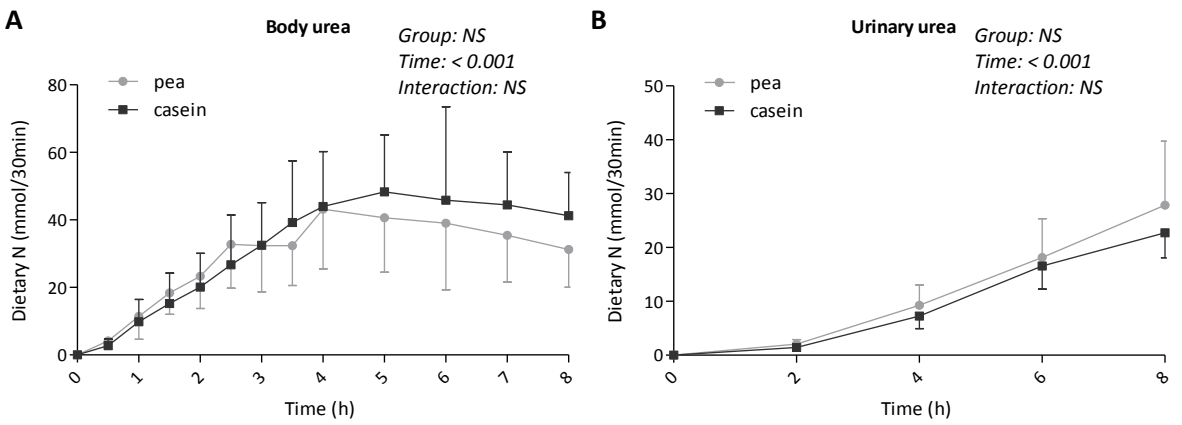

Figure 6. A. Incorporation of dietary nitrogen into body urea. **B.** Incorporation of dietary nitrogen into urinary urea. Values are means ± SD, n = 8 in pea protein group, n = 7 in casein group. N: nitrogen, NS: non-significant

The cumulative amount of dietary nitrogen excreted in urine was not different between pea protein and casein groups (P = 0.30, **Table 4**). The residual dietary nitrogen in body urea at t = 8 h was not different either between groups (P = 0.13). The NPPU was 71.6 ± 6.2% for pea protein and 71.2 ± 4.9% for casein (P = 0.88).

Table 4. NPPU of pea protein compared to casein

	Pea protein	Casein	P
$\Sigma N_{diet\ ileum}$ (mmol)	23.4 ± 7.9	16.8 ± 4.9	0.08
$\Sigma N_{diet\ urinary\ urea}$ (mmol)	27.9 ± 11.9	22.7 ± 4.6	0.30
$N_{diet\ body\ urea}$ (mmol)	31.3 ± 11.2	41.2 ± 12.8	0.13
NPPU (%)	71.6 ± 6.2	71.2 ± 4.9	0.88

N: nitrogen, NPPU: Net postprandial protein utilization

Values are means ± SD, n = 8 in pea protein group, n = 7 in casein group.

$N_{diet\ body\ urea}$ was the remaining dietary N in the plasma urea at t = 8 h.

Discussion

This study was aimed at evaluating the nutritional quality of a pea protein isolate as compared to casein through the direct measurement of ileal digestibility and bioavailability of AA in Humans.

The use of naso-ileal intubation allowed to determine the N flow in the terminal part of the small intestine after the ingestion of test meals. The protein source had no effect on the endogenous N flow in our study, with no difference in N flow rate following either pea (48.5 ± 9.4 mmol N) or casein ingestion (36.1 ± 12.7 mmol N). The values of endogenous losses observed in our study were comparable to values determined after pea protein ingestion in Mariotti *et al*. study on pea protein (51.4 ± 15.2 mmol N collected over the 8 hours of protocol [33], vs 48.5 ± 9.4 mmol N in our study). Comparable results of endogenous ileal N losses were obtained by Gaudichon *et al.* under similar conditions, following the ingestion of milk or soy protein isolates stirred into water (39.0 mmol N over the 8 hours of protocol for milk, 51.2 mmol N for soy [34]). However, in Gaudichon *et al*. study, the N endogenous losses were significantly higher for soy protein as compared to milk protein, in accordance with the literature that described an increase in endogenous N secretions with legumes and plant proteins in general, notably explained by the presence of antinutritional factors [35–37]. Here, the difference between protein groups was not significant, probably due to the interindividual variability and the low antinutritional factor concentration in the pea protein. The dietary N kinetics induced by

the ingestion either of pea protein or casein were not significantly different between the two sources, but the decrease seemed to be delayed by 1 h in casein group. It would be consistent with the characterization of casein as a "slow protein", based on its digestion rate and amino acid absorption kinetics [38,39]. The slow digestion of casein is explained by its precipitation under the acidic environment of stomach [40]. No significant difference was observed between the dietary N flows in the ileum after pea and casein ingestion, but a trend to higher dietary N losses occurred in pea protein group. The ileal digestibility of N was not significantly different between the two sources, reaching 92.0% and 94.0% for pea protein and casein, respectively. The values reported for pea in the present study are higher than previous results obtained in similar conditions. According to Gausserès *et al.* and Mariotti *et al.*, ileal N digestibility was respectively 89.4 ± 1.1% for pea flour [15] and 89.9 ± 4.0% [33] for pea protein isolate. In contrast, for milk casein, we obtained a RID_N similar to that obtained by Deglaire *et al*., which was 94.1% [27]. However, in a study carried out in ileostomates using unlabeled proteins, N ileal digestibility of milk proteins was higher but exceeded 100%, and thus can be considered as non-physiological [14]. In comparison to other legumes, values of RID obtained in this study for pea protein isolate were comparable to the RID obtained for soy isolate and lupin flour (91.5 ± 2.0% [41] and 91.0 ± 3.0% [13] respectively), determined in comparable studies.

The mean AA ileal digestibilities (RID_{AA}) were 93.6 ± 2.9% and 96.8 ± 1.0% for pea protein and casein, respectively. Those values were high, demonstrating the potential of pea protein to be considered as a high-quality protein. As a comparison, mean RID_{AA} determined in studies performed on human subjects using naso-ileal intubation were similar for soy protein isolate (93.8 ± 3.0% [34]) and much lower for zein (corn protein, 63.0 ± 4.6% [42]). The difference we obtained between pea protein and casein was not significant for mean RID_{AA}, whereas RID of casein was higher for many individual AAs, including mean IAA. As the mean was weighted by the proportion of each AA in the proteins, this result is explained by the high contribution of Glx, for which no difference of digestibility was observed between groups. For both proteins, average RID_{AA} was higher than RID_N, the difference being more pronounced for casein (+2.9% vs +1.8% for pea protein). This could be explained by the fraction of non-protein nitrogen contained in the protein isolates that remained in the digestive tract after digestion, leading to an underestimation of RID_N. The non-protein nitrogen was calculated theoretically by the difference between the AA composition of proteins measured by U-HPLC and the N content of proteins measured by EA and represented 0.1% of total N for pea protein and 3.3% of total N for casein (data not shown). According to the literature, the non-protein nitrogen content of milk represents in average 6% of the total N [43]. Lower values of 4.5% of total N can also be found [44]. It is mostly composed of urea, and this amount is variable depending on the diet of the cows, and interindividual factors [45]. However, the non-protein nitrogen fraction of purified proteins is supposed to be negligible, as the

amount we calculated for pea protein. The native form of the casein isolate (micellar casein) used in our study could maybe explain this higher content compared to pea isolate. It may thereby explain the greater difference between RID_{AA} and RID_N in casein group. Furthermore, determination of RID_{AA} requires more analytical steps than RID_N. Indeed, several steps of sample preparation and 2 different analyses (hydrolysis of digesta samples, extraction and derivatization before ^{15}N enrichment measurement in individual AA by GC-C-IRMS and hydrolysis of digesta samples, derivatization before AA content measurement by UHPLC) are needed to obtain RID_{AA}. In contrast, RID_N relies only on the measurement of N and ^{15}N enrichment by EA-IRMS in the same sample without preparation. When RID_N is calculated theoretically from RID_{AA} and the AA composition of proteins, values of 93.4% and 96.8% are obtained for pea protein and casein, respectively, which are also higher than the experimental values of RID_N (92.0% and 94.0%).

Measurement of RID_{AA} and the AA composition of proteins allowed to calculate the DIAAS, which was higher than 1 for both proteins (1.00 and 1.45 for pea protein and casein, respectively). This result highlights the adequacy of pea protein with the human AA requirements and thus its relevance to provide enough IAA to ensure protein synthesis. This value of 1 was higher than the DIAAS of our previous animal study (0.88), which was explained by the lower SAA digestibility (84.2%) obtained in rats [(25)]. In other animal studies, the DIAAS of pea protein concentrate was 0.82 in rats [(10)] and 0.73 in pigs [(4)].

The higher IAA ratios for casein were explained by the more balanced IAA composition of casein. The lowest IAA ratio was obtained for methionine for both proteins. The limiting content of SAA in legumes is well-known [(2)]. Even though pea protein meets the IAA requirements set for individuals aged 3+ [(20)], methionine is the IAA that carries the highest risk of deficiency in this source. However, the DIAAS was calculated using 6.25 as the protein-to-nitrogen conversion factor. Even if 6.25 is still considered as the standard value, it is based on the assumption that proteins contain 16% of N, which is not accurate for all sources especially for plant proteins. As the conversion factor might have a strong impact on the DIAAS values [(46)], we also calculated the DIAAS using specific factors, i.e. 6.15 for casein and 5.4 for pea protein [(47,48)]. The DIAAS we obtained with the specific conversion factors were higher, reaching 1.16 and 1.48 for pea protein and casein, respectively (data not shown).

The kinetics of dietary N incorporation into body and urinary urea were similar between groups, demonstrating the effectiveness of utilization of pea protein after absorption. Over the 8 h of the protocol, the incorporation of dietary N into body urea was 10.7% and 14.7% of ingested N for pea protein and casein, respectively. The dietary N incorporation into urinary urea was 9.6% and 8.1% of ingested N for pea protein and casein, respectively. Those results were consistent with those described

in similar studies. For milk casein, values of 12.31 ± 1.95% and 8.76 ± 1.38% of ingested N were reported for body urea and urinary urea, respectively [28]. The NPPU obtained for pea protein (71.6 ± 6.2%) was not significantly different from that of casein (71.2 ± 4.9%), which suggests that the N utilization following the ingestion of pea protein and casein was not different. The NPPU of pea protein was similar to the one found by Mariotti et al. after ingestion of pea protein by naso-ileal intubated volunteers (70.9 ± 6.0 [33]). NPPU results described in the literature for casein in human studies are 78% [49] and 71% [50], which are also in the same range as the values of this study.

The naso-ileal intubation technique has been used in several studies for AA digestibility assessment [27,34,42]. It allows an almost complete collection of ileal digestive content and a high recovery rate of the non-absorbable marker (PEG-4000 here) [27]. A limitation of our study is the delay in absorption kinetics induced by our ingestion pattern. Indeed, the ingestion of repeated meals might have disrupted the total quantitative collection of digestive N and AA losses. The results of N flows showed that a small amount of dietary N was still remaining in the terminal ileum after 8 h protocol, which might have induced overestimated values of digestibility and NPPU. Dangin *et al*. evaluated the impact of repeated meals compared to one single meal of identical AA composition in humans, in the case of whey protein ingestion. They concluded that the ingestion of repeated meals may reduce postprandial AA oxidation and impact postprandial protein deposition [49].

The present study highlighted the fact that the digestive and metabolic bioavailability of pea protein is high, allowing to meet the IAA requirement as reflected by the DIAAS of 1. It emphasized the potential of pea to be consumed as a source of dietary protein, as it seems to be one of the rare plant proteins with no limiting amino acids and of high digestibility.

Acknowledgments

We thank Marie-Claude Amard, Bruna Rodriguez, and Romain Tessier from UMR PNCA, as well as our interns Marie Jozwiak, Grégoire Soghomonian and Maximilien Etheve for their contribution to the clinical trial.

Financial support

The project was funded by Roquette.

Conflict of interest

C.G., N.K., G.A., R.B. and J.C. declare that they have no conflict of interest. F.G., L.G.D. and C.L.M. are employed by Roquette.

Authorship

The authors' responsibilities were as follows: C.G., J.C., L.G.D., C.L.M. and R.B. contributed to the conception and design of the study; F.G., J.C., G.A. and N.K. conducted the research; P.H.P. and J.M. carried out the labelling of proteins; F.G. and J.C. analyzed the data; F.G. wrote the original draft of the paper; J.C., C.G., L.G.D., and C.L.M. reviewed and edited the manuscript; C.G. administered the project; and all authors read and approved the final manuscript.

References

(1) Willett W, Rockström J, Loken B, et al. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. The Lancet 2019;393(10170):447–92.

(2) Mariotti F. Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality [Internet]. In: Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention. Elsevier; 2017 [cited 2020 Aug 7]. page 621–42.Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128039687000356

(3) Bos C, Airinei G, Mariotti F, et al. The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. J Nutr 2007;137(3):594–600.

(4) 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). Br J Nutr 2017;117(4):490–9.

(5) Nosworthy MG, Neufeld J, Frohlich P, et al. Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses. Food Sci Nutr 2017;5(4):896–903.

(6) Gilani GS, Peace RW, Botting HG, et al. Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. Plant Foods Hum Nutr 1989;39(1):23–32.

(7) 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(S2):S315–32.

(8) Grala W, Verstegen MWA, Jansman AJM, et al. Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soyabean products, peas or rapeseed hulls. Anim Feed Sci Technol 1999;80(3–4):231–45.

(9) Friedman M, Brandon DL. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. J Agric Food Chem 2001;49(3):1069–86.

(10) Rutherfurd, S M, Fanning, A C, Miller, B J, et al. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. J Nutr 2015;145(2):372–9.

(11) Boutry C, Fouillet H, Mariotti F, et al. Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. Nutr Metab 2011;8(1):52.

(12) Katz DL, Doughty KN, Geagan K, et al. Perspective: The public health case for modernizing the definition of protein quality. Adv Nutr 2019;10(5):755–764.

(13) Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, et al. 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 15N-labelled proteins. Br J Nutr 2002;87(4):315–23.

(14) Moughan PJ, Butts CA, van Wijk H, et al. An acute ileal amino acid digestibility assay is a valid procedure for use in human ileostomates. J Nutr 2005;135(3):404–9.

(15) Nicolas Gausserès, Sylvain Mahé, Robert Benamouzig, et al. [15N]-Labeled Pea Flour Protein Nitrogen Exhibits Good Ileal Digestibility and Postprandial Retention in Humans. Am Soc Nutr Sci 1997;22:3166–97.

(16) 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(S2):S183–211.

(17) Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, Weltgesundheitsorganisation, FAO, et al., 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.

(18) Lefranc-Millot C, Teichman-Dubois V. Protein from vegetable sources: a focus on pea protein. Nov Proteins Food Pharm Agric John Wiley Sons 2018;197–216.

(19) 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(1):107–110.

(20) Report of an FAO expert consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

(21) Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. Pharmacol Res 2013;68(1):95–107.

(22) Gaudichon C, Calvez J. Determinants of amino acid bioavailability from ingested protein in relation to gut health. 2020;24(1):7.

(23) Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. Br J Nutr 2012;108(S2):S238–46.

(24) Mahe S, Huneau JF, Marteau P, et al. Gastroileal nitrogen and electrolyte movements after bovine milk ingestion in humans. Am J Clin Nutr 1992;56(2):410–416.

(25) Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, et al. Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine. Br J Nutr 2020;1–9.

(26) Fox PF, McSweeney PLH, editors. Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A / Part B [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2003 [cited 2021 Jan 28]. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8602-3

(27) Deglaire A, Bos C, Tomé D, et al. Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. Br J Nutr 2009;102(12):1752–9.

(28) Magali Lacroix, Cécile Bos, Joëlle Léonil, 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.

(29) Hyden S. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. K Lantbrukshogskolans Ann 1956;22:139–45.

(30) Rutherfurd SM, Gilani GS. Amino Acid Analysis. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, et al., editors. Current Protocols in Protein Science. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2009. page 11.9.1-11.9.37.

(31) Fromentin C, Sanders P, Nau F, et al. A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with 15N and 13C. Rapid Commun Mass Spectrom 2012;26(1):43–8.

(32) Bos C, Juillet B, Fouillet H, et al. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. Am J Clin Nutr 2005;81(1):87–94.

(33) Mariotti F, Pueyo ME, Tome D, et al. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. 2001;131:1706–1713.

(34) Gaudichon C, Bos C, Morens C, et al. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. Gastroenterology 2002;123(1):50–9.

(35) Moughan PJ, Rutherfurd SM. Gut luminal endogenous protein: Implications for the determination of ileal amino acid digestibility in humans. Br J Nutr 2012;108(S2):S258–63.

(36) Ansia I, Stein HH, Vermeire DA, et al. Ileal digestibility and endogenous protein losses of milk replacers based on whey proteins alone or with an enzyme-treated soybean meal in young dairy calves. J Dairy Sci 2020;103(5):4390–407.

(37) Moughan PJ. Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. Nutr Res Rev 2003;16(2):127–41.

(38) Churchward-Venne TA, Snijders T, Linkens AM, et al. Ingestion of Casein in a Milk Matrix Modulates Dietary Protein Digestion and Absorption Kinetics but Does Not Modulate Postprandial Muscle Protein Synthesis in Older Men. J Nutr 2015;145(7):1438–45.

(39) Boirie Y, Dangin M, Gachon P, et al. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. Proc Natl Acad Sci 1997;94(26):14930–5.

(40) Mahé S, Roos N, Benamouzig R, et al. Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. Am J Clin Nutr 1996;63(4):546–52.

(41) Mariotti F, Mahé S, Luengo C, et al. Postprandial modulation of dietary and whole-body nitrogen utilization by carbohydrates in humans. Am J Clin Nutr 2000;72(4):954–62.

(42) Calvez J, Benoit S, Piedcoq J, et al. Very low ileal nitrogen and amino acid digestibility of zein compared to whey protein isolate in healthy volunteers. Am J Clin Nutr 2020;nqaa274.

(43) Barbano DM, Lynch JM, Fleming JR. Direct and Indirect Determination of True Protein Content of Milk by Kjeldahl Analysis: Collaborative Study. J AOAC Int 1991;74(2):281–8.

(44) Waite R, Castle ME, Watson JN, et al. Biuret and urea in concentrates for milking cows. J Dairy Res 1968;35(2):191–202.

(45) Venkatappaiah D, Basu KP. Nonprotein nitrogenous constituents of milk. 1. Variation due to species, breed, individuality, season and stage of lactation. Indian J Dairy Sci 1952;5:95–116.

(46) Wolfe RR, Rutherfurd SM, Kim I-Y, et al. Protein quality as determined by the Digestible Indispensable Amino Acid Score: evaluation of factors underlying the calculation: Table 1. Nutr Rev 2016;74(9):584–99.

(47) Sosulski FW, Imafidon GI. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. J Agric Food Chem 1990;38(6):1351–6.

(48) Sarwar G, Christensen DA, Finlayson AJ, et al. Inter- and Intra-Laboratory Variation in Amino Acid Analysis of Food Proteins. J Food Sci 1983;48(2):526–31.

(49) Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, et al. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. Am J Physiol-Endocrinol Metab 2001;280(2):E340–8.

(50) AFSSA. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. 2007.

3.4. Article 4 : Comparaison de la méthode double traceur à la méthode directe dans l'évaluation de la digestibilité iléale des acides aminés de la protéine de pois et de la caséine chez l'Homme

Article en cours de soumission

Résumé

Objectifs

La mesure iléale directe de la digestibilité des AA par intubation naso-iléale est très invasive et ne peut pas être appliquée aux populations vulnérables. Une autre méthode indirecte basée sur l'enrichissement isotopique postprandial des AA plasmatiques a été proposée par la FAO. Cette méthode dite « double traceur » repose sur le calcul des rapports isotopiques entre une protéine test et une protéine de référence, de digestibilité connue, chacune étant marquée par son propre isotope. Cependant, la méthode double traceur n'est pas encore validée car elle n'a jamais été comparée à la mesure iléale directe au sein d'une même étude. L'objectif de ces travaux était de tester la méthode double traceur en la comparant à la méthode directe, sur les mêmes sujets. Cette comparaison a été effectuée dans le cadre de l'évaluation de la digestibilité des AA de deux protéines de sources différentes : la protéine de pois et la caséine de lait.

Méthodes

Quinze volontaires adultes en bonne santé ont été intubés avec une sonde naso-iléale à triple lumière. Ils ont ingéré 9 portions successives de purée de pommes de terre contenant la protéine test intrinsèquement marquée au ^{15}N et au ^{2}H, à savoir la protéine de pois ou la caséine. Un mélange d'AA algaux marqués au ^{13}C a été incorporé aux repas en tant que « protéine » de référence pour la méthode double traceur. Le plasma a été prélevé régulièrement pendant une période postprandiale de 8 heures, tandis que les digesta iléaux ont été collectés en continu. Pour la méthode directe, la diffusion d'un marqueur non absorbable, le PEG-4000, et la mesure de l'enrichissement en ^{15}N des digesta ont permis de calculer la digestibilité iléale réelle des AA (RID_{AA}). Les échantillons de digesta ont également servi à mesurer la digestibilité de la référence dans la méthode double traceur, les AA libres ^{13}C. Pour la méthode double traceur, la digestibilité iléale des AA a été estimée par la quantité d'AA absorbée (Ab_{AA}), calculée en rapportant l'enrichissement en ^{2}H et ^{13}C du plasma aux enrichissements en ^{2}H et ^{13}C des repas. Les enrichissements isotopiques ont été mesurés dans les digesta, les échantillons de plasma et les repas par GC-C-IRMS. La teneur en AA a été évaluée dans les digesta et les repas par U-HPLC.

Résultats

Pour la protéine de pois, les valeurs d'Ab_{AA} et de RID_{AA} étaient de 102,2 ± 3,1% et 94,3 ± 1,5%, respectivement (P < 0,001). Pour la caséine, les valeurs d'Ab_{AA} et de RID_{AA} étaient de 91,9 ± 2,0% et 97,1 ± 0,8%, respectivement (P < 0,01). La méthode double traceur a conduit à une surestimation de 8% de la digestibilité des AA de la protéine de pois et à une sous-estimation de 5% de la digestibilité des AA de la caséine, et la variabilité était plus élevée qu'avec la méthode directe. La digestibilité iléale moyenne des AA du mélange d'AA libres ^{13}C était stable et élevée (98,1 ± 1,1%), validant son utilisation comme référence pour la méthode double traceur.

Conclusion

Pour plusieurs AA, la digestibilité par la méthode double traceur était du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues par la méthode directe. Cependant, la variabilité était élevée et l'écart par rapport à la méthode directe variait selon la source de protéines. La méthode double traceur nécessite des recherches supplémentaires mais, sous réserve de validation, elle pourrait conduire à des progrès majeurs dans l'évaluation de la qualité des protéines pour la nutrition humaine.

Comparison of dual tracer and ileal sampling methods in the assessment of amino acid digestibility of pea protein and casein in humans

Authors and institutions

Florence M. Guillin[1,2], Claire Gaudichon[1], Laetitia Guérin-Deremaux[2], Catherine Lefranc-Millot[2], Gheorghe Airinei[1], Nadezda Khodorova[1], Robert Benamouzig[1], Pierre-Henri Pomport[3], Juliette Martin[4], Juliane Calvez[1]

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

[2] Roquette, 62080, Lestrem, France

[3] Ferme expérimentale AgroParisTech, route de la ferme, 78850, Thiverval-Grignon, France

[4] Unité expérimentale du domaine d'Epoisses, INRAE, U2E, 21110, Bretenière, France

Corresponding author

Juliane Calvez

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

Phone number: +33 1 44 08 86 77

juliane.calvez@agroparistech.fr

Abbreviations

AA: amino acid, Ab_{AA}: amino acid absorption, AP: atom percent, APE: atom percent excess, Asx: asparagine + aspartate, AUC: area under the curve, C: carbon, DM: dry matter, EA-IRMS: elementary analyzer isotopic ratio mass spectrometry, GC-C-IRMS: gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, Glx: glutamine + glutamate, F: ileal flow rate, N: nitrogen, n.s.: non-significant, PEG: polyethylene glycol, RID_{AA}: real ileal amino acid digestibility, SD: standard deviation, TBW: total body water, TF: transamination factor, U-HPLC: ultra-high performance liquid chromatography, VCO_2: carbon dioxide production

Keywords

Dual tracer method, digestibility, amino acid, human, stable isotopes

Abstract

Background

The direct ileal measurement of amino acid (AA) digestibility is highly invasive thus inappropriate to be applied to vulnerable populations. An alternative indirect method based on the postprandial isotopic enrichment of plasmatic AAs has been proposed by the FAO. This dual tracer method relies on the calculation of isotopic ratios between a test protein and a reference protein of known digestibility, each one being labelled with its own isotope. However, the dual tracer method is not yet validated, as it has never been compared to the direct ileal measurement within a same study.

Objective

The aim of this work was to evaluate the dual tracer method by a comparison with the direct intubation method, on the same subjects. The comparison was made in the context of the assessment of AA digestibility of two proteins from different sources: pea protein and milk casein.

Methods

Fifteen healthy adults completed the study and were equipped with a triple-lumen naso-ileal tube. They ingested 9 successive portions of mashed potatoes containing the test protein intrinsically labelled with ^{15}N and ^{2}H, either pea protein or casein. A ^{13}C algal free AA mixture was incorporated into the meals as a reference for dual tracer method. Plasma was sampled regularly over an 8-h postprandial period, while ileal digesta was collected continuously. For ileal sampling method, the diffusion of a non-absorbable marker, PEG-4000, and the measurement of ^{15}N enrichment of the digesta allowed to calculate real ileal AA digestibility (RID_{AA}). The digesta samples were also used to assess the digestibility of the ^{13}C free AA reference, needed for dual tracer method. For dual tracer method, the amount of AA absorbed (Ab_{AA}), an estimate of ileal AA digestibility, was calculated using ^{2}H and ^{13}C enrichment in plasma reported to ^{2}H and ^{13}C enrichments in meals. The isotopic enrichments were measured in digesta, plasma samples and meals using GC-C-IRMS. The AA content was evaluated in digesta samples and meals using U-HPLC.

Results

For pea protein, Ab_{AA} and RID_{AA} were 102.2 ± 3.1% and 94.3 ± 1.5% ($P< 0.001$), respectively. For casein, Ab_{AA} and RID_{AA} were 91.9 ± 2.0% and 97.1 ± 0.8% ($P< 0.01$), respectively. The dual tracer method led to an 8% overestimation of pea protein AA digestibility and a 5% underestimation of casein AA digestibility, and the variability was higher than with the standard method. The mean ileal AA digestibility of the ^{13}C free AA mixture was stable and high (98.1 ± 1.1%), validating its use as a reference for dual tracer method.

Conclusion

For several AAs, the digestibility obtained with dual tracer method was in the same range as the values obtained with the direct method. However, the variability was high and the deviation from the direct ileal method varied depending on the protein source. Dual tracer method requires further research and validation, but could lead to major progress in the evaluation of protein quality for human nutrition.

Introduction

Amino acid (AA) bioavailability is defined as the proportion of AAs entering the systemic circulation and available for protein synthesis after ingestion. Digestibility assessment is limited to the amount of residual dietary AAs that remains in the digesta after absorption, whereas bioavailability integrates both digestive and metabolic losses of ingested AAs [1,2]. Digestibility varies with the source (composition, structure), the food matrix (texture, technological process) and individual factors (physiological state, genetics) [3,4] and is a major determinant of protein quality. Thus, the evaluation of AA digestibility has elicited the interest of the scientific community over the past 5 years [5]. However, the measurement of protein digestibility in humans is methodologically challenging [6]. The FAO recommended to evaluate digestibility individually for each AA [7], which implies that the digestive losses should be measured at the ileal level instead of the fecal level to avoid the impact of the metabolic activity of the colonic microbiota [8].

The ileal losses of AAs can be assessed in humans through different approaches. The direct method relies on the collection of ileal content following ingestion of test proteins, often labelled with stable isotopes. The digesta can be collected in ileostomates [9,10], but the recruitment is tedious and their digestion process can be unrepresentative of healthy subjects [11,12]. Another possibility is the installation of a naso-ileal tube in healthy volunteers that allows continuous collection of digesta and leads to relevant measurements of ileal AA losses [13–15]. However, intestinal tubing is very invasive, expensive and not suitable for routine use [2,5,16]. In the context of developing strategies to respond to the growing global protein demand, a great number of novel protein sources, technological processes and cooking methods needs to be evaluated; it is thus essential to develop minimally invasive approaches [17,18].

Some methods rely on the determination of AA bioavailability through the kinetics of AA appearance in the plasma after a test meal [19–21]. It generally involves proteins intrinsically labeled with ^{15}N, ^{2}H or

^{13}C from plant [22–24] or animal sources [13,25,26] and the measurement of enrichment in plasma [27] or breath CO_2 [28] following the ingestion. However, postprandial AA content in plasma does not fully reflect the absorption because it is influenced by the speed of digestion, the splanchnic uptake and the chemical form of the AAs [5,29]. Single labelling using such approach is not sufficient, and a new method based on dual tracer has been proposed to approximate ileal AA digestibility of proteins [5,16,17]. It is an indirect method that relies on the simultaneous ingestion of a test protein and a reference protein or mix of free AAs of known digestibility and the comparison of their plasma AA enrichment pattern. Each one is labelled with a stable isotope, ^{2}H being recommended for the test protein and ^{13}C for the reference [17]. As splanchnic uptake is considered to be identical for a same AA from one protein or another, the comparison of the $^{2}H/^{13}C$ ratio in the meal and in the plasma for a given AA reflects its digestibility in the test protein in relation to the reference.

Several studies have recently been published from the same team performing the dual tracer approach to evaluate individual AA digestibility [30–35] and the results were encouraging, data being close to the expected values on the basis of the literature [16]. Although in physiological ranges, it has never been compared to ileal true AA digestibility data within a same study. Thus, the aim of the present work was to compare the dual tracer method to the direct intubation method, based on the collection of ileal digesta, in the same subjects. The comparison was made on two different proteins from plant and animal sources, pea protein isolate and milk casein. Spirulina was the reference protein used in the previously published studies. However, digestibility of spirulina was low and variable (85.2% or 87.9%, depending on the study) [31,33] whereas the reference protein should be highly digestible, according to the FAO recommendations [17], and lowly variable among subjects to be reliable as a reference value. Consequently, in this study the dual tracer method was carried out with free AAs as a reference, as they are supposed to be almost entirely absorbed. Protein and AA digestibility values of pea protein isolate and casein obtained in the present clinical study have been described previously (Guillin *et al.*, ongoing submission*).

Methods

Test meals

We compared two purified test proteins that were doubly-labelled with ^{15}N and ^{2}H. For pea protein, the labelling protocol was carried out at Unité Expérimentale du Domaine d'Epoisses, INRAE

* Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, Lefranc-Millot C, Airinei G, Khodorova N, Benamouzig R, Pomport PH, Martin J, Calvez J. Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans (ongoing submission)

(Bretenière, France). Three micro-plots of yellow peas (*Pisum sativum*) were fertilized with two supplies of ^{15}N-labelled ammonium nitrate ($^{15}NH_4{}^{15}NO_3$) at stages 4/6 leaves and floral buds. They were also watered with $^{2}H_2O$ for 5 consecutive days starting from 50% bloom. The seeds were harvested at maturity, air dried and ground to flour. The protein fraction was extracted under acid precipitation, heat-treated and freeze-dried to obtain a protein isolate. For casein, a 5-day labelling protocol was carried out. A lactating cow from the experimental farm of AgroParisTech (Thiverval-Grignon, France) was fed ^{15}N-labelled ammonium sulfate ($(^{15}NH_4)_2SO_4$) for 4 days (day 2-5), and provided with shots of heavy water $^{2}H_2O$ for 3 days (day 1-3). The labelled-milk was collected at day 5, skimmed and pasteurized. The casein fraction was extracted under ultrafiltration followed by microfiltration, heat-treated and freeze-dried. The casein and pea protein isolates were tested for microbiological contamination. Nitrogen (N) content was 12% and 12.5% for pea protein and casein isolates respectively. ^{15}N enrichment was 0.71 atom percent (AP) for pea protein isolate and 1.75 atom percent for casein isolate. ^{2}H enrichment was 0.11 AP for pea protein isolate and 0.14 AP for casein isolate. The AA composition and enrichment of test proteins are presented in **Table 1**. The test meals were composed of mashed potatoes (Picard®, France) containing one of the test proteins (pea protein or casein) and algal ^{13}C free AA mixture (97%, Eurisotop, Saint-Aubin, France). The composition of ^{13}C free AA mixture is given in **Supplemental table 1**. It did not contain any tryptophan, cysteine and glutamine. The food matrix was semi-liquid to minimize phase shift between the test protein and the free AAs during gastric emptying. A frequent feeding protocol was performed to reach an isotopic enrichment plateau in the plasma, which was necessary to carry out the calculations for dual tracer method. The meal was split into 12 portions and given in 9 mini-meals, the first one being a loading dose of 4 portions. Each volunteer received a total of 45 g DW of mashed potatoes, 35 g of pea protein isolate or 31 g of casein isolate (corresponding to 4 g of N from the test protein) and 400 mg of ^{13}C free AA mixture. They were given a glass of water hourly and were not allowed to ingest any other food during the 8 h of postprandial sampling period.

Subjects

This study was approved by the Ethical Committee Sud-Est III and was registered at www.clinicaltrials.gov database (NCT04072770). The clinical trial was conducted in the Human Nutrition Research Center of Avicenne Hospital (APHP, Bobigny, France). After signing a written informed consent, 26 healthy volunteers with no history of gastrointestinal disorder or food allergy participated in the study. Several subjects did not complete the protocol or had to be excluded and the final sample size was n = 15 (age, 36 ± 8.3 years old; body mass index, 23.6 ± 2.4 kg/m^2, **Table 2**). The main causes of exclusion during the procedure were failure of migration of the tube through the

pylorus, pain or vomiting, and insufficient migration in the small intestine. Two volunteers were removed afterwards because of unusable samples (**Figure 1**).

Table 1. AA composition and AA enrichment in ^{15}N and ^{2}H of protein isolates

	Pea protein			Casein		
	Content (mg/g protein*)	^{15}N enrichment (AP)	^{2}H enrichment (AP)	Content (mg/g protein*)	^{15}N enrichment (AP)	^{2}H enrichment (AP)
Ala	38.0	0.69	0.06	28.0	1.84	0.18
Gly	34.9	0.72	0.05	15.4	1.68	0.15
Ile	47.8	0.72	0.10	49.9	1.91	0.09
Leu	79.5	0.72	0.10	92.5	1.60	0.07
Lys	73.4	0.73	0.09	79.6	1.96	0.09
Phe	56.3	0.73	0.11	49.1	1.65	0.04
Pro	40.8	0.73	0.10	95.4	1.55	0.12
Thr	35.9	0.71	0.10	41.5	1.79	0.06
Tyr	38.9	0.72	0.07	54.1	1.07	0.05
Val	49.1	0.73	0.11	61.3	1.74	0.07

AP, atom percent

* Protein content = N × 6.25

Table 2. Anthropometric data of the volunteers (n = 15)

	Pea protein	Casein	Total
Sex (F/M)	5/3	5/2	10/5
Age (years)	36.0 ± 9.8	36.0 ± 7.0	36.0 ± 8.3
BMI (kg/m^2)	23.5 ± 2.7	23.7 ± 2.2	23.6 ± 2.4
TBW (L)	33.9 ± 5.8	33.1 ± 7.2	33.5 ± 6.2

BMI: body mass index, TBW: total body water

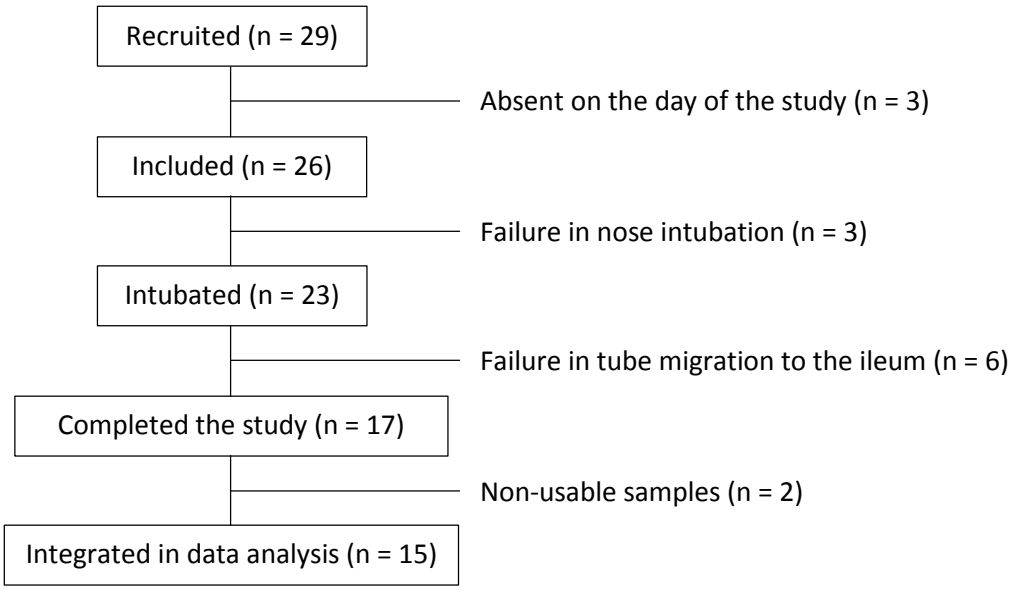

Figure 1. Participant flowchart, causes of failure and exclusion criteria

Experimental protocol

The volunteers were admitted in the hospital for 2 days (**Figure 2**), with a maximum of 2 volunteers at the same time. The morning of day 1, a triple-lumen tube (polyvinyl chloride tubing, total length 2.5 m) was placed into their stomach through their nose under local anesthesia and migrated along the digestive tract for 24 h with intestinal peristalsis. The progression was facilitated by inflating a terminal weighted balloon through one of the three lumens once the tube had reached the small intestine. The passage of the tube through the pylorus was checked by radiography in the early afternoon of day 1. The volunteers ate a standard hospital meal after the radiography and had dinner at 20:00, before fasting overnight. At the beginning of day 2, a second radiography was performed to check the migration of the tube to the terminal ileum. Correct position of the tube was also confirmed by measuring the pH of the intestinal effluent, which was collected by aspiration with a syringe through the second lumen of the tube. Polyethylene glycol 4000 (PEG-4000; 20 g/L) was used as a non-absorbable marker to calculate the intestinal flow rate. It was integrated in a saline solution and perfused in the ileum at a rate of 1 mL/min through the third lumen, 20 cm above digesta collection. A catheter was placed into the forearm vein of the volunteers for blood sampling. The protocol was single-blinded, the volunteers receiving either pea protein or casein. The 9 test meals were given every 30 min for 4 h and were consumed in a limited amount of time (10 min). The ileal content was collected continuously from 30 min before the first meal ingestion to the end of the procedure, 8 h later. The digesta were pooled every 30 min, sampled in jars with addition of protease inhibitor (diisopropylfluorophosphates), frozen at -20 °C, and freeze-dried until analysis. Blood samples were taken every 30 min for the first 4 h, then hourly. The respiratory exchange was analyzed for carbon

dioxide production (VCO_2) for a 10-min period every hour using a Q-NRG® system for indirect calorimetry equipped with a canopy (Cosmed, France), and expired breath was sampled every 30 min.

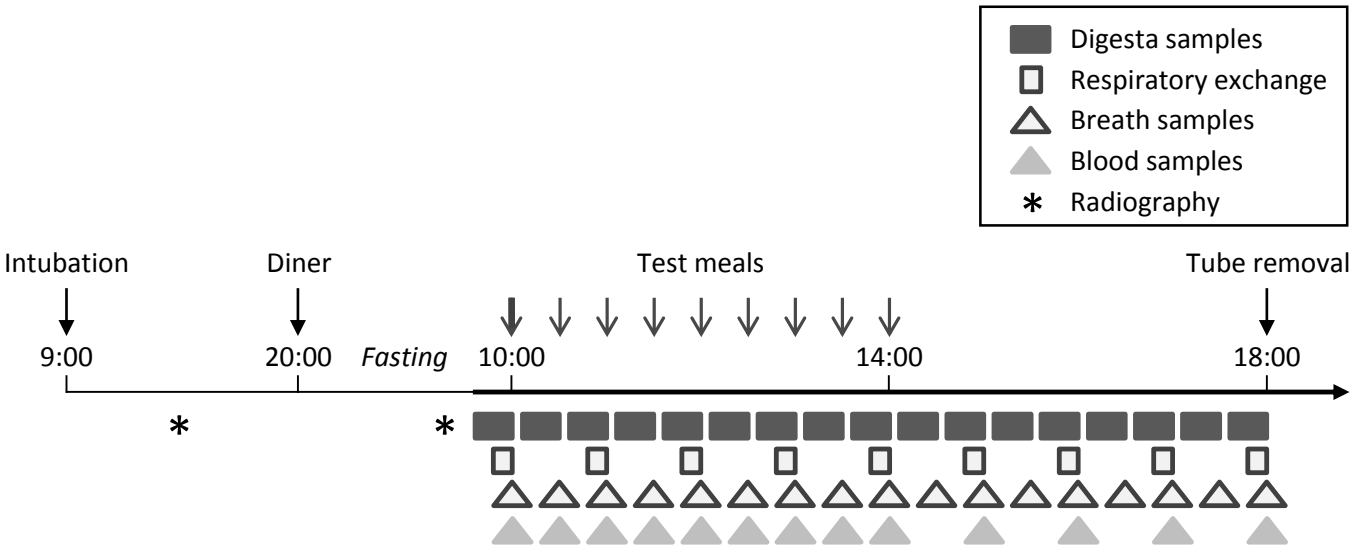

Figure 2. Experimental design of the study

Analytical procedure

Ileal AA digestibility evaluated with the direct method (RID_{AA}) was assessed from AA content and ^{15}N enrichment of individual AAs in digesta and test proteins and the analytical procedure has been previously described (Guillin *et al.*, ongoing submission[*]). AA absorption, evaluated with the dual tracer method (Ab_{AA}), was determined using ^{2}H and ^{13}C recovery in plasma and in test meals, for each AA.

Briefly, the PEG-4000 content of the digesta was measured by a turbidimetric method [36] to determine the ileal flow rate. For AA content measurement in digesta and protein isolates, 10 mg of samples were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. Norvaline was added prior to hydrolysis as an internal standard. Plasma samples (100 µL) were deproteinized with sulfosalicylic acid (10%) with the addition of norvaline as an internal standard. Calibration standards were composed of an AA mixture (Waters) with addition of norvaline. Hydrolysates, plasma samples and standards were derivatized using the AccQTag Ultra Derivatization Kit (Waters) according to the manufacturer's protocol. The AA quantification was performed on an Acquity HClass ultra-high performance liquid chromatography (U-HPLC) system with a photodiode array detector (PDA detector; Waters, France). The AAs were separated with an AccQ-Tag AA C18 column (2.1 × 100 mm; 1.7 µm bead size; Waters, France) and quantified as mmol/g of dry matter.

[*] Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, Lefranc-Millot C, Airinei G, Khodorova N, Benamouzig R, Pomport PH, Martin J, Calvez J. Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans (ongoing submission)

Digesta samples were analyzed for ^{15}N enrichment in individual AAs, plasma samples were analyzed for ^{2}H and ^{13}C enrichment in individual AAs, and protein isolates were analyzed for ^{15}N and ^{2}H enrichment in individual AAs. The values of ^{13}C enrichment of algal AA mixture used were the ones provided by the technical data sheet. For digesta and protein isolates, 90 mg of samples were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. AAs were then isolated using a hydrogen form resin (Dowex® 50WX8 hydrogen form 100-200 mesh, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and derivatized with ethyl chloroformate as previously described [26]. For plasma, isolation of free AAs was performed on 1.5 mL of sample. ^{15}N, ^{2}H and ^{13}C enrichments of isolated AAs were analyzed by gas chromatography (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled with an isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, GV Instrument, Manchester, UK) via the GC5 Isoprime interface. The combustion furnace temperature was 950°C in N mode, 850°C in C mode, and 1100°C for H mode (high temperature conversion). The GC column (RXI-17, 30 m long, 0.25 µm i.d., 0.5 µm film thickness; Restek) temperature program started at 150 °C, increased by 4°C per min up to 200°C and by 25°C per min up to 270 °C, the final temperature being maintained for 10 min. The inlet temperature was set at 270°C.

Calculations for AA digestibility with the direct method

The ileal flow rate (F) was evaluated each 30 min as follows:

$$F\ (\text{mL/30min}) = \frac{[PEG]_{solution}}{[PEG]_{digesta}} \times \text{perfusion flow rate} \times 30$$

Where $[PEG]_{solution}$ and $[PEG]_{digesta}$ were the concentrations of PEG-4000 in the perfused solution and in the digestive contents respectively. The flow rate of the PEG perfusion was 1 mL/min.

The quantity of dietary AA in digesta ($AA_{i\ diet}$) was calculated for each period of time (t):

$$AA_{i\ diet}\ (t)\ (\text{mmol}) = [AA_i]_{ileum}\ (t) \times DM\ (t) \times F(t) \times \frac{APE_{i\ ileum}\ (t)}{APE_{meal}}$$

Where $[AA_i]_{ileum}$ was the quantity of AA_i in the digesta at t period (mmol/g), DM was the dry matter of digesta (g/100mL), F was the ileal flow rate (mL/30min) and APE the amount of ^{15}N enrichment gained in AA_i in the digesta as compared to the basal value (in AP) at t period. Basal enrichment in AA_i was defined for each volunteer independently as AA_i enrichment in the t = 0 digesta sample.

Real ileal digestibility of AA with the direct method (RID_{AA}) was calculated for each AA as follows:

$$RID_{AAi}\ (\%\ AA_{i\ ingested}) = 1 - \frac{\Sigma AA_{i\ diet}}{AA_{i\ ingested}} \times 100$$

Where $\Sigma AA_{i\ diet}$ was the sum of dietary AA_i over 8 h (mmol) and $AA_{i\ ingested}$ was the amount of $AA_{i\ ingested}$ by the volunteer (mmol). Average AA digestibility was calculated from the mean of AA digestibilities weighted by the proportion of each AA in the protein. RID could not be calculated for histidine, tryptophane, cysteine, serine and tyrosine. The missing AAs are explained by their low recovery or

absence in the digesta hydrolysates produced for GCC-IRMS analyses or a co-elution with other components in the chromatography column.

Calculations for AAs absorption index with the dual tracer method using AUC or plateau

The AA digestibility of the reference for dual tracer method (^{13}C digestibility$_{AA}$), namely algal free AA mixture, was assessed through analyses of the digesta collected by the direct method. It was calculated on the same principle as RID$_{AA}$ calculation, as described above, using ^{13}C enrichment instead of ^{15}N enrichment.

^{2}H and ^{13}C enrichments in the meal (protein isolate + algal AA mixture + mashed potatoes) were calculated for each AA as follows:

$$AP_{i\ meal} = \frac{AA_{i\ isolate} \times AP_{i\ isolate} + AA_{i\ mix} \times AP_{i\ mix} + AA_{i\ mp} \times AP_{i\ mp}}{AA_{i\ isolate} + AA_{i\ mix} + AA_{i\ mp}}$$

Where $AA_{i\ isolate}$, $AA_{i\ mix}$ and $AA_{i\ mp}$ were the amount of AA_i in the doses of protein isolates (casein or pea), ^{13}C algal AA mixture, and mashed potatoes, respectively. $AP_{i\ isolate}$, $AP_{i\ mix}$ and $AP_{i\ mp}$ are the enrichments (^{2}H or ^{13}C) of AA_i in the protein isolate (casein or pea, natural abundance for ^{13}C), the ^{13}C algal AA mixture (i.e. 95-99 AP; **Supplemental table 1**), and the mashed potatoes (i.e. natural abundance), respectively. ^{2}H enrichment could not be measured for methionine and tryptophane.

The ratio of ^{2}H to ^{13}C isotopes was measured in the meal and in plasma for each AA:

$$\text{Meal ratio } AA_i = \frac{^{2}H_{meal\ i}}{^{13}C_{meal\ i}}$$

$$\text{Plasma ratio } AA_i = \frac{^{2}H_{plasma\ i}}{^{13}C_{plasma\ i}}$$

Two different techniques were used for plasma ratios, depending on the calculation of $^{2}H_{plasma}$ and $^{13}C_{plasma}$ from the isotopic kinetics. It involved either the area under the curve (AUC) or the enrichment value at the plateau. The AUC of the plasma isotopic kinetics was calculated for each AA for both isotopes over the entire 8-h postprandial period. For the plateau technique, the plasma ratio was measured individually for each volunteer and AA using the mean enrichment at the plateau period of ^{2}H and ^{13}C plasma kinetics. The delimitation of the plateau was set individually for each volunteer. Four outliers were removed from the digestibility calculations (2 in each protein group) due to analytical differences.

The percentage of AA absorption (Ab$_{AA}$) was determined for each AA:

$$Ab_{AAi}\ (\%) = {}^{13}\text{C digestibility}_{AAi} \times \frac{\text{Plasma ratio } AA_i}{\text{Meal ratio } AA_i} \times TF_{AAi}$$

Where ^{13}C digestibility$_{AAi}$ was the ileal ^{13}C digestibility of AA_i determined by the analysis of digesta (AA_i content and ^{13}C enrichment of AA_i) and TF_{AA} is the transamination correction factor of AA_i. The TF values were obtained from Devi *et al.* [31] and were used to correct the loss of ^{2}H atom during transamination (**Table 3**).

Table 3. Transamination factors for correction of ^{2}H loss used for digestibility calculations through dual tracer method, from Devi *et al*. [31]

	TF
Isoleucine	1.070
Leucine	1.081
Lysine	1.002
Phenylalanine	1.053
Proline	1.013
Valine	1.048

TF: Transamination Factor

Statistical analysis

The values are expressed as mean ± standard deviation (SD). The difference between the two digestibility methods (RID and Ab) was evaluated with a mixed model with the method and the protein as fixed effects and the volunteer as a repeated effect. The effect of the protein source on the AUC of plasmatic enrichments of AA, on the ileal digestibility of the ^{13}C free AA mixture and on the mean AA digestibilities was tested using a two-sided Student t test. $^{13}CO_2$ production was analyzed using a mixed model with the protein as a fixed effect and time as a repeated effect. Overall significant difference was observed for $P < 0.05$.

Results

Plasmatic isotopic enrichments in ^{2}H and ^{13}C

The ^{2}H enrichment appeared in the plasma 30 min after the first ingestion for pea protein (**Figure 3.A**) and casein (**Figure 3.B**) groups. An isotopic enrichment plateau was reached between t = 2.1 h ± 0.5 h and t = 4.6 h ± 0.5 h for pea protein group, and between t = 2.2 h ± 0.5 h and t = 5.3 h ± 0.8 h for casein group, on average for all AAs and volunteers. After the plateau, the enrichment decreased gradually until the end of the protocol. Surprisingly, plasmatic alanine and glycine did not gain any enrichment in pea protein group. In casein group, alanine did not gain enrichment neither and glycine enrichment was very low. The major ^{2}H enrichments were observed for isoleucine and proline in pea protein and

casein groups, respectively. The enrichment of plasmatic AA was higher for pea protein group compared to casein, except for proline that was more enriched in casein group.

The ^{13}C enrichment also appeared in the plasma 30 min after the first ingestion for pea protein (**Figure 4.A**) and casein (**Figure 4.B**) groups. The isotopic enrichment plateau was reached between t = 1.4 h ± 0.4 h and t = 4.3 h ± 0.5 h for pea protein group, and between t = 1.9 h ± 0.4 h and t = 4.8 h ± 0.8 h for casein group, in average for all AA and volunteers. The enrichment decreased gradually after the plateau. The major ^{13}C enrichment was observed for isoleucine for both protein groups. The ^{13}C enrichment profile of plasmatic AA was quite similar between pea protein and casein groups.

The AUC were calculated from the plasmatic enrichment curves for ^{2}H and ^{13}C (**Table 4**). AUC of ^{2}H enrichment was different according to the protein group, except for lysine and alanine. ^{2}H AUC for isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine, tyrosine and valine were higher in pea protein compared to casein, but lower for proline and glycine. For ^{13}C, the AUC were not different between the diet groups except for proline, whose enrichment was higher in pea protein group.

AA digestibility assessed through dual tracer method and direct method

The AA digestibilities of the reference ^{13}C free AA mixture were obtained from ileal digesta collection and are given in **Table 5**. Whatever the group, digestibility was the lowest for tyrosine (around 95%) and the highest for phenylalanine (99.5 %). The mean AA digestibility of the free AA mixture reference was high and not different between pea and casein groups (around 98%).

The meal $^{2}H/^{13}C$ ratios were determined from ^{2}H and ^{13}C enrichments of test meals, theoretically calculated from ^{2}H and ^{13}C enrichments of the protein isolates, the algal free AA mixture and the mashed potatoes (**Table 6**). We used calculated values instead of measured values because given the low dose of ^{13}C AA (400 mg) in the meal (80 g DM), the homogenization and the meal sampling (90 mg DM) for isotopic analysis led to a bad repeatability and a lack of precision. The plasma $^{2}H/^{13}C$ ratios in the AUC method were calculated on the whole postprandial period. The plasma $^{2}H/^{13}C$ ratios in the plateau method were calculated from the average ^{2}H and ^{13}C enrichment values at the plateau period, the latter being defined for each volunteer independently. The ratios and the ileal digestibility of the reference (^{13}C free AA mixture) enabled to calculate the absorbed amount of each AA from pea protein and casein.

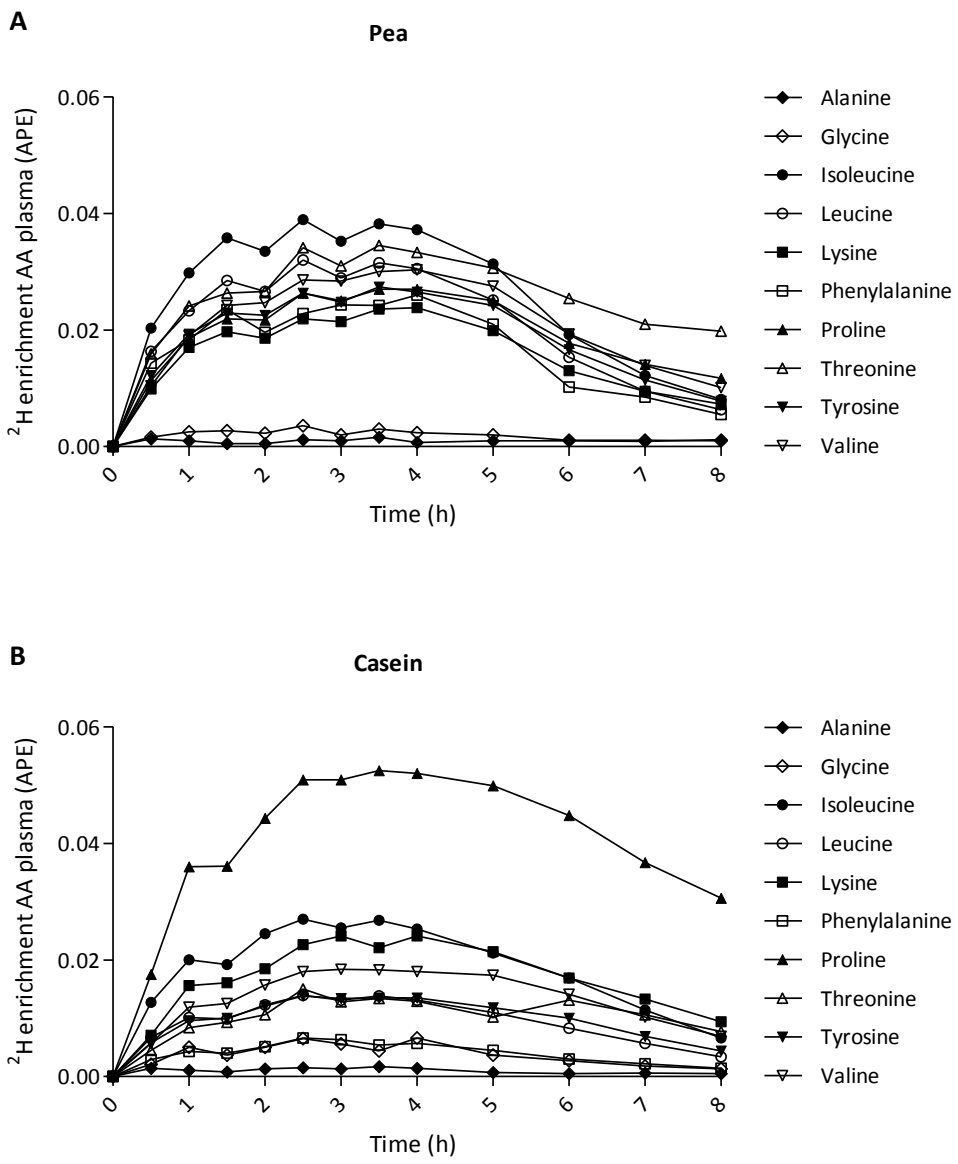

Figure 3. A. ^{2}H enrichment of AA in plasma for pea protein group (n = 8). **B.** ^{2}H enrichment of AA in plasma for casein group (n = 7). Values are means, error bars were removed for clarity. APE: atom percent excess.

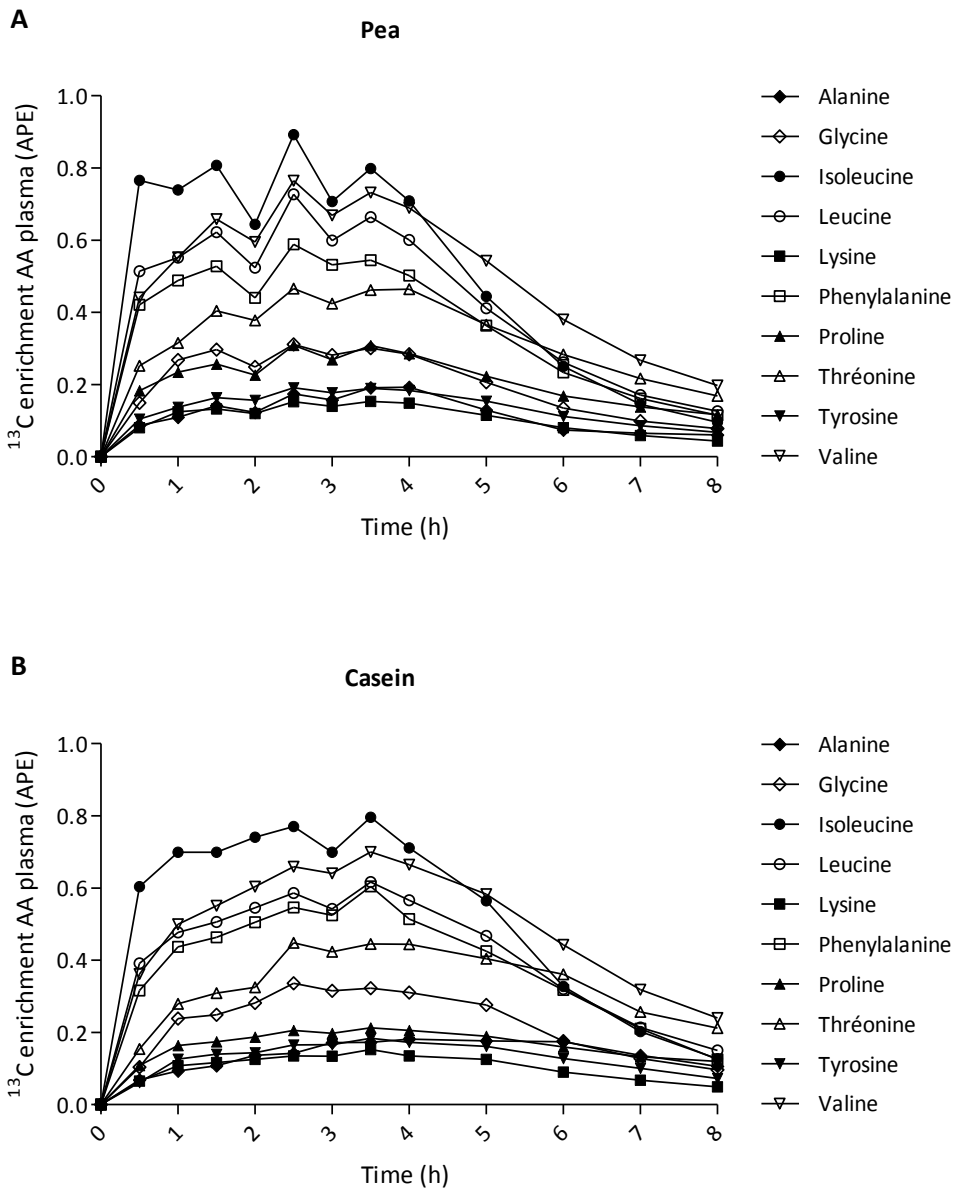

Figure 4. A. ^{13}C enrichment of AA in plasma for pea protein group (n = 8). **B.** ^{13}C enrichment of AA in plasma for casein group (n = 7). Values are means, error bars were removed for clarity. APE: atom percent excess.

Table 4. AUC of ^{2}H and ^{13}C enrichments of AA in plasma

	^{2}H protein isolates			^{13}C free AA mixture		
	Pea protein	Casein	P	Pea protein	Casein	P
Alanine	0.008 ± 0.005	0.008 ± 0.005	n.s.	0.94 ± 0.51	1.04 ± 0.57	n.s.
Glycine	0.014 ± 0.006	0.029 ± 0.013	0.01	1.62 ± 0.32	1.77 ± 0.56	n.s.
Isoleucine	0.204 ± 0.030	0.148 ± 0.035	< 0.01	4.10 ± 0.48	4.21 ± 0.56	n.s.
Leucine	0.164 ± 0.027	0.076 ± 0.014	< 0.001	3.46 ± 0.50	3.33 ± 0.46	n.s.
Lysine	0.123 ± 0.032	0.136 ± 0.026	n.s.	0.82 ± 0.20	0.78 ± 0.34	n.s.
Phenylalanine	0.130 ± 0.042	0.032 ± 0.009	< 0.001	2.76 ± 1.15	4.30 ± 1.96	n.s.
Proline	0.153 ± 0.036	0.326 ± 0.060	< 0.001	1.70 ± 0.40	1.31 ± 0.18	0.04
Threonine	0.200 ± 0.066	0.098 ± 0.057	0.01	2.65 ± 0.36	2.62 ± 0.45	n.s.
Tyrosine	0.148 ± 0.021	0.079 ± 0.014	< 0.001	1.25 ± 0.35	1.40 ± 0.45	n.s.
Valine	0.166 ± 0.024	0.108 ± 0.015	< 0.001	4.01 ± 0.50	3.96 ± 0.54	n.s.

APE: atom percent excess, n.s.: non-significant

Values are means ± SD (pea protein: n = 8, casein: n = 7)

Table 5. Ileal digestibility of the reference ^{13}C free AA mixture

(%)	Pea protein	Casein	Total	P
Alanine	99.3 ± 0.3	99.0 ± 0.7	99.1 ± 0.5	n.s.
Glycine	98.4 ± 0.6	98.0 ± 1.1	98.2 ± 0.9	n.s.
Isoleucine	98.7 ± 0.6	98.5 ± 1.1	98.6 ± 0.9	n.s.
Leucine	99.0 ± 0.4	98.8 ± 0.8	98.9 ± 0.6	n.s.
Lysine	98.2 ± 1.1	97.6 ± 1.5	97.9 ± 1.3	n.s.
Phenylalanine	99.5 ± 0.3	99.3 ± 0.4	99.4 ± 0.3	n.s.
Proline	99.1 ± 0.2	99.3 ± 0.3	99.2 ± 0.3	n.s.
Threonine	97.5 ± 0.7	97.6 ± 1.0	97.5 ± 0.8	n.s.
Tyrosine	95.0 ± 3.0	96.2 ± 1.6	95.6 ± 2.5	n.s.
Valine	98.6 ± 0.5	98.5 ± 0.8	98.6 ± 0.6	n.s.
Asx	97.0 ± 1.1	97.8 ± 0.8	97.4 ± 1.0	n.s.
Glx	97.4 ± 1.2	97.7 ± 1.2	97.6 ± 1.2	n.s.
Methionine	98.6 ± 0.7	98.8 ± 0.9	98.7 ± 0.8	n.s.
Serine	97.7 ± 0.9	96.0 ± 1.5	96.8 ± 1.5	n.s.
Mean all AAs	98.2 ± 1.5	98.1 ± 1.3	98.1 ± 1.1	n.s.

AA: amino acid, Asx: asparagine + aspartate, C: carbon, n.s.: non-significant, Glx: glutamine + glutamate

Table 6. ^{2}H and ^{13}C enrichment of test meals used to calculate meal ratios in dual tracer method

(APE)	Pea protein meal		Casein meal	
	^{2}H	^{13}C	^{2}H	^{13}C
Alanine	0.041	2.335	0.132	3.091
Glycine	0.028	1.789	0.097	3.455
Isoleucine	0.080	1.756	0.072	1.751
Leucine	0.076	1.669	0.049	1.512
Lysine	0.069	0.374	0.067	0.361
Phenylalanine	0.086	1.650	0.026	1.936
Proline	0.071	0.872	0.099	0.418
Threonine	0.059	1.473	0.027	1.347
Tyrosine	0.048	0.372	0.030	0.284
Valine	0.080	2.035	0.051	1.738

APE: atom percent excess

Values are means ± SD (pea protein: n = 8, casein: n = 7)

Digestibility values assessed through dual tracer method and the conventional direct method are presented in **Table 7** and **Table 8** for pea protein and casein, respectively. The ileal AA digestibility (RID_{AA}) of pea protein and casein are fully described in our previous article (Guillin *et al.*, ongoing submission[*]). Four AAs over the 10 AAs evaluated were excluded from the results (alanine, glycine, threonine and tyrosine) because their digestibility could not be evaluated using the dual tracer method. Indeed, ^{2}H enrichment in plasmatic alanine and glycine was too low (**Figure 3**), and the absorption values obtained for threonine and tyrosine were inconsistent with values greatly above and below physiological ranges. The AA digestibilities of pea protein determined with the dual tracer method (Ab_{AA}) varied from 80.1 ± 8.3% (lysine) to 117.6 ± 4.8% (isoleucine) using AUC calculation, and from 77.2 ± 7.0% (lysine) to 115.4 ± 11.6% (proline) using plateau calculation. The variability was high, especially for proline. The AA digestibilities of pea protein determined with the direct method (RID_{AA}) varied from 93.2 ± 1.7% (proline) to 95.3 ± 1.4% (phenylalanine). Ab_{AA} values were higher than RID_{AA} values for isoleucine, leucine, proline and valine, and lower for lysine. The exception was for phenylalanine, for which no difference was found between the two methods. The mean AA digestibility

[*] Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, Lefranc-Millot C, Airinei G, Khodorova N, Benamouzig R, Pomport PH, Martin J, Calvez J. Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans (ongoing submission)

of pea protein was 102.2 ± 3.1% and 103.4 ± 3.2% with the dual tracer method (AUC and plateau, respectively) and 94.3 ± 1.5% using the direct method. In average, the dual-tracer method overestimated by 10% the ileal digestibility of pea protein, with both AUC and plateau calculations.

Table 7. AA digestibility of pea protein determined by the dual tracer method, calculated using either AUC (Ab_{AA} AUC) or plateau (Ab_{AA} Plateau), and by the direct intubation method (RID_{AA})

	Pea protein				
	Ab_{AA} AUC (%)	Ab_{AA} Plateau (%)	RID_{AA} (%)	P *AUC-RID_{AA}*	P *Plateau-RID_{AA}*
Isoleucine	117.6 ± 4.8	113.4 ± 7.3	93.9 ± 1.8	< 0.001	< 0.001
Leucine	111.7 ± 4.9	112.5 ± 6.6	95.2 ± 1.4	< 0.001	< 0.001
Lysine	77.2 ± 7.0	80.1 ± 8.3	94.6 ± 1.2	< 0.001	< 0.01
Phenylalanine	88.3 ± 4.9	90.2 ± 5.5	95.3 ± 1.4	n.s.	n.s.
Proline	110.8 ± 10.3	115.4 ± 11.6	93.2 ± 1.7	< 0.01	< 0.01
Valine	107.3 ± 2.8	108.9 ± 1.8	93.5 ± 1.7	< 0.001	< 0.001
Mean	102.2 ± 3.1	103.4 ± 3.2	94.3 ± 1.5	< 0.001	< 0.01

Ab_{AA}: amino acid absorption, AUC: area under the curve, n.s.: non-significant, RID_{AA}: amino acid real ileal digestibility

Values are means ± SD (n = 6)

The AA digestibilities of casein determined with the dual tracer method (Ab_{AA}) varied from 79.0 ± 5.3% (leucine) to 107.1 ± 10.7% (proline) using AUC calculation, and from 79.9 ± 9.2% (leucine) to 107.9 ± 13.6% (proline) using plateau calculation. The variability was high (> 10% for lysine, phenylalanine and proline). The AA digestibilities of casein determined with the direct method (RID_{AA}) varied from 93.5 ± 1.9% (isoleucine) to 99.3 ± 0.3% (phenylalanine). Ab_{AA} values were higher than RID_{AA} values for leucine, and lower for leucine, lysine and phenylalanine. No difference was found between the two methods for valine and proline, the latter being explained by a high variability. The mean AA digestibility of casein was 91.9 ± 2.0% and 92.1 ± 6.6% with the dual tracer method (AUC and plateau, respectively) and 97.1 ± 0.8% using the direct method. In average, the dual-tracer method underestimated by 5% the ileal digestibility of casein. The difference of mean AA digestibility between Ab_{AA} Plateau and RID_{AA} methods was not significant, due to the high SD of Ab_{AA} Plateau.

The differences observed between dual tracer and direct methods varied with the source of protein. Mean Ab_{AA} of pea protein was higher than Mean Ab_{AA} of casein ($P < 0.001$ with AUC and $P < 0.01$ with plateau, respectively), whereas RID_{AA} of pea protein was lower than RID_{AA} of casein ($P < 0.01$).

Table 8. AA digestibility of casein measured by the dual tracer method, calculated using either AUC (Ab_{AA} AUC) or plateau (Ab_{AA} Plateau), and by the direct intubation method (RID_{AA})

	Casein				
	Ab_{AA} AUC (%)	Ab_{AA} Plateau (%)	RID_{AA} (%)	P *AUC-RID*	P *Plateau-RID*
Isoleucine	100.6 ± 4.7	97.8 ± 7.8	93.5 ± 1.9	0.01	n.s.
Leucine	79.0 ± 5.3	79.9 ± 9.2	98.5 ± 0.5	< 0.001	< 0.001
Lysine	85.8 ± 10.1	85.9 ± 7.8	98.0 ± 0.5	0.01	< 0.01
Phenylalanine	81.5 ± 10.6	84.1 ± 12.7	99.3 ± 0.3	< 0.01	< 0.01
Proline	107.1 ± 10.7	107.9 ± 13.6	97.6 ± 0.6	n.s.	n.s.
Valine	97.3 ± 2.6	97.2 ± 5.3	95.7 ± 1.4	n.s.	n.s.
Mean	91.9 ± 2.0	92.1 ± 6.6	97.1 ± 0.8	< 0.01	n.s.

Ab_{AA}: amino acid absorption, AUC: area under the curve, n.s.: non-significant, RID_{AA}: amino acid real ileal digestibility. Values are means ± SD (n = 5)

Correlation between dual tracer method and direct method

The coefficients of determination (R^2) between dual tracer method (AUC or plateau) and direct method were calculated for each AA, regardless of the protein group (**Table 9**). Outliers were removed from the correlation assessment. The highest R^2 were obtained for proline (0.79 and 0.59 for AUC and plateau techniques, respectively), isoleucine (0.68 and 0.56 for AUC and plateau techniques, respectively) and lysine (0.64 and 0.56 for AUC and plateau techniques, respectively). The other correlations between Ab_{AA} and RID_{AA} were negative and low (leucine, phenylalanine and valine). The correlations between the two methods were higher when AUC calculation was used rather than plateau, for dual tracer method.

Table 9. Coefficient of determination (R^2) between Ab_{AA} (AUC or plateau) and RID_{AA}, regardless of the protein source

	AUC-RID	Plateau-RID	n
Isoleucine	0.68	0.56	6
Leucine	0.60 (neg)	0.55 (neg)	11
Lysine	0.64	0.56	6
Phenylalanine	0.11 (neg)	0.11 (neg)	11
Proline	0.79	0.59	6
Valine	0.17 (neg)	0.15 (neg)	11

Ab_{AA}: AA absorption (measured using dual tracer method, AUC or plateau), AUC: area under the curve, neg: negative correlation, RID_{AA}: real ileal AA digestibility (measured using direct method)

Oxidation of the algal ^{13}C free AA mixture

The postprandial production of $^{13}CO_2$ in exhaled air according to the protein group is presented in **Figure 5**. The kinetics were similar between pea protein and casein groups. In both groups, the $^{13}CO_2$ increased after the first ingestion, reached a maximum value between t = 3.5 and t = 4.5 h, and decreased until the end of the protocol. However, there was a difference in $^{13}CO_2$ production between the groups (P = 0.03). Exhaled $^{13}CO_2$ was higher for casein compared to pea protein at t = 3.5 h (P = 0.02) and between t = 4.5 and t = 5.5 h (P = 0.04, 0.04, and 0.03). The total ^{13}C recovery in exhaled air was 20.8 ± 1.6% and 23.0 ± 0.9% for pea protein and casein, respectively (P = 0.056).

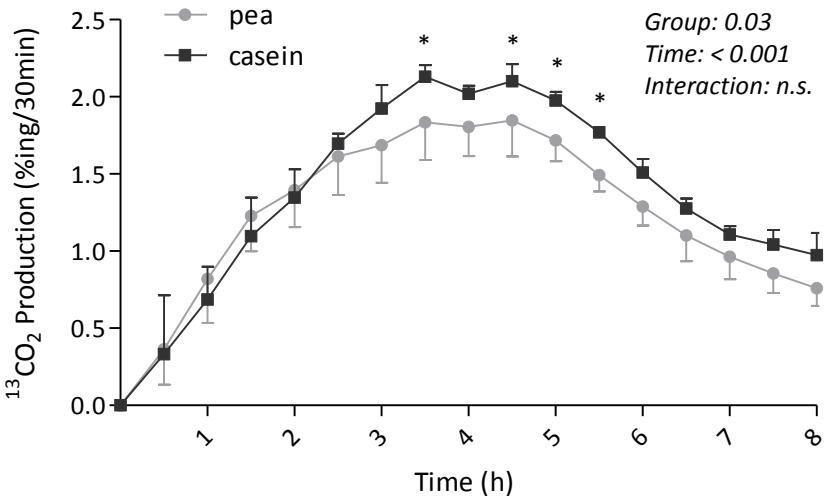

Figure 5. Postprandial production of $^{13}CO_2$ in exhaled air following the ingestion of ^{13}C free AA mixture, in pea protein and casein groups. Values are means ± SD (pea protein: n = 7, casein: n = 3)

Discussion

The main objective of this study was to examine the reliability of the minimally invasive dual tracer method in regard to the direct and standard method of ileal determination to assess AA digestibility of two different proteins, pea isolate and casein. We choose the use of ^{13}C free AAs as the reference instead of spirulina, as used in previously published studies [31–34]. In our experimental conditions, the values obtained with the dual isotope method were on average 5% lower to 8% higher than the values obtained with the standard method, depending on the protein source. Moreover, the digestibility of 4 AAs was out of physiological ranges.

The plasmatic enrichment kinetics obtained showed that the feeding pattern with multiple meals allowed to reach a plateau of 2-3 h for both ^{2}H and ^{13}C isotopes. The ^{13}C plateau was reached earlier

than the ^{2}H plateau (approximately 30 min before). This might be explained by the difference in digestion rate between the free AAs and the test proteins, as entire proteins need time to be hydrolyzed into peptides and AAs. Indeed, the absorption rate varies depending on the form and composition of the dietary protein because of differences of efficiency of the transport systems [37,38]. However, this gap was very limited and the plateau periods of the two isotopes remained concomitant, which was a necessary condition for the validity of dual tracer method. A frequent feeding pattern was carried out in order to achieve a steady isotopic plasma enrichment, and minimize the variations in absorption rates of the AAs [16,17]. The choice of a semi-liquid food matrix (mashed potatoes) was made to avoid dephasing between the ^{13}C free AAs and the test proteins during the gastric phase of digestion. The kinetics we obtained for plasma isotopic enrichment validated the feeding pattern and the food matrix that was chosen. The ^{13}C kinetics of plasmatic AA were similar following the ingestion of pea protein or casein. The plasmatic enrichment of ^{2}H varied between the groups in line with the level of enrichment of the protein isolates, being higher in pea protein group for most of the AAs. Indeed, ^{2}H enrichment was higher in AA from pea protein compared to casein except for lysine, for which it was identical, and proline, alanine and glycine, for which it was higher in casein. The mechanisms of AA synthesis being different between animal and plant species, the labelling could be positioned differently between and within the AAs. Those differences in protein enrichment resulted in greater AUC of ^{2}H in plasma AAs for the volunteers that were given pea protein, for most of the AAs.

The ileal digestibility results we obtained have been discussed previously (Guillin *et al.*, ongoing submission*). In the case of dual tracer method, the AUC or plateau values for ^{2}H and ^{13}C plasma enrichment enabled to calculate the plasma ratios that were reported to the meal enrichment ratios. The digestibility values were obtained after correction by the AA digestibility of the reference (^{13}C free AA mix) and the transamination correction factors for ^{2}H published by Devi *et al* [31]. The dual tracer method yielded digestibility values that can be considered as physiologically acceptable for isoleucine, leucine, lysine, phenylalanine and valine for casein, and for lysine and phenylalanine for pea protein. However, it led to a 5% underestimation of casein AA digestibility (mean AA digestibility of 91.9% vs 97.1% with AUC and direct methods, respectively) and an 8% overestimation of pea protein AA digestibility (mean AA digestibility of 102.2% vs 94.3% with AUC and direct methods, respectively). Moreover, as values above 100% can be considered as aberrant, this means that the dual tracer method could not provide reliable values for most of the AAs in pea group. We corrected the values using the TFs determined by Devi *et al*. by LC-MS/MS to take into account the possible loss of the α-

* Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, Lefranc-Millot C, Airinei G, Khodorova N, Benamouzig R, Pomport PH, Martin J, Calvez J. Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans (ongoing submission)

carbon ^{2}H atom through transamination [31]. As the TFs were all above 1, these corrections have therefore increased the digestibility values, which might participate in some of the values above 100% that we obtained. As the TFs were measured in one group of subjects in a different population [31], their relevance as universal factors is questionable. Without the TFs, the mean AA digestibilities were 97.7 ± 3.0% for pea protein and 88.1 ± 2.0% for casein using AUC calculation, and 98.9 ± 3.1% for pea protein and 88.3 ± 6.3% for casein using plateau calculation. Pea protein digestibilities have indeed returned to the physiological range but the underestimation for casein has been worsened. To further explore the validity of dual tracer values, we calculated the correlation between between Ab_{AA} and RID_{AA} values. Only proline and lysine digestibility displayed acceptable coefficients of linear regression, the highest R^2 being for proline (0.79 with AUC calculation). At this stage we were not able to identify a clear relationship between plasmatic and ileal digestibility measurement methods.

The lack of consistency among AAs may be ascribed to our specific protocol with a transitory plateau instead a prolonged one as performed in the previously published dual tracer studies [31–35]. The use of AUC is recommended in the FAO 2014 report, describing the dual tracer methodology [17]. However, the first published studies on dual tracer method for AA digestibility assessment used the plateau calculation and a repeated meal protocol [31–34]. Indeed, the plateau technique enables to reduce the number of blood samples and thus facilitate the studies on sensitive populations [34], such as children or elderly, for whom the evaluation of protein intake adequacy is of great importance. In the studies from Pr Kurpad's group, repeated meals were given during 7 hours and blood samples collected from 5 to 8 h after the first meal. In our case, we had to shorten the ingestion period to collect the digestive losses entirely, as we were also performing the measurement of ileal digestibility through direct method. The plateau of isotopic enrichment in our study was thus between 2 and 5 h whereas it was between 5 and 8 h in previously published studies. Because we obtained a transitory plateau, we were able to compare two different calculation methods, using either the AUC or the plateau. The AA digestibilities were similar between AUC and plateau techniques, for both pea protein and casein. Nevertheless, the variability was higher with plateau calculation, as the SD was greater compared to AUC calculation for 5 AAs over the 6 AAs presented, for both proteins. Furthermore, the correlations between dual tracer and direct methods were greater when dual tracer method was carried out using AUC calculation rather than plateau. Whereas the results we obtained in our experimental conditions would favor the AUC calculation, we can notice that in the study of Van der Wielen *et al*., where the AUC was used, unreliable AA digestibility was also reported [39]. Although the transaminations induced by the use of ^{15}N labelling instead of ^{2}H could explain the discrepancies, it is also possible that a stable plateau all along the kinetic is a necessary condition for dual tracer method. Indeed, the delay between

^{13}C and ^{2}H absorption may trigger a difference in splanchnic extraction of AAs that is variable depending on the test meals, an effect that could be offset with long feeding repeated meals.

Another specificity of our study is that the reference "protein" for dual tracer method was a free AAs mixture labelled with ^{13}C, unlike the studies mentioned above that all used ^{13}C spirulina. The FAO recommended the use of a highly digestible protein and proposed ^{13}C spirulina as an option [17]. Free AAs are supposed to be 100% digestible. The mean ileal digestibility that we obtained for the free AAs reference was indeed high and did not vary with the protein source (98% in both pea protein and casein groups). In comparison, mean AA digestibility of ^{13}C spirulina was found to be 85% when determined against ^{2}H free AAs reference with the dual tracer method [31] and the values varied from 41% for proline to 95% for phenylalanine. As the interindividual variability is inversely associated with digestibility [5] and because the digestibility of the reference "protein" is supposed to be assessed only once and applied to other studies, we consider that the use of a free AAs mix as the reference is preferable than spirulina. Nevertheless, the use of free AAs as a reference was also evaluated in Kashyap *et al*. study on the digestibility of legumes in adults [33]. ^{13}C algal AAs were tested as an alternative to spirulina and the digestibility of the legumes was unchanged (for mung bean, 64% vs 63% using algal AA and spirulina, respectively).

Considering our study and the previous one implementing this method, the interindividual and inter-study variability must be pointed out. With the dual tracer method, we found a SD varying from 2.0 to 6.6 depending on the calculation method and on the protein, whereas with direct ileal measurement the SD was 0.8 for casein and 1.5 for pea. In Kashyap *et al*. study, the mean AA ileal digestibility of yellow pea flour, evaluated in 3 healthy Indian adults with the dual tracer method, was 71.6 ± 1.3% [33]. However, in 12 moderately stunted Indian children, the same team reported a much higher and highly variable value (86.0 ± 11.2%) [34]. For boiled whole egg proteins, mean AA digestibility was 89.4 ± 4.5% with the dual tracer method [32], which is comparable to the digestibility of whole egg ^{15}N protein reported in ileostomates (90.9 ± 1.8%) by Evenepoel *et al*. [9], but with a higher interindividual variability.

A major question concerning the results we obtained with dual tracer method is the difference between pea protein and casein, that were reversed compared to ileal digestibility. AA absorption rate was higher for pea protein as compared to casein, whereas ileal digestibility measured using direct method was higher for casein, in accordance with previous studies. This result might be explained by a different metabolization of the dietary AAs in the postprandial phase between the AAs from casein and pea protein. Indeed, casein is known as a slow protein and we found a 1-h delay in the kinetic of

dietary N appearance at the ileum level (Guillin *et al*., ongoing submission*). Furthermore, the protein source may have affected the postprandial metabolism of the free AAs. Surprisingly, the production of $^{13}CO_2$ in exhaled air was higher after the ingestion of casein as compared to pea protein. It might reflect a greater oxidation of absorbed free AAs in the case of casein and could have resulted in lower plasma AA ratios in the dual tracer evaluation of digestibility, leading to a lower digestibility. Complementary analyses would be necessary to clarify this point. One important assumption of the dual tracer method is that the AAs from the test protein and the AAs from the reference share the same post-digestive fate [16]. In other words, the plasmatic concentration of the AAs from the test protein and the AAs from the reference must be influenced only by differences in digestibility and not by differences in metabolic utilization. Given our results, in our experimental conditions, this assumption might be not fully respected.

In conclusion, the results we obtained in the study are encouraging, as some AA digestibilities were close to the values obtained with the conventional ileal method. With further research and validation, especially regarding the repeated meal procedure, this method could offer an alternative to the invasive intubation technique. The implications would be the possibility to study populations of various ages and physiological states, a current issue in the evaluation of protein digestibility in humans.

Acknowledgments

We thank Marie-Claude Amard, Bruna Rodriguez, and Romain Tessier from UMR PNCA, as well as our interns Marie Jozwiak, Grégoire Soghomonian and Maximilien Etheve for their contribution to the clinical trial.

Financial support

The project was funded by Roquette.

Conflict of interest

C.G., N.K., G.A., R.B., P.H.P., J.M. and J.C. declare that they have no conflict of interest. F.G., L.G.D. and C.L.M. are employed by Roquette.

* Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, Lefranc-Millot C, Airinei G, Khodorova N, Benamouzig R, Pomport PH, Martin J, Calvez J. Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans (ongoing submission)

Authorship

The authors' responsibilities were as follows: C.G., J.C., L.G.D., C.L.M. and R.B. contributed to the conception and design of the study; F.G., J.C., G.A. and N.K. conducted the research; P.H.P. and J.M. carried out the labelling of proteins; F.G. and J.C. analyzed the data; F.G. wrote the original draft of the paper; J.C., C.G., L.G.D., and C.L.M. reviewed and edited the manuscript; C.G. administered the project; and all authors read and approved the final manuscript.

References

(1) Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, Weltgesundheitsorganisation, FAO, et al., 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.

(2) Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. Br J Nutr 2012;108(S2):S238–46.

(3) Levesque CL, Moehn S, Pencharz PB, et al. Review of advances in metabolic bioavailability of amino acids. Livest Sci 2010;133(1–3):4–9.

(4) Millward DJ, Layman DK, Tomé D, et al. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. Am J Clin Nutr 2008;87(5):1576S–1581S.

(5) Gaudichon C, Calvez J. Determinants of amino acid bioavailability from ingested protein in relation to gut health. 2020;24(1):7.

(6) Moughan PJ. Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. Nutr Res Rev 2003;16(2):127–41.

(7) Report of an FAO expert consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

(8) Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. Pharmacol Res 2013;68(1):95–107.

(9) Evenepoel P, Geypens B, Luypaerts A, et al. Digestibility of Cooked and Raw Egg Protein in Humans as Assessed by Stable Isotope Techniques. J Nutr 1998;128(10):1716–22.

(10) Moughan PJ, Butts CA, van Wijk H, et al. An acute ileal amino acid digestibility assay is a valid procedure for use in human ileostomates. J Nutr 2005;135(3):404–9.

(11) Fuller MF, Tomé D. In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. J AOAC Int 2005;88(3):923–34.

(12) Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, et al. 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(01):29.

(13) Gaudichon C, Bos C, Morens C, et al. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. Gastroenterology 2002;123(1):50–9.

(14) Calvez J, Benoit S, Piedcoq J, et al. Very low ileal nitrogen and amino acid digestibility of zein compared to whey protein isolate in healthy volunteers. Am J Clin Nutr 2020;nqaa274.

(15) Deglaire A, Bos C, Tomé D, et al. Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. Br J Nutr 2009;102(12):1752–9.

(16) Moughan PJ, Wolfe RR. Determination of Dietary Amino Acid Digestibility in Humans. J Nutr 2019;

(17) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a FAO Expert Working Group. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods, 2-5 March 2014, Bangalore, India. 2014.

(18) Tomé D, Jahoor F, Kurpad A, et al. Current issues in determining dietary protein quality and metabolic utilization. Eur J Clin Nutr 2014;68(5):537–8.

(19) Gorissen SHM, Trommelen J, Kouw IWK, et al. Protein Type, Protein Dose, and Age Modulate Dietary Protein Digestion and Phenylalanine Absorption Kinetics and Plasma Phenylalanine Availability in Humans. J Nutr 2020;150(8):2041–50.

(20) Liu J, Klebach M, Visser M, et al. Amino Acid Availability of a Dairy and Vegetable Protein Blend Compared to Single Casein, Whey, Soy, and Pea Proteins: A Double-Blind, Cross-Over Trial. Nutrients 2019;11(11):2613.

(21) Vangsoe M, Thogersen R, Bertram H, et al. Ingestion of Insect Protein Isolate Enhances Blood Amino Acid Concentrations Similar to Soy Protein in A Human Trial. Nutrients 2018;10(10):1357.

(22) Nicolas Gausserès, Sylvain Mahé, Robert Benamouzig, et al. [15N]-Labeled Pea Flour Protein Nitrogen Exhibits Good Ileal Digestibility and Postprandial Retention in Humans. Am Soc Nutr Sci 1997;22:3166–97.

(23) Mariotti F, Pueyo ME, Tome D, et al. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. 2001;131:1706–1713.

(24) Bos C, Airinei G, Mariotti F, et al. The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. J Nutr 2007;137(3):594–600.

(25) Oberli M, Marsset-Baglieri A, Airinei 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(10):2221–8.

(26) Fromentin C, Sanders P, Nau F, et al. A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with 15N and 13C. Rapid Commun Mass Spectrom 2012;26(1):43–8.

(27) Magali Lacroix, Cécile Bos, Joëlle Léonil, 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.

(28) Geboes KP, Bammens B, Luypaerts A, et al. Validation of a New Test Meal for a Protein Digestion Breath Test in Humans. J Nutr 2004;134(4):806–10.

(29) Rutherfurd SM, Moughan PJ. Available versus digestible dietary amino acids. Br J Nutr 2012;108(S2):S298–305.

(30) Engelen MPKJ, Com G, Anderson PJ, et al. New stable isotope method to measure protein digestibility and response to pancreatic enzyme intake in cystic fibrosis. Clin Nutr 2014;33(6):1024–32.

(31) Devi S, Varkey A, Sheshshayee MS, et al. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. Am J Clin Nutr 2018;107(6):984–991.

(32) Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, et al. 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(5):980–7.

(33) Kashyap S, Varkey A, Shivakumar N, et al. True ileal digestibility of legumes determined by dual-isotope tracer method in Indian adults. Am J Clin Nutr 2019;110(4):873–82.

(34) Devi S, Varkey A, Dharmar M, et al. 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;150(5):1178–85.

(35) Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, et al. Co-ingestion of Black Tea Reduces the Indispensable Amino Acid Digestibility of Hens' Egg in Indian Adults. J Nutr 2019;149(8):1363–8.

(36) Hyden S. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. K Lantbrukshogskolans Ann 1956;22:139–45.

(37) Webb KE. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. J Anim Sci 1990;68(9):3011–22.

(38) Miner-Williams WM, Stevens BR, Moughan PJ. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? Nutr Res Rev 2014;27(2):308–29.

(39) van der Wielen N, Khodorova NV, Gerrits WJJ, et al. Blood 15N:13C Enrichment Ratios Are Proportional to the Ingested Quantity of Protein with the Dual-Tracer Approach for Determining Amino Acid Bioavailability in Humans. J Nutr 2020;150(9):2346–52.

Supplemental data

Supplemental table 1. AA composition and ^{13}C enrichment of algal free AA mixture, used as the reference for dual tracer method

	AA content (mmol/g)	^{13}C enrichment (AP)
Alanine	1.08	99
Arginine	0.21	98
Asparagine	0.39	99
Glutamine	0.71	99
Glycine	0.85	99
Histidine	0.06	98
Isoleucine	0.62	97.5
Leucine	0.91	99
Lysine	0.17	99
Methionine	0.10	99
Phenylalanine	0.48	99
Proline	0.29	99
Serine	0.25	95
Threonine	0.45	98
Tyrosine	0.07	97
Valine	0.81	99

AA: amino acid

CHAPITRE 3 – DISCUSSION

1. Qualité nutritionnelle de la protéine de pois et comparaison à d'autres sources

Composition en acides aminés

La qualité nutritionnelle d'une protéine est définie en premier lieu par sa composition en AAI. Le **Tableau 17** répertorie la concentration en AAI des isolats protéiques de pois et de caséine utilisés dans le cadre de ces travaux, selon l'étude menée. Les protéines purifiées étudiées dans nos expérimentations animales étaient d'origine industrielle. Les isolats de l'étude clinique ont été produits spécifiquement pour l'étude, afin d'être doublement marqués au ^{15}N et au ^{2}H. Malgré leur origine différente, le profil en AAI des protéines était globalement identique, mais on constate une plus faible teneur en leucine, isoleucine et AAA dans l'isolat utilisé pour les études animales. La teneur en lysine était aussi plus faible dans la caséine d'origine industrielle que dans la caséine produite à façon. Cela pourrait s'expliquer par des différences dans les traitements thermiques appliqués sur les isolats au cours de leur production, la lysine étant l'AA le plus impliqué dans la réaction de Maillard [194,312]. En effet, la fonction NH_2 de la lysine, particulièrement exposée, est susceptible de réagir avec le groupement carbonyle des sucres réducteurs sous l'effet de la chaleur [313]. La teneur en méthionine de la protéine de pois était deux fois plus faible que celle de la caséine, et également inférieure à celle du gluten de blé, étudié lors des expérimentations chez le rat (15,6 vs 12,1 mg/g de protéine pour le gluten et la protéine de pois, respectivement). Néanmoins, grâce à une concentration élevée en cystéine, la teneur en acides aminés soufrés (AAS) de la protéine de pois correspond à la valeur du profil de référence pour les individus âgés de plus de 3 ans (enfants, adolescents, adultes) défini par la FAO, et fixé à 23 mg/g de protéine [34]. La composition de la protéine de pois lui permettrait de satisfaire les besoins en AAI de cette tranche d'âge, tout comme celle de la caséine, ce qui est visible au travers de leur score chimique supérieur à 1 (**Tableau 17**). La teneur en AAI la plus faible, exprimée relativement au besoin, est celle des AAS, pour les deux protéines.

Tableau 17. Composition en acides aminés indispensables et score chimique des isolats de protéines de pois et de caséine étudiés dans le cadre des travaux de thèse

(mg/g protéine) [1]	Etudes animales		Etude clinique		Profil de réf. [6]
	Protéine de pois [2]	Caséine [3]	Protéine de pois [4]	Caséine [5]	
Histidine	24,7	26,8	24,0	25,3	16
Isoleucine	46,2	48,9	53,1	55,5	30
Leucine	81,0	91,0	83,7	97,4	61
Lysine	71,1	75,6	81,6	88,4	48
AAS [7]	23,4	33,6	24,5	34,0	23
dont Méthionine	12,1	28,6	12,6	28,9	-
AAA [8]	91,4	99,6	97,2	106,1	41
Thréonine	35,7	40,8	39,9	46,1	25
Valine	52,8	64,6	51,6	64,5	40
Score chimique	1,02 (AAS)	1,46 (AAS)	1,06 (AAS)	1,48 (AAS)	-

AAA : acides aminés aromatiques, AAS : acides aminés soufrés

[1] Valeur moyenne sur 3 échantillons dosés par U-HPLC. Quantité de protéine calculée avec le facteur de conversion azote-protéine 6,25.

[2] NUTRALYS® S85F (Roquette), source industrielle

[3] PRODIET® 85B (Ingredia), source industrielle

[4] Micro-culture spécifique à l'étude (INRAE, Unité expérimentale du domaine d'Epoisses, Bretenière)

[5] Production spécifique à l'étude (AgroParisTech, Ferme expérimentale, Thiverval-Grignon)

[6] Profil de référence en AAI des individus de 3 ans et plus [34]

[7] Méthionine + cystéine

[8] Phénylalanine + tyrosine

Digestibilité

Nos travaux ont permis d'évaluer la digestibilité de la protéine de pois en modèle animal et chez l'Homme et à différents niveaux de mesure, à savoir la digestibilité fécale de l'azote, la digestibilité iléale de l'azote, et la digestibilité iléale des AA. La protéine de pois a également été comparée à d'autres sources protéiques : la caséine de lait, une référence en termes de qualité nutritionnelle réputée hautement digestible, et le gluten de blé, une source de protéine végétale également très digestible. Le **Tableau 18** répertorie l'ensemble des digestibilités vraies obtenues pour la protéine de pois et la caséine chez le rat et chez l'Homme.

La digestibilité fécale vraie de l'azote, évaluée chez le rat sur 2 jours par l'intermédiaire de cages métaboliques (Article 1), a atteint 96% pour la protéine de pois. Elle était supérieure à la digestibilité fécale de la caséine (94%) et similaire à celle du gluten (96%). Les résultats étaient comparables à ceux d'une étude évaluant le même isolat de pois [211], bien que la différence avec la caséine ait été surprenante. La faible digestibilité obtenue pour la caséine pourrait provenir de la méthode d'estimation des pertes endogènes, dans un groupe indépendant (cf. Discussion, paragraphe 2.). La digestibilité fécale présente des limites, en étant notamment influencée par l'activité métabolique du microbiote colique sur les AA alimentaires non absorbés [36]. De plus, la FAO recommande d'évaluer la digestibilité individuellement pour chaque AA [34]. Ainsi, nos travaux se sont concentrés sur la mesure de la digestibilité iléale des AA.

Chez le rat, la digestibilité iléale a été approximée par la mesure des pertes d'AA au niveau cæcal. La valeur moyenne sur l'ensemble des AA, pondérée par la teneur en AA des isolats protéiques testés, a été évaluée à 95% pour la protéine de pois, 87% pour la caséine, et 94% pour le gluten (Article 1). La digestibilité particulièrement faible obtenue une nouvelle fois pour la caséine a renforcé l'hypothèse d'un biais méthodologique dans la différenciation entre les pertes endogènes et exogènes d'azote et d'AA. En effet, la littérature rapporte pour la caséine des digestibilités iléales des AA de 94% [122] et 96% [127] chez le rat, et de 97% chez le porc [174]. Par ailleurs, les digestibilités iléales de l'azote étaient légèrement inférieures aux valeurs fécales (**Tableau 17**). Ce résultat est en accord avec la littérature, qui décrit une surestimation de la mesure au niveau fécal [122,247], l'écart étant d'autant plus important pour les protéines peu digestibles [73]. En revanche, l'écart était ici plus marqué pour la caséine par rapport à la protéine de pois. Chez l'Homme, la digestibilité iléale de l'azote pour la protéine de pois était de 92,0%, sans différence significative avec la caséine, digestible à 94,0% (Article 3). Ces résultats étaient légèrement supérieurs à ceux trouvés dans les mêmes conditions expérimentales chez l'Homme. Les travaux de Gausserès *et al.* et Mariotti *et al.* rapportent respectivement une digestibilité iléale de l'azote de 89,4% pour la farine de pois [177] et de 89,9% [154] pour l'isolat de protéine de pois. Les différences de 2,5% et 2% avec nos résultats pourraient provenir des différences dans les protocoles de repas suivis (repas unique vs repas multiples dans notre étude, cf. paragraphe 2.), l'ingestion de petites doses de protéines pouvant améliorer l'efficacité digestive par rapport à une dose massive. En comparaison à d'autres légumineuses, la digestibilité iléale de l'azote que nous avons obtenue pour la protéine de pois était proche de celles du soja et du lupin (91,5% [52] et 91,0% [156], respectivement), déterminées aussi dans des conditions comparables. Pour la caséine, Deglaire *et al*. décrivaient une digestibilité iléale de 94,1% [174], identique à celle retrouvée dans notre étude. La digestibilité iléale moyenne des AA mesurée chez l'Homme était de 93,6% et 96,8% pour la protéine de pois et la caséine, respectivement (Article 3). Malgré des différences de digestibilité individuelle

obtenues pour un grand nombre d'AA, la valeur moyenne sur l'ensemble des AA n'était pas significativement différente entre les deux protéines. La moyenne étant pondérée par la composition en AA des protéines, ce résultat s'explique par la contribution majoritaire du glutamate, pour lequel la digestibilité n'était pas différente entre les deux sources. Malgré une digestibilité des AAI plus faible que la caséine, la digestibilité globale élevée de la protéine de pois et proche de celle de la caséine démontre son potentiel à être considérée comme une protéine de haute qualité nutritionnelle. A titre de comparaison, la digestibilité iléale moyenne des AA de protéines végétales déterminée dans d'autres études chez l'Homme par la même méthode directe d'intubation naso-iléale était comparable pour l'isolat de protéine de soja (93,8% [123]) et bien inférieure pour la zéine (63,0% [157]).
Nous avons aussi constaté dans notre étude clinique que la digestibilité globale de l'azote était inférieure à la digestibilité moyenne des AA, la différence étant plus marquée pour la caséine (+2,9% pour la caséine vs +1,8% pour le pois). Outre les différences de méthodes analytiques, ce décalage pourrait s'expliquer par la part d'azote alimentaire non protéique retrouvée dans l'iléon terminal, menant à une sous-estimation de la digestibilité de l'azote. L'azote non protéique a été calculé théoriquement par différence entre l'azote total et l'azote issu du dosage des AA dans les protéines, et représentait respectivement 0,1% et 3,3% de l'azote total pour la protéine de pois et la caséine. Cette fraction plus importante pour la caséine pourrait justifier la plus grande différence entre les digestibilités de l'azote et des AA pour la caséine. Par ailleurs, les digestibilités de la protéine de pois étaient plus élevées chez le rat que chez l'Homme (**Tableau 18**), mais la variabilité était bien plus importante. Il a été montré que le rat présentait une meilleure capacité que l'Homme à digérer certaines protéines peu digestibles, comme la protéine de colza [152,262]. Par conséquent, dans le cas d'une utilisation de ces données pour la nutrition humaine, il est nécessaire d'envisager que la digestibilité des AA obtenue chez le rat puisse être surestimée.

Chez l'Homme, le marquage au ^{15}N des protéines alimentaires a aussi permis de déterminer les pertes endogènes iléales individuelles, par différence avec les pertes azotées totales. Elles étaient similaires aux valeurs retrouvées dans la littérature, et étaient plus élevées chez les volontaires ayant reçu la protéine de pois que chez ceux du groupe caséine. En effet, les pertes endogènes totales générées après ingestion de la protéine de pois étaient de 48,5 mmol N, contre les 51,4 mmol N rapportées par l'étude de Mariotti *et al*. pour un isolat de pois [154]. Pour la caséine, les pertes endogènes sur les 8 heures suivant ingestion étaient de 36,1 mmol N, alors que Gaudichon *et al*. relevaient une valeur de 39,0 mmol N, dans des conditions expérimentales similaires [123]. Il a été montré que les sécrétions endogènes étaient modulées par la composition du régime et la source de protéine [281], et qu'elles pouvaient être stimulées par la présence de facteurs antinutritionnels, comme les inhibiteurs de la trypsine [73,87,287]. Ainsi, la présence de facteurs antinutritionnels résiduels dans la protéine de pois,

malgré la forme purifiée de l'isolat, a pu augmenter les sécrétions endogènes. Ce résultat est cohérent avec l'étude de Gaudichon *et al.*, où l'ingestion de protéines de soja chez l'Homme avait induit un débit iléal azoté plus élevé que l'ingestion de protéines de lait, par une contribution plus importante des pertes d'acides aminés endogènes [123].

Tableau 18. Digestibilités vraies de l'azote et des AA obtenues pour la protéine pois et la caséine au cours des expérimentations animale et clinique des travaux de thèse

(%)	Protéine de pois		Caséine	
	Rat [1]	Homme [3]	Rat [1]	Homme [3]
N fécale	96,0 ± 1,0	-	93,7 ± 1,1	-
N iléale [2]	95,0 ± 4,5	92,0 ± 2,7	91,6 ± 4,3	94,0 ± 1,7
AAI				
Histidine	96,4 ± 2,7		94,7 ± 2,4	
Isoleucine	93,4 ± 3,8	92,9 ± 3,8	79,3 ± 5,7	94,4 ± 2,2
Leucine	93,7 ± 3,8	94,4 ± 2,8	92,8 ± 2,6	98,6 ± 0,4
Phénylalanine	95,0 ± 3,0	94,6 ± 2,8	94,9 ± 2,3	99,2 ± 0,3
Lysine	95,6 ± 3,3	93,9 ± 2,6	93,3 ± 2,2	98,0 ± 0,5
Thréonine	92,2 ± 5,5	91,8 ± 4,0	87,7 ± 4,7	94,6 ± 1,3
Tyrosine	93,6 ± 4,7	-	94,9 ± 2,3	-
Valine	93,1 ± 4,3	92,5 ± 3,8	86,3 ± 4,3	96,1 ± 1,3
Méthionine	84,2 ± 9,7	93,9 ± 5,2	89,6 ± 4,8	98,3 ± 0,9
Cystéine	90,1 ± 11,6	-	91,7 ± 8,2	-
AANI				
Alanine	92,8 ± 5,7	92,7 ± 3,9	85,4 ± 6,0	96,1 ± 1,3
Asx	95,6 ± 3,6	93,0 ± 2,9	86,7 ± 5,2	96,4 ± 1,2
Glx	96,0 ± 3,3	95,8 ± 2,0	84,7 ± 4,4	95,9 ± 1,8
Proline	-	92,3 ± 3,2	-	97,7 ± 0,5
Sérine	93,8 ± 6,0	-	73,0 ± 5,7	-
Glycine	-	90,2 ± 3,7	-	95,2 ± 1,4
Arginine	96,9 ± 2,7	-	91,2 ± 3,8	-
Moy AA	94,6 ± 4,1	93,6 ± 2,9	87,0 ± 5,0	96,8 ± 1,0

AAI : acide aminé indispensable, AANI : acide aminé non indispensable, Asx : asparagine + aspartate, Glx : glutamine + glutamate

Les valeurs sont les moyennes ± ET (n = 9 chez le rat, n = 8 et 7 chez l'Homme pour la protéine de pois et la caséine, respectivement).

[1] Article 1

[2] Article 2

[3] Article 3

DIAAS et PDCAAS

Les données de digestibilité iléale des AA combinées au score chimique ont permis de calculer le DIAAS. Chez le rat, le DIAAS de la protéine de pois était de 0,88, contre 1,29 pour la caséine (Article 1). Malgré la composition équilibrée de la protéine de pois, répondant aux besoins en AA des individus âgés de plus de 3 ans [34], la faible digestibilité obtenue pour les AAS (87%) a mené à un DIAAS inférieur à 1. Les valeurs obtenues étaient comparables à l'étude de Rutherfurd *et al*. chez le rat, où le DIAAS était de 0,82 pour l'isolat de protéine de pois et de 1,18 pour la protéine de lait totale [122] (composée à environ 80% de caséine [314]). Cependant, le profil de référence utilisé était celui de l'enfant de 0,5 à 3 ans, plus exigeant que celui des individus de 3 ans et plus [34]. Les DIAAS que nous aurions obtenus à partir du même profil auraient été de 0,75 et 1,14 pour la protéine de pois et la caséine, respectivement. Nos résultats de DIAAS pour le pois sont en revanche plus élevés que ceux rapportés chez le porc avec le même profil de référence, évalués à 0,73 pour un concentré protéique de pois [124] et 0,60 pour une émulsion de protéines de pois [175]. En ce qui concerne la caséine, des résultats similaires sont décrits chez le porc (1,41 pour la protéine de lait totale [124]). En comparaison, l'isolat de soja obtenait un DIAAS de 0,90 chez le rat (calculé avec le profil enfant 0,5-3 ans) [122], et de 0,98 chez le porc [124] (profil > 3 ans). Le DIAAS du gluten a été évalué à 0,25 au cours de notre étude chez le rat, sa faible valeur s'expliquant par son déficit en lysine (Article 1). Des faibles valeurs de DIAAS sont également retrouvées pour le blé dans des études chez le rat (0,20 pour le pain [172], 0,41 pour le son [122], profil 0,5-3 ans). Outre les légumineuses, d'autres sources végétales ont un DIAAS plus élevé que celui des céréales chez le rat, comme le concentrat de protéines de tournesol (0,84 [184], profil > 3 ans) et le sarrasin (0,68 [172], profil 0,5-3 ans). Chez l'Homme, nos travaux ont évalué le DIAAS à 1,00 pour la protéine de pois et à 1,45 pour la caséine (Article 3), calculés à partir du profil de référence 3 ans et plus [34]. Les ratios les plus faibles, qui ont donc fixé la valeur du DIAAS, étaient ceux des AAS pour les deux sources. Les valeurs de DIAAS étaient supérieures à celles obtenues en modèle rat, ce qui s'expliquait par une meilleure digestibilité des AAS chez l'Homme (**Tableau 18**).

Chez le rat, la supplémentation de la protéine de pois en méthionine à hauteur de la concentration en méthionine de la caséine (ajout de 18 mg Met/g protéine) avait pour objectif d'augmenter le score chimique, visible également par l'évolution du DIAAS de 0,88 à 1,10 (Article 1). La supplémentation en AA peut en effet être envisagée comme stratégie pour améliorer la qualité nutritionnelle d'une source protéique, par augmentation de son score chimique [181,315]. Chez le rat, le PDCAAS a été évalué à partir de la digestibilité fécale de l'azote et était supérieur au DIAAS (1,02, 1,43 et 0,32 pour la protéine de pois, la caséine et le gluten, respectivement, Article 1). Ce résultat est cohérent avec la littérature [122,124] et découle de la différence entre les mesures iléale et fécale de la digestibilité.

Le facteur de conversion azote-protéine de 6,25 a été utilisé pour estimer la teneur en protéines lors du calcul du DIAAS et du PDCAAS. Cette valeur standard est basée sur l'hypothèse selon laquelle les protéines contiendraient 16% d'azote. En réalité, cette teneur varie selon les sources de protéines [221]. Afin d'évaluer l'influence du facteur de conversion, le DIAAS a été recalculé chez l'Homme à partir des coefficients spécifiques, définis pour chaque protéine. Les facteurs spécifiques de 5,4 et 6,15 ont été appliqués pour le pois et la caséine [222–226], correspondant à une teneur en azote dans les protéines de 18,5% et 16,3%, respectivement. Les DIAAS obtenus étaient de 1,16 pour le pois et 1,48 pour la caséine. Ces résultats étaient supérieurs aux valeurs d'origine et la différence était plus élevée pour le pois, en accord avec la littérature, qui stipule que le facteur 6,25 désavantage particulièrement les protéines végétales [229]. D'après les résultats de notre étude clinique, le DIAAS élevé de la protéine de pois lui permettrait d'être qualifiée de protéine de haute qualité nutritionnelle, d'après les critères d'allégation définis par la FAO [34].

Rétention azotée

L'efficacité de l'utilisation métabolique des protéines après absorption a été évaluée par le calcul de l'UPPN chez l'Homme. L'UPPN obtenue pour la protéine de pois (71,6%) n'était pas différente par rapport à la caséine (71,2%), ce qui suggère une utilisation de l'azote après ingestion comparable entre les deux sources. Aucune différence dans les cinétiques de transfert de l'azote alimentaire dans l'urée corporelle et urinaire n'a été relevée entre les protéines. De plus, les valeurs d'UPPN étaient cohérentes avec celles rapportées par d'autres études chez l'Homme (70,9% pour un isolat de protéines de pois [154], 78% [133] et 71% [81] pour la caséine). La modification du protocole d'ingestion habituel que nous avons effectuée, i.e. des repas multiples à la place d'un bolus, a pu expliquer les écarts obtenus.

Capacité à soutenir la croissance

Le PER a été décrit pour la première fois par Osborne *et al*. [316] et fut la première méthode développée pour évaluer la qualité nutritionnelle des protéines [34]. Il vise à mesurer l'efficacité de l'utilisation des protéines alimentaires pour la croissance chez le rat, en se basant sur l'augmentation du poids corporel sur 28 jours. La caséine, dont le PER est de 2,50, sert de référence pour comparer les sources protéiques entre elles. Le classement qui en résulte n'est pas proportionnel, la qualité d'une protéine de PER 2 n'étant pas le double d'une protéine de PER 1 [317]. Dans nos travaux, le PER a été évalué chez le rat en croissance à 1,14 pour la protéine de pois, 2,55 pour la caséine et 0,47 pour le gluten (Article 1). La valeur obtenue pour la caséine était conforme à la valeur standard de 2,50. Le PER de la protéine de pois était plus faible que le PER du pois jaune évalué par Nosworthy *et al*. à 1,42 [150]. Le PER de la protéine de pois était deux fois plus élevé que le PER du gluten, ce qui indique sa plus grande efficacité

à soutenir la croissance. Le déficit en lysine du gluten de blé est plus marqué que la faible teneur en AAS du pois, visible par leur score chimique respectif (SC = 1,02 pour la protéine de pois vs SC = 0,32 pour le gluten), ce qui explique la différence élevée entre les PER. Une supplémentation en méthionine a permis à la protéine de pois d'atteindre un PER identique à celui de la caséine. Le faible PER de la protéine de pois peut donc être attribué uniquement à sa faible teneur en méthionine. Ce résultat confirme la conclusion de Bajaj *et al*. sur l'existence d'une corrélation positive entre la teneur en albumine du pois vert et le PER, du fait de sa concentration plus élevée en AAS par rapport à la globuline [318]. Nos résultats suggèrent un fort potentiel du pois à voir sa qualité nutritionnelle améliorée par la supplémentation en méthionine ou la combinaison avec des protéines riches en méthionine. L'effet d'un mix légumineuse-céréale a été testé au cours de la même étude (Article 1). La combinaison de la protéine de pois avec le gluten (80%/20%, SC = 1) a permis d'augmenter le PER des deux sources mesurées individuellement, mais n'était pas suffisante pour atteindre la valeur de la caséine et du pois supplémenté en méthionine. En effet, la teneur en AAS du gluten est inférieure à celle de la caséine, et la combinaison aurait été plus efficace avec une céréale de teneur en méthionine plus élevée, comme le millet ou certaines variétés de riz [144]. Plus largement, d'autres sources végétales riches en méthionine pourraient également être envisagées pour une complémentation, comme le chanvre, certaines noix (Brésil) ou graines (chia, sésame) [319].

La détermination du PER a l'avantage d'être mis en œuvre à faible coût, de facilement mettre en évidence les protéines de moindre qualité, et de disposer d'un protocole standardisé [130]. Au Canada, le PER en modèle rat est encore la méthode officielle pour évaluer la qualité nutritionnelle des aliments [131]. Il est utilisé pour la formulation des préparations infantiles, au Canada comme aux États-Unis [320]. Cependant, l'étude du PER se heurte à des limites, la principale étant le manque de représentativité de l'Homme adulte [317]. Le PER sous-estime généralement la qualité des sources végétales pour la nutrition humaine et surestime celle des sources animales, en raison des besoins en AAI plus élevés chez le rat en croissance par rapport à l'adulte [59]. En effet, au cours des stades physiologiques où la croissance est la plus rapide, le besoin de maintenance peut ne représenter que 10% des besoins en AA [321], le reste provenant des besoins spécifiques de croissance. De plus, le besoin en AAS est plus élevé chez le rat par rapport à l'Homme [322,323], ce qui défavorise d'avantage les protéines de légumineuses.

Résumé qualité nutritionnelle de la protéine de pois

– –

La protéine de pois a obtenu une digestibilité élevée, chez le rat comme chez l'Homme. Sa faible teneur en méthionine pourrait limiter son adéquation aux besoins au vu du faible PER obtenu chez le rat. Cependant, sa composition globale en AA soufrés satisfait les besoins de l'Homme adulte tels que définis par les profils de la FAO, formulés à partir des besoins de 2007. Sa qualité nutritionnelle pourrait être facilement améliorée par la combinaison avec des sources protéiques riches en méthionine, comme certaines céréales ou noix. La composition en AA équilibrée de la protéine de pois couplée à sa haute digestibilité a abouti à des scores de DIAAS et de PDCAAS la positionnant en tant que protéine de haute qualité nutritionnelle pour l'Homme. Sa comparaison à la caséine de lait et au gluten de blé au cours de nos études démontre également son potentiel pour la nutrition humaine.

2. Méthodologie d'évaluation de la digestibilité iléale des protéines chez le rat

Digestibilité cæcale et marqueur non-absorbable

Le rat de laboratoire est le modèle le plus simple pour évaluer la digestibilité iléale *in vivo* et il est largement utilisé en pratique [254]. Toutefois, les digesta ne peuvent pas être collectés en continu au moyen d'une canule intestinale ou de techniques d'iléostomie, comme c'est le cas chez le porc. Le contenu digestif doit être prélevé à un temps donné après l'ingestion du repas, et la collecte des pertes digestive ne peut donc pas être exhaustive. Pour corriger le recueil incomplet des digesta, un marqueur non-absorbable est généralement utilisé. Il doit être entièrement indigestible et sa récupération dans l'ensemble du tube digestif doit idéalement être totale [324]. Les marqueurs couramment utilisés sont l'oxyde de chrome (Cr_2O_3), le dioxyde de titane (TiO_2), et les cendres insolubles dans l'acide (AIA) [35]. Cependant, le taux de récupération peut varier selon le marqueur [325,326] et être sensiblement inférieur à 100% [261,324,327]. En effet, dans une étude chez l'Homme iléostomisé où le recueil des digesta est supposé exhaustif, la récupération du marqueur Cr_2O_3 n'était pourtant que de 60% [176]. Chez le porc canulé, Jagger *et al*. relevaient une récupération du Cr_2O_3 de 75% [324]. Une forte variabilité peut également être observée pour un même marqueur (de 94% à 106% pour le Cr_2O_3, d'après une autre étude chez le porc [261]). Une technique alternative consiste à évaluer la digestibilité au niveau cæcal à la place de la mesure iléale [81]. Par son volume important, le cæcum du rat accumule les digesta en sortie d'intestin grêle [328]. Sous l'hypothèse que la majeure partie des pertes d'azote et d'AA alimentaires peut être récupérée dans le cæcum après un temps de digestion approprié, la mesure peut dispenser de l'utilisation d'un marqueur indigestible. Le contenu iléal est également pris en compte dans la mesure des pertes digestives, lorsque la quantité collectée est suffisante pour les besoins analytiques. En revanche, les AA alimentaires qui se trouveraient dans l'intestin grêle et le côlon ne peuvent pas être pris en compte dans les calculs, le devenir du contenu du grêle étant incertain (destiné à être absorbé ou perdu), et le contenu du côlon étant modifié par le microbiote [36]. Pour que la méthode cæcale soit fiable, la teneur en AA alimentaires dans ces deux segments doit être la plus faible possible, d'où l'importance du choix de l'heure de recueil des échantillons. D'après plusieurs études, la majeure partie de l'azote alimentaire est retrouvée dans le cæcum 5-6 heures après ingestion, ce qui semble être le temps optimal pour y prélever les digesta [184,329,330]. Ce taux est variable selon la nature de la protéine ingérée, les cinétiques de digestion n'étant pas équivalentes [60,134,331]. En effet, après 6 heures, le contenu d'azote alimentaire dans le segment iléon-cæcum représentait 63%, 66% et 80% de l'azote alimentaire récupéré dans la totalité du tube digestif, après ingestion respective de protéines de tournesol [170], de protéines de lactosérum [170] et de caséine

marquées au ^{15}N [329]. Dans notre étude, 80% du repas se trouvait dans l'iléon et le cæcum 6 h après ingestion pour les groupes caséine et gluten, et 65% pour le groupe protéiprive, d'après les données de récupération du Cr_2O_3. Ainsi, la durée de 5-6 heures permettrait de faire un compromis entre une digestion complète et un temps de fermentation réduit des digesta dans le cæcum.

Au cours de nos travaux chez le rat, nous avons comparé plusieurs méthodes de mesure de la digestibilité iléale vraie, selon le lieu de recueil des pertes digestives (iléon vs cæcum) et l'utilisation ou non d'un marqueur indigestible (Article 2). Le marqueur testé était le Cr_2O_3, dans le cadre de l'évaluation de la digestibilité de la protéine de pois, de la caséine et du gluten. La récupération du Cr_2O_3 était incomplète et marquée par une forte variabilité entre les groupes (25%, 81%, 68%, et 75% pour les groupes pois, caséine, gluten et protéiprive, respectivement) et interindividuelle (écarts-types entre 10% et 15%). Des études chez le porc rapportent des taux de récupération similaires pour le Cr_2O_3, de 75% [324], 60% [176], et variant de 73% et 86% [332], et témoignent de sa variabilité élevée [261,332,333]. La composition des matrices alimentaires pourrait expliquer les différences marquées entre les groupes, comme le décrivent Vicente *et al.* [334]. Dans leur étude, des échantillons homogènes (digesta duodénaux et fèces) avaient permis une distribution plus régulière des marqueurs et une minéralisation plus complète en comparaison aux échantillons hétérogènes du rumen. De plus, les rats ont ingéré le Cr_2O_3 uniquement au cours du repas test, sans suivre de période d'adaptation préalable. Il a été montré chez le porc qu'une période d'adaptation au marqueur (Cr_2O_3, TiO_2, ou AIA) de 3-4 jours était bénéfique à sa stabilisation dans le flux iléal [259]. Ainsi, la variabilité interindividuelle et intergroupe aurait peut-être été réduite en incorporant le Cr_2O_3 dans les repas pendant la phase d'habituation des rats. La complexité analytique dans le dosage du chrome par spectrophotométrie d'absorption atomique pourrait également être une source de variabilité, et pourrait notamment être à l'origine de la faible récupération du Cr_2O_3 pour le groupe pois [332,335]. En effet, la teneur en fer plus élevée dans l'isolat de protéine de pois a pu interagir avec le chrome [336] et réduire les valeurs dosées dans les digestats [337]. Par conséquent, la détermination de la digestibilité iléale par le biais du Cr_2O_3 ne semble pas optimale. Le choix du marqueur s'est porté sur le Cr_2O_3 dans notre étude, du fait de la possibilité de le doser dans un laboratoire voisin. Il serait nécessaire de tester d'autres marqueurs pour conclure sur l'efficacité de leur utilisation de manière générale. Chez le porc, des études comparant différents marqueurs suggèrent que le TiO_2 et les AIA seraient plus fiables que le Cr_2O_3 [324,333]. Chez le rat, le taux de récupération du marqueur n'est généralement pas mesuré car le recueil des digesta se limite au contenu iléal [122,172,338], à la différence de notre étude, où nous avons pu évaluer réellement l'efficacité du Cr_2O_3 et sa récupération sur l'ensemble du tractus gastro-intestinal (Article 2).

Dans nos conditions expérimentales, la comparaison entre les méthodes de mesure de la digestibilité iléale chez le rat a révélé que ni le segment sélectionné ni l'utilisation d'un marqueur non-absorbable n'avaient d'effet sur les résultats de digestibilité vraie de l'azote. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la digestibilité pourrait être évaluée dans le cæcum au lieu de l'iléon, sans utiliser de marqueur. Ce résultat est cependant à nuancer au vu de la forte variabilité dans les données finales de digestibilité, ce qui ne permet pas de mettre en évidence des différences significatives entre les méthodes. L'étude a également été limitée par la nécessité d'exclure un nombre important de rats des mesures de digestibilité (4 et 3 pour les groupes caséine et gluten, respectivement, contre 9 rats/groupe à l'origine) suite au manque de contenu iléal pour mener les analyses. La méthode cæcale a été utilisée dans des études précédentes et a donné des valeurs de digestibilité proches de celles obtenues avec un prélèvement iléal. Par exemple, la digestibilité de l'azote de l'isolat de protéine de lactosérum a été évaluée à 98,3% au niveau cæcal [329] et à 99,0% au niveau iléal chez le rat [122]. Cependant, aucune des méthodes n'est optimale et elles entraînent chacune des incertitudes car elles sont fondées sur des hypothèses qui ne peuvent pas toujours être vérifiées. Les limites de la méthode du marqueur sont liées à son taux de récupération variable et qui est souvent trop faible. En outre, ce taux n'est pas mesuré dans les études chez le rat et les interactions éventuelles avec les matrices alimentaires ne peuvent donc pas être mises en évidence. Le dosage du marqueur est analytiquement complexe à mettre en œuvre et nécessite généralement une quantité importante de digesta car ces marqueurs ont été initialement utilisés chez le porc. Or chez le rat, seulement un petit volume de contenu est disponible dans l'iléon, souvent insuffisant par rapport aux besoins analytiques [132]. La mesure cæcale sans marqueur possède aussi des limites. Elle néglige les pertes azotées alimentaires dans l'intestin grêle et le côlon, ce qui peut surestimer la digestibilité. Selon les protéines testées dans notre étude, entre 7 et 20% de l'azote ingéré se trouvait encore dans l'intestin grêle et entre 4 et 7% était passé dans le côlon. Aussi, l'activité microbienne du cæcum est réduite par rapport à celle du côlon mais existante [339,340], ce qui pourrait impacter les résultats de digestibilité des AA. Enfin, la méthode cæcale implique de doser l'azote dans l'ensemble du tube digestif, de l'estomac jusqu'au côlon, pour s'assurer notamment que seule une faible quantité d'azote alimentaire a atteint le côlon, alors que la méthode du marqueur se limite au contenu iléal.

Finalement, nos résultats suggèrent que la digestibilité cæcale vraie pourrait se rapprocher de la digestibilité iléale vraie et permettrait de se passer de l'utilisation d'un marqueur non-absorbable, à condition que la quantité d'azote dans chaque segment du tube digestif soit connue pour s'assurer que la récupération des pertes ait été complète. Le recours à la digestibilité cæcale permettrait d'éviter les biais liés à la récupération du marqueur, et offrirait plus de contenu digestif pour les analyses. Ce

dernier point serait particulièrement avantageux lorsque les protéines sont marquées, car l'analyse isotopique pour l'évaluation de la digestibilité des AA requiert des quantités importantes d'échantillon.

Estimation des pertes endogènes

Nos travaux visant à évaluer la digestibilité cæcale vraie des protéines de pois, de la caséine et du gluten chez le rat ont été confrontés à des limites méthodologiques liées à l'estimation des pertes endogènes d'azote et d'AA (Article 1). En effet, les sécrétions endogènes d'azote et d'AA sont susceptibles d'influencer fortement les mesures de digestibilité des protéines, visible par les différences entre les valeurs de digestibilités apparente et vraie relevées dans la littérature [37,341]. Les digestibilités vraies de l'azote et des AA de la caséine étaient inférieures à celles de la protéine de pois et du gluten, allant à l'encontre des données généralement rapportées dans la littérature pour les protéines de lait, de légumineuses et de céréales[122,127,166,172]. L'évaluation de la digestibilité vraie repose sur la mesure des pertes endogènes et leur retranchement des pertes totales. Plusieurs méthodes existent pour estimer les pertes endogènes, la plus courante consistant à administrer un régime protéiprive. Lorsque l'animal est sacrifié, comme c'est le cas chez le rat, il est nécessaire de constituer un groupe indépendant dédié à l'ingestion du régime exempt de protéine, et la mesure des pertes endogènes ne peut pas être individualisée (valeur unique retranchée à l'azote total de chaque animal). Au cours de notre étude, le régime protéiprive a été administré à 9 rats pendant 10 jours, pendant que les animaux des groupes protéiques étaient nourris avec leurs protéines respectives sur la même période (Article 1). L'hypothèse d'un biais dans la mesure des pertes endogènes est renforcée par la différence obtenue pour la digestibilité de la protéine de pois avec et sans supplémentation en méthionine (95% vs 88%, Article 1). En effet, la supplémentation en AA augmente le score chimique mais ne devrait pas modifier la digestibilité de la protéine. La faible digestibilité de la caséine et de la protéine de pois supplémentée pourrait s'expliquer par une sous-estimation des pertes endogènes d'azote et d'AA. En parallèle, la digestibilité plus élevée de la protéine de pois et du gluten pourrait provenir d'une adaptation métabolique des rats en réponse aux déficits respectifs en méthionine et en lysine de leur régime (Article 1).

Malgré le fait que le régime protéiprive soit une méthode de référence pour mesurer les pertes endogènes d'azote et d'AA, sa mise en œuvre chez le rat est limitée par l'impossibilité de les évaluer de manière individualisée dans les digesta et, ainsi, de ne pas prendre en compte l'effet de la source de protéines. Or, les sécrétions endogènes sont susceptibles de varier selon des paramètres liés aux individus ou aux régimes [37]. Dans notre étude, les rats nourris avec la caséine et les protéines de pois supplémentées en méthionine avaient un poids corporel plus élevé que les rats nourris aux protéines de pois seules et au gluten (Article 1). Ces poids plus élevés marquent la meilleure adéquation aux besoins nutritionnels de leurs régimes, grâce au profil en AA plus équilibré de leurs protéines. Or, une

étude chez le porc a montré que le poids corporel pouvait influencer les pertes endogènes iléales d'AA [286]. Ainsi, les rats ayant reçu la protéine de pois et le gluten avaient potentiellement des pertes endogènes réduites suite à la faible teneur en méthionine et en lysine de leurs régimes respectifs. Le retranchement de la part endogène des pertes totales étant la même pour tous les groupes, une telle modulation pourrait expliquer les digestibilités plus élevées obtenues pour ces protéines. De plus, il a été montré que la source de protéine affectait les sécrétions endogènes [51,155,281,288]. Cependant, cette modulation irait plutôt vers une augmentation des sécrétions endogènes pour les protéines végétales, comparé aux sources animales. Par exemple, l'ingestion de protéines de soja chez le porc induirait des pertes endogènes d'AA plus importantes que l'ingestion de protéines de lait [289]. De même, dans notre étude clinique, la protéine de pois avait généré des sécrétions endogènes plus importantes que la caséine, probablement expliqué par la présence de facteurs antinutritionnels. Notre hypothèse de pertes endogènes réduites pour les rats des groupes pois et gluten irait donc à l'encontre de ces conclusions. Or, les isolats protéiques utilisés pour nos études chez le rat étaient d'origine industrielle, et de pureté probablement supérieure aux protéines de l'étude clinique, extraites par des procédés de paillasse. Une teneur plus faible en facteurs antinutritionnels pourrait expliquer que l'on ne retrouve pas le même phénomène pour les protéines végétales chez le rat par rapport à l'Homme. Par ailleurs, la durée de la période d'adaptation aux régimes de 10 jours qui a été suivie préalablement au recueil des digesta peut être remise en question, bien qu'elle ait été conforme au protocole d'évaluation de la digestibilité réelle chez le rat de la FAO, qui recommande une durée de 9 jours [59]. Une période d'adaptation aux régimes plus courte aurait pu éviter de potentielles modifications métaboliques au sein des groupes. Jansman *et al*. soulignent en effet que la durée de la période « pré-test » peut influencer la quantité d'azote et la composition en AA des pertes endogènes iléales [342].

La méthode du régime protéiprive présente également des limites par sa nature non physiologique [343]. Le manque de stimulation du tube digestif induit par l'absence de protéine dans le régime réduirait la sécrétion d'enzymes gastriques et pancréatiques [258] et pourrait entraîner un déséquilibre du métabolisme protéique [342], notamment une diminution du taux de synthèse protéique dans l'intestin [274]. Ces modifications mèneraient à la sous-estimation systématique des pertes endogènes d'azote et d'AA, telle que décrite chez le porc [270,344], conduisant à une surestimation des pertes exogènes et donc à une valeur de digestibilité réduite. D'autres méthodes existent pour estimer les pertes endogènes, comme l'ingestion de peptides issus de l'hydrolyse de la caséine (méthode EHC), menée par Rutherfurd *et al.* chez le rat [257,345]. L'une de ces méthodes alternatives aurait pu être utilisée, même si elles se fondent aussi sur des postulats qui ne sont toujours vérifiés. D'après Stein *et al.*, malgré ses limites, l'usage du régime protéiprive reste tout de même recommandé par rapport aux autres méthodes [37].

Résumé méthodologie d'évaluation de la digestibilité iléale des protéines chez le rat

– –

Chez le rat, la digestibilité cæcale vraie peut être utilisée comme approximation de la digestibilité iléale vraie des AA, en recueillant le contenu du cæcum 5 à 6 h après ingestion de la protéine test. Elle permet de s'affranchir de l'utilisation d'un marqueur non-absorbable et ainsi, d'éviter les biais liés à son taux de récupération souvent faible et variable. La mesure au niveau cæcal a aussi l'avantage de fournir plus de contenu digestif pour les analyses. Il est cependant nécessaire de s'assurer que la digestion ait été complète, i.e. que le contenu résiduel de l'estomac et les pertes au niveau du côlon soient minimes. Pour cela, le contenu de l'intégralité du tube digestif doit être collecté et analysé. La mesure des pertes endogènes, nécessaire pour obtenir une digestibilité vraie des AA, est délicate chez le rat. La méthode du groupe protéiprive ne permet pas de fournir une estimation individualisée, alors que les pertes endogènes sont susceptibles de varier selon le régime et le statut physiologique (poids corporel notamment). Elle fait cependant partie des méthodes standard recommandées. L'usage de protéines marquées par des isotopes stables apparaît comme une solution permettant une évaluation plus précise.

3. Développement de la méthode double traceur chez l'Homme

Comparaison entre la méthode directe et la méthode double traceur

Les pertes iléales d'AA peuvent être évaluées chez l'Homme par différentes approches. La méthode directe repose sur la collecte du contenu iléal suite à l'ingestion de protéines test, souvent marquées par des isotopes stables. Les digesta peuvent être récupérés sur des sujets iléostomisés [176,179], mais leur recrutement est complexe et leur processus de digestion peut être non-représentatif des sujets sains [247,258]. La mesure directe plus couramment utilisée est l'intubation avec une sonde naso-ileale, une méthode standard qui permet le recueil continu des digesta et mène à une mesure précise des pertes iléales d'AA [123,157,174]. Les digestibilités iléales de l'azote et des AA que nous avons obtenues par cette méthode étaient cohérentes, malgré le changement effectué dans le protocole d'ingestion (repas multiples au lieu d'un bolus). En effet, la digestibilité iléale moyenne des AA mesurée pour la caséine était identique à celle de l'étude de Deglaire *et al.* [174] (cf. paragraphe 1). De plus, les pertes azotées endogènes iléales étaient également en accord avec les valeurs de la littérature [123,154] (Article 3). Cependant, le recours à l'intubation est très invasif et ne convient pas à un usage de routine [35,40,66].

Des méthodes évaluent la biodisponibilité des AA par leurs cinétiques d'apparition dans le plasma après un repas test [127, 346–348]. Il s'agit généralement de protéines marquées intrinsèquement au ^{15}N, au ^{2}H ou au ^{13}C provenant de sources végétales [56,152,154] ou animales [123,153,295]. Cette approche peut également passer par la mesure de l'enrichissement du CO_2 de l'air expiré après ingestion [349]. Cependant, la teneur postprandiale en AA dans le plasma ne reflète pas exactement l'absorption car elle est influencée par la vitesse de digestion, le taux d'absorption splanchnique et la forme chimique de l'AA [40,350]. La nouvelle méthode indirecte double traceur a été proposée par la FAO pour estimer la digestibilité iléale des AA [38,40,66]. Elle repose sur l'ingestion simultanée d'une protéine test et d'une protéine de référence, de digestibilité connue, et sur la comparaison de leur taux d'incorporation dans le plasma. Chacune est marquée par un isotope stable, le ^{2}H étant recommandé pour la protéine test et le ^{13}C pour la protéine de référence [38]. L'absorption splanchnique étant considérée identique pour les deux protéines, la comparaison du rapport $^{2}H/^{13}C$ dans le repas et dans le plasma pour un AA donné reflète sa digestibilité dans la protéine test par rapport à la référence. Très peu d'études mettent en œuvre la méthode double traceur pour évaluer la digestibilité des AA [41–45,302], et une même équipe est à l'origine des cinq publications récentes disponibles, dont les résultats sont encourageants [66]. Cependant, la méthode double traceur n'a jamais été comparée aux mesures directes de digestibilité iléale des AA au sein d'une même étude. Ainsi, l'un de nos objectifs chez l'Homme était de comparer la méthode double traceur à la méthode directe par intubation, sur les mêmes sujets. La comparaison

a été faite pour l'isolat de protéine de pois et la caséine de lait, doublement marquées au ^{2}H et au ^{15}N. Le marquage ^{2}H a permis de mettre en œuvre la méthode double traceur, tandis que le ^{15}N était consacré à la mesure directe de la digestibilité iléale dans les digesta. Pour la méthode double traceur, nous avons également comparé 2 techniques de calcul, l'aire sous la courbe (AUC) et l'enrichissement moyen au plateau isotopique plasmatique.

Les cinétiques d'enrichissement plasmatique obtenues (Article 4) ont montré une apparition concomitante entre le ^{2}H et ^{13}C, condition nécessaire à la validité de la méthode double traceur [38,66]. De plus, le schéma multi-repas de 9 doses administrées sur 4 heures a permis d'atteindre un enrichissement plasmatique stable pendant environ 2 heures pour permettre les calculs par la méthode du plateau. La matrice alimentaire semi-liquide choisie (purée de pommes de terre) a permis de limiter le déphasage gastrique entre les AA libres ^{13}C et la protéine test. De plus, les niveaux d'enrichissement plasmatique en AA obtenus suivaient les taux d'enrichissement des isolats protéiques étudiés (pois et caséine). En effet, les enrichissements en ^{2}H les plus élevés ont été obtenus pour l'isoleucine et la thréonine suivant l'ingestion du pois, et pour la proline et l'isoleucine suivant l'ingestion de la caséine. Ces AA étaient également les mieux marqués dans chacun des isolats protéiques, en faisant exception de l'alanine et de la glycine pour lesquels l'enrichissement dans le plasma n'était pas visible. Pour plusieurs AA, les valeurs de digestibilité fournies par la méthode double traceur étaient conformes aux valeurs physiologiques (isoleucine, leucine, lysine, phénylalanine, et valine pour la caséine ; lysine et phénylalanine pour le pois), en comparaison aux digestibilités iléales mesurées par voie directe. Plusieurs AA présentaient des valeurs proches mais supérieures à 100% (proline, notamment). Toutefois, la méthode double traceur a conduit à une surestimation de 10% de la digestibilité moyenne des AA pour la protéine de pois (102,2% méthode AUC vs 94,3% méthode directe) et à une sous-estimation de 5% de la digestibilité de la caséine (91,9% méthode AUC vs 97,1% méthode directe). La **Figure 21** répertorie les résultats obtenus selon les méthodes pour chacune des protéines testées. Afin de tenir compte des transaminations des AA, les facteurs de correction de l'étude de Devi *et al.* ont été appliqués [41], entraînant une augmentation des valeurs de digestibilité et, pour le groupe pois, un creusement des écarts entre les méthodes double traceur et directe. Ces facteurs de transamination (TF) ont été mesurés dans un seul groupe de sujets et sur une population différente à la nôtre, leur pertinence en tant que facteurs universels est donc discutable. Sans appliquer de TF, les digestibilités du pois étaient ramenées à des valeurs physiologiques (digestibilité moyenne des AA de 97,7% pour la protéine de pois et de 88,1% pour la caséine, méthode AUC). Seules les digestibilités de la proline et de la lysine semblaient être correctement corrélées aux mesures obtenues par la méthode directe, après suppression de plusieurs sujets. À ce stade, nous n'avons pas

pu identifier de relation claire entre les méthodes de mesure de la digestibilité par voies plasmatique et iléale.

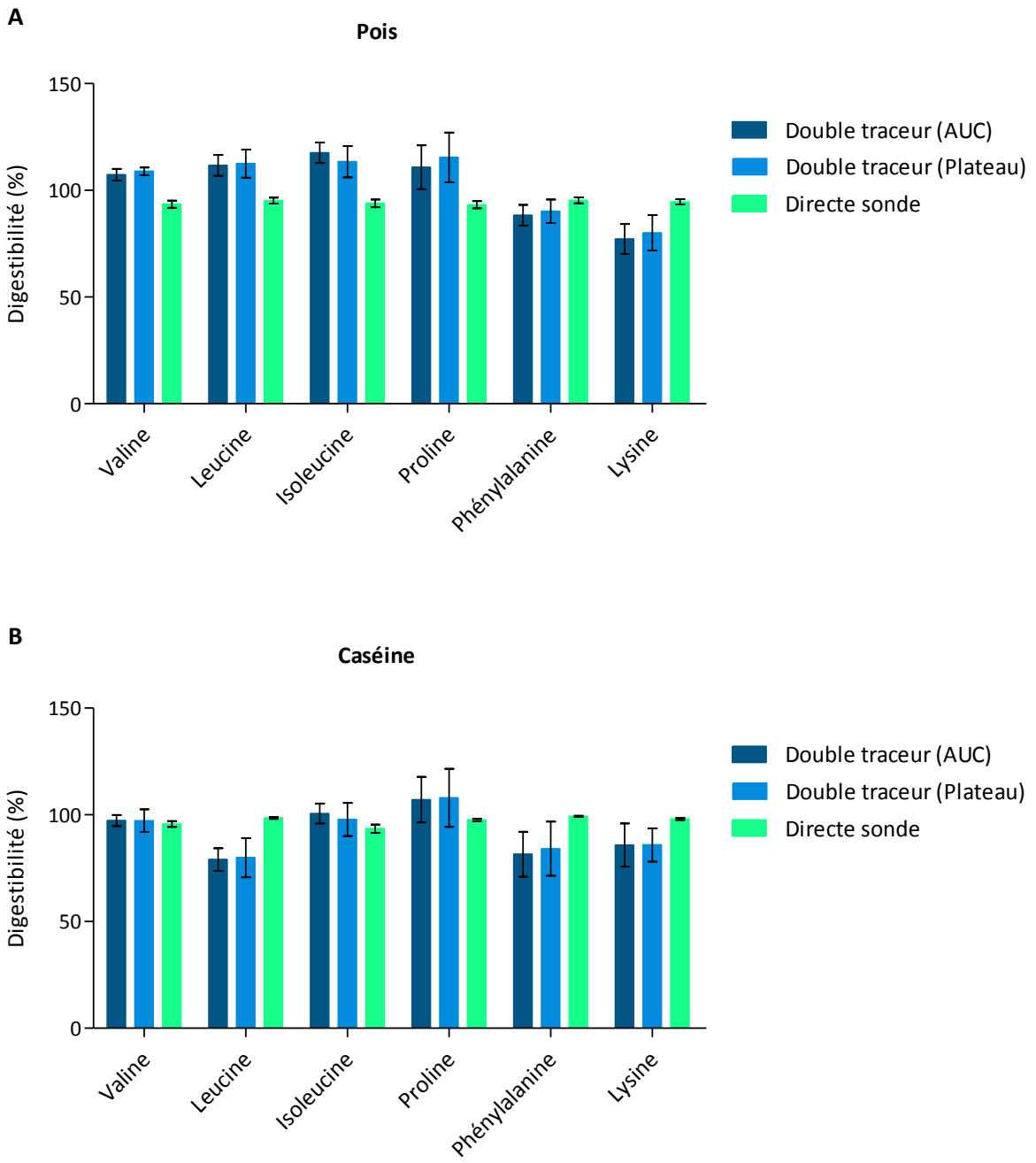

Figure 21. A. Digestibilités iléales des AA de la protéine de pois mesurées par la méthode double traceur (n = 6) et la méthode directe (n = 8). **B.** Digestibilités iléales des AA de la caséine mesurées par la méthode double traceur (n = 5) et la méthode directe (n = 7). Les valeurs sont les moyennes ± ET. (Article 4)

Calculs de la méthode double traceur : AUC vs plateau

Dans notre étude, deux méthodes de calcul différentes ont été utilisées pour la méthode double traceur, à savoir l'AUC de l'enrichissement isotopique plasmatique et la technique du plateau. Cette comparaison a été rendue possible grâce à la multiplicité des repas, qui a généré un plateau d'enrichissement. L'usage de l'AUC est recommandé par la FAO [38] dans la description de la méthode double traceur. Cependant, la technique du plateau a l'avantage de réduire le nombre de prélèvements sanguins nécessaires et ainsi, de faciliter l'étude des populations vulnérables (enfants, personnes âgées, sujets dénutris ou atteints de pathologies) [44]. Les digestibilités des AA étaient similaires entre les techniques de l'AUC et du plateau, pour la protéine de pois comme pour la caséine (Article 4). Néanmoins, la technique du plateau a donné une plus grande variabilité dans les données, et sa corrélation avec la méthode directe semblait plus faible. Par conséquent, les résultats que nous avons obtenus favoriseraient les calculs par l'AUC dans le cadre de la méthode double traceur. Cependant, nous n'avons pas utilisé une méthodologie de plateau prolongé comme l'a fait l'équipe du Pr Kurpad, et qui semble donner des résultats plus cohérents.

Comparaison entre études double traceur

Dans les travaux menés par l'équipe du Pr Kurpad à Bangalore, la digestibilité iléale moyenne des AA du pois jaune entier évaluée par la méthode double traceur était inférieure à celle que nous avons obtenue pour un isolat de pois (71,6% [43] vs 102,2%, Article 4). Cette différence peut être liée à la présence de facteurs antinutritionnels et de fibres dans le pois entier, réduisant sa digestibilité. La méthode double traceur est susceptible d'induire de grandes variabilités dans les résultats de digestibilité, comme le montrent les études publiées précédemment, où certains écarts-types atteignaient 10% [42,44]. Il n'y a pas de donnée de digestibilité de la caséine par la méthode double traceur $^{2}H/^{13}C$ dans la littérature, mais van der Wielen *et al.* ont récemment mis en œuvre la méthode double traceur pour évaluer la digestibilité des AA du lait marqué au ^{15}N [301]. Les digestibilités étaient très variables selon les AA, et s'étalaient de 91,6% pour la méthionine à 99,3% pour la glycine. La comparaison peut également être faite avec d'autres sources animales, comme les protéines d'œuf et de viande, également réputées hautement digestibles. Les travaux de l'équipe indienne indiquent les digestibilités moyennes de 89,4 ± 4,5% et de 92,0 ± 2,8% pour les AA des protéines d'œuf bouilli et de viande cuite [42], quand les méthodes directes rapportent 90,9% et 90,1% pour l'œuf cuit [179] et la viande cuite [153], respectivement. Dans leurs différents travaux, les digestibilités obtenues pour les protéines animales étaient supérieures aux digestibilités des sources végétales, des protéines de légumineuses notamment [42,43] (**Figure 22**), comme attendu. La comparaison avec nos données doit néanmoins tenir compte des différences dans les protocoles menés.

Nous avons fait le choix d'utiliser des AA libres algaux comme référence, contrairement aux études mentionnées ci-dessus qui utilisaient de la spiruline ^{13}C. D'après les consignes de la FAO, la digestibilité de la protéine de référence doit être élevée et sa valeur connue précisément [38]. Les AA libres sont supposés être entièrement digestibles. Dans notre cas, la digestibilité iléale moyenne obtenue pour les AA libres était élevée (98%) et ne variait pas selon la source de protéine testée. Dans les autres études, la digestibilité des AA de la spiruline n'a pas été évaluée par mesure directe chez l'Homme mais a été déterminée par la méthode double traceur, avec des AA libres en tant que référence. La digestibilité moyenne des AAI de la spiruline était faible et variable (85,2%, variant de 77 à 95%), avec une valeur très basse pour la proline (41,4%) [41]. Sa réévaluation ultérieure à 87,9% a suggéré un manque de reproductibilité de sa mesure [43], alors que la valeur de digestibilité de la référence est censée être stable afin de n'être évaluée qu'une fois et appliquée à d'autres études. Par ailleurs, l'utilisation des AA libres ^{13}C en tant que référence a été testée au cours d'une étude de l'équipe du Pr Kurpad évaluant la digestibilité des légumineuses, et a fourni des résultats similaires à ceux obtenus avec la spiruline comme référence [43]. D'après ces éléments, l'utilisation d'un mélange d'AA libres comme référence semble donc préférable à la spiruline dans l'application de la méthode double traceur.

Dans les études précédemment publiées, les repas ont été administrés toutes les 30 minutes pendant 7 heures, alors que nous avons fractionné les repas sur 4 heures uniquement afin de pouvoir concilier l'analyse de la digestibilité iléale directe et la méthode double traceur. Les plateaux d'enrichissements isotopiques plasmatiques générés dans notre étude était compris entre 2 et 5 h, alors que les études précédentes fixaient le plateau bien plus tard, entre 5 et 8 h [41]. Il est possible que la période d'ingestion des repas ait été trop courte dans nos travaux pour permettre d'atteindre un état stable, qui limiterait les différences d'extraction splanchnique entre la protéine test et la référence.

L'interrogation majeure sur les résultats que nous avons obtenus par la méthode double traceur est la différence observée entre la protéine de pois et la caséine, qui était inversée par rapport à la digestibilité iléale mesurée par voie directe (Article 3). En effet, le taux d'absorption des AA était plus élevé pour la protéine de pois par rapport à la caséine, alors que la digestibilité iléale mesurée dans les digesta était plus élevée pour la caséine (**Figure 21**). Ce résultat pourrait s'expliquer par une métabolisation postprandiale différente entre les AA provenant de la caséine et ceux provenant de la protéine de pois [135]. De manière surprenante, la production de $^{13}CO_2$ dans l'air expiré a été plus élevée suivant l'ingestion de caséine, ce qui peut refléter une plus forte oxydation des AA ^{13}C absorbés par rapport au pois, et donc une extraction splanchnique différente selon le repas test. Nous n'avons pas d'information sur ces différentes composantes, la captation dans les synthèses ou les voies

énergétiques, mais il pourrait y avoir eu des différences d'extraction splanchnique entre les AA libres et la protéine test. Au regard de nos résultats de digestibilité et d'indices d'absorption (Article 4), l'extraction splanchnique des AA libres ^{13}C pourrait être supérieure par rapport aux protéines de pois, et inférieure par rapport aux caséines, sans que nous n'ayons d'éléments précis permettant d'étayer cette hypothèse. En effet, le caractère « lent » de la caséine en ce qui concerne sa digestion [331] aurait plutôt tendance à minimiser l'extraction splanchnique par rapport à des AA libres [133,351]. Une autre hypothèse serait une différence de taux de transamination entre les AA issus de la caséine et les AA issus du pois, alors que les TF appliqués sont les mêmes quelle que soit la source de protéine. Ayant été calculés à partir de l'ingestion d'AA libres marqués au ^{2}H [41], il est possible qu'ils soient plus ou moins appropriés à la protéine test, selon sa composition, sa structure et sa source, animale ou végétale.

La méthode double traceur est limitée par les hypothèses qu'il est nécessaire d'émettre lors de sa mise en œuvre. La fiabilité de la méthode repose sur le postulat selon lequel les AA absorbés issus de la protéine test sont métabolisés de la même manière que les AA de la référence. Les différences d'apparition plasmatique entre les AA ^{2}H et ^{13}C devraient donc provenir uniquement de la phase d'absorption [66]. Or, les concentrations en AA plasmatiques sont la résultante de la digestion des protéines, des cinétiques d'absorption intestinale des AA et des peptides, et des métabolismes entérocytaire, hépatique, et périphérique. Compte tenu du nombre de facteurs susceptibles d'influencer les concentrations plasmatiques en AA, il peut être délicat de formuler une telle hypothèse. De plus, il a été montré que les cinétiques d'absorption des AA libres ingérés étaient différentes des cinétiques d'absorption des AA issus de protéines entières [63,352], suite au temps nécessaire à leur digestion et à leur libération sous forme de peptides et d'AA, ce qui pourrait induire des différences dans les métabolismes après absorption.

Par ailleurs, les digestibilités issues d'un protocole double traceur pourraient potentiellement être influencées par l'impact du marquage lui-même [66,353], i.e. sa position et l'atome auquel il est attaché [354]. Par exemple, un atome de C peut être métabolisé différemment par rapport à un atome de N au sein de la même molécule [66]. Un même atome peut aussi être pris en charge différemment selon sa position au sein de la molécule. Ainsi, le devenir métabolique peut varier selon le type d'atome au sein de l'acide aminé (C, N, ou H), l'azote étant d'ailleurs particulièrement vulnérable aux réactions de transamination. Il est nécessaire de choisir minutieusement les isotopes à utiliser et de s'assurer, dans la mesure du possible, de l'uniformité du marquage des AA au sein des protéines tests et de la référence. La méthode double traceur telle que proposée par la FAO évalue une protéine test marquée au ^{2}H, mais elle a aussi été menée sur des protéines marquées au ^{15}N avec une correction des transaminations [301]. Une étude récente au sein de notre équipe a évalué la digestibilité des AA de la

protéine de tournesol marquée au ^{15}N par la méthode double traceur (Tessier *et al.*, en cours de soumission). Tout comme avec le marquage au deutérium, les résultats présentaient des écarts notables entre les valeurs issues de la mesure directe et de la méthode double traceur. Pour finir, il est possible de s'interroger sur l'influence de la présence même de la protéine de référence, comme le soulignent Moughan *et al.* [66], qui peut affecter la digestibilité de la protéine test, au même titre que tout ingrédient de la matrice alimentaire. Toutefois, la protéine de référence est ajoutée en quantité minime et, dans notre cas, l'utilisation d'un mélange d'AA libres de haute pureté à la place de la spiruline, qui ne contient que 50 à 70% de protéines, a limité l'introduction de composés supplémentaires dans les repas.

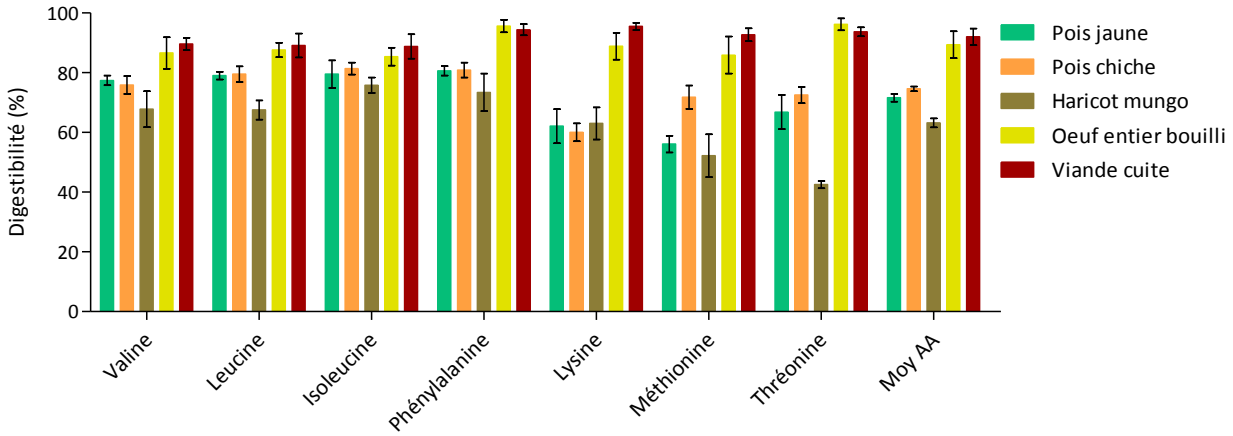

Figure 22. Digestibilités iléales des AA estimées par la méthode double traceur dans les travaux de l'équipe du Pr Kurpad, Bangalore. D'après les données de Kashyap *et al.* [42,43]. Les valeurs sont les moyennes ± ET (n = 3 pour les pois et le haricot, n = 6 pour l'œuf et la viande).

Bilan des méthodes actuellement disponibles

À ce jour, la digestibilité iléale des AA chez l'Homme peut être évaluée en prélevant les pertes iléales de manière directe, par intubation ou par recours à des sujets iléotomisés. L'évaluation de la digestibilité des AA peut également être approchée par des méthodes indirectes, dont la méthode double traceur. Chacune d'elles possède ses avantages et ses limites.

La méthode double traceur est faiblement invasive et serait applicable aux populations vulnérables. Cependant, elle aboutit pour l'instant à des résultats variables et donne des valeurs non physiologiques pour certains AA. Elle peut être invalidée par des facteurs difficilement maîtrisables, comme des différences post-absorption entre les AA de la protéine test et de la référence. Elle nécessite également

l'utilisation d'un double marquage et, au-delà du coût conséquent des isotopes, il peut être difficile pour certaines protéines de marquer les AA de manière suffisante et homogène.

Le recueil des digesta via la sonde naso-iléale est une méthode standard et reproductible, qui aboutit à des valeurs cohérentes de digestibilité avec une variabilité interindividuelle réduite. Cependant, elle est très invasive, coûteuse, et inappropriée pour les populations vulnérables, pour lesquelles l'étude de la digestibilité aurait des implications importantes. Cette méthode directe nécessite d'utiliser un ou plusieurs marqueurs non-absorbables (PEG-4000, PSP, inuline, selon les études), dont un nécessaire à la mesure du débit iléal, et éventuellement un marqueur du repas. Les associer multiplie les biais analytiques liés à leur dosage respectif [66]. De plus, l'impact de la présence de la sonde sur la vidange gastrique et le flux intestinal est inconnu [174], même si des études antérieures ont montré que ces paramètres n'influençaient pas la digestibilité iléale globale des protéines [51,52,355]. Une étude a également suggéré que la position allongée prolongée des volontaires, inévitable dans un tel protocole, influencerait la biodisponibilité postprandiale des AA par rapport à une position assise [356].

Une autre méthode entièrement non invasive a été développée récemment pour évaluer la biodisponibilité métabolique (pertes digestives et métaboliques) d'un AA au sein d'une protéine test, chez l'Homme. Elle se base sur le principe de l'oxydation de l'AA indicateur (IAAO), tel qu'utilisé dans le cadre de la détermination des besoins en AA. L'AA indicateur est la phénylalanine marquée au ^{13}C. L'AA étudié est limitant et administré à niveaux croissants dans un repas synthétique fait d'AA libres, et avec les mêmes niveaux dans un repas contenant la protéine à tester. La biodisponibilité de l'AA limitant est estimée par le rapport de pente des droites de régression du $^{13}CO_2$ pour la protéine test et les AA libres (« slope-ratio assay ») [357–359]. La méthode IAAO est analytiquement simple et non-invasive, puisqu'il s'agit uniquement d'administrer des repas et de prélever l'air expiré [66]. Cependant, elle n'évalue la biodisponibilité que d'un seul AA à la fois et les protocoles d'administration des repas sont complexes à mettre en place [40].

Résumé développement de la méthode double traceur chez l'Homme

– –

La méthode double traceur génère des valeurs de digestibilité variables et incohérentes pour certains AA. Elle nécessite d'être développée d'avantage et les réflexions sur la métabolisation des AA de la protéine test par rapport aux AA de la référence mériteraient d'être approfondies. Notre étude suggère que l'utilisation d'un mélange d'AA libres en tant que référence serait préférable à la spiruline, et que le calcul par l'AUC serait mieux corrélé à la méthode directe. Le protocole d'ingestion le plus approprié serait alors le repas unique en bolus, au vu des incertitudes liées à la stabilité des plateaux d'enrichissements isotopiques. Le plateau prolongé aurait pu mener à des résultats plus cohérents, au vu des données obtenues par l'équipe du Pr Kurpad. La prise en compte des transaminations et la fiabilité des facteurs correctifs associés restent également une piste d'amélioration. Les résultats sont néanmoins encourageants et la méthode a fourni des valeurs de digestibilité physiologiques pour certains AA. Après un développement plus approfondi et sous réserve de validation, la méthode double traceur pourrait potentiellement être une alternative à la méthode directe. Elle offrirait alors des opportunités majeures en recherche sur la qualité des protéines pour la nutrition humaine.

Conclusion

Ces travaux ont permis d'évaluer la qualité nutritionnelle de la protéine de pois en comparaison à d'autres sources de protéines, notamment la caséine de lait, chez le rat et chez l'Homme. Cette évaluation passait par la mesure de la digestibilité iléale des AA, le calcul du DIAAS, et la détermination d'autres indices de qualité protéique. Le projet de thèse a également participé au développement de méthodes d'évaluation de la digestibilité iléale des AA dans les deux modèles d'étude. Les protocoles menés ont mis en œuvre des techniques analytiques de chromatographie et de spectrométrie de masse à rapport isotopique. Les résultats obtenus sont issus d'un travail collaboratif, unissant des thématiques diverses et variées, et nécessitant des adaptations pour faire face aux obstacles rencontrés et mener à bien le projet. Ces travaux ont notamment mobilisé des compétences en expérimentation animale, étude clinique, analyses isotopiques, agronomie (marquage du pois et du lait), et procédés de production (extraction des protéines).

Les études mises en œuvre ont participé à la caractérisation nutritionnelle de la protéine de pois et ont permis de mieux la positionner parmi l'offre de protéines disponible. Sa digestibilité élevée, chez le rat comme chez l'Homme, et sa composition en AA équilibrée ont confirmé sa haute qualité nutritionnelle. Les résultats obtenus pour les différents critères de qualité évalués et la comparaison avec la caséine et le gluten (**Tableau 19**) ont démontré le potentiel de la protéine de pois pour une utilisation en nutrition humaine. Au-delà des applications à destination de la population générale et des personnes végétariennes, comme les substituts végétaux de viande, la protéine de pois pourrait être incorporée dans des produits de nutrition spécialisée, adressés aux sportifs, aux végétariens, ou aux sujets dénutris.

Les développements méthodologiques menés au cours de ces travaux ont permis de tester des protocoles de mesure de la digestibilité iléale des AA chez le rat et chez l'Homme, et de proposer des solutions face aux problématiques actuelles. Chez le rat, nous confirmons que la digestibilité cæcale vraie peut être utilisée comme approximation de la digestibilité iléale vraie, ce qui présente l'avantage de s'affranchir du marqueur non-absorbable dans le repas qui est une source d'incertitude. Par ailleurs, en l'absence de protéines intrinsèquement marquées avec des isotopes stables, nous avons mis en évidence les difficultés inhérentes à la détermination des pertes endogènes d'AA. Il serait judicieux de remettre en œuvre le protocole que nous avons suggéré en mesurant les pertes endogènes par une autre méthode, en réduisant par exemple la durée de la période d'habituation aux régimes.

L’utilisation d’isotope stables pour différencier les pertes endogènes des pertes exogènes semble en définitive la méthode la plus précise.

Chez l’Homme, la méthode plasmatique double traceur a mené à des conclusions mitigées, dû notamment à la forte variabilité des données produites, mais la technique reste intéressante et prometteuse. Il serait cependant nécessaire de la tester à nouveau en administrant un repas unique à la place de repas fractionnés, et en se limitant au calcul par les AUC, ou au contraire en utilisant un plateau prolongé. La comparaison de la méthode double traceur avec la méthode directe pourrait être menée sur une protéine différente pour enrichir les données disponibles sur les différentes sources, qui soit également hautement digestible afin de minimiser la variabilité interindividuelle. Sous réserve de recherches supplémentaires et de validation, la méthode double traceur pourrait conduire à des avancées majeures dans l'évaluation de la qualité des protéines pour la nutrition humaine. Son caractère minimalement invasif pourrait permettre l’étude des populations vulnérables, comme les enfants, les personnes âgées ou les sujets atteints de pathologies, pour qui l’adéquation du régime aux besoins nutritionnels est d’une importance majeure.

Tableau 19. Bilan des données obtenues au cours des travaux de thèse - critère de qualité protéique selon la source évaluée, chez le rat et chez l'Homme

	Protéine de pois	Caséine de lait	Gluten de blé	Protéine de pois + méthionine	Protéine de pois + gluten
Digestibilité fécale vraie N (rat) [1]	96,0 ± 1,0	93,7 ± 1,1	95,7 ± 0,6	95,3 ± 1,2	-
PDCAAS profil ref FAO-2007 > 18 ans (rat) [1]	1,02	1,43	0,32	1,29	-
Digestibilité cæcale vraie AA moy (rat) [1]	94,6 ± 4,1	87,0 ± 5,0	94,4 ± 3,6	87,5 ± 3,4	-
Digestibilité cæcale vraie N (rat) [1]	95,0 ± 4,5	91,6 ± 4,3	95,5 ± 3,0	-	-
Digestibilité iléale vraie N (Homme) [2]	92,0 ± 2,7	94,0 ± 1,7	-	-	-
Digestibilité iléale vraie AA moy (Homme) [2]	93,6 ± 2,9	96,8 ± 1,0	-	-	-
DIAAS profil ref FAO-2013 > 3 ans (rat) [1]	0,88	1,29	0,25	1,10	-
DIAAS profil ref FAO-2013 > 3 ans (Homme) [2]	1,00 ± 0,06	1,45 ± 0,01	-	-	-
UPPN (Homme) [2]	71,6 ± 6,2	71,2 ± 4,9	-	-	-
Bilan azoté (rat) [1]	458,4 ± 84,6	606,6 ± 68,2	467,4 ± 172,1	640,9 ± 100,4	-
PER (rat) [3]	1,14 ± 0,27	2,55 ± 0,27	0,47 ± 0,19	2,52 ± 0,33	1,60 ± 0,16

Les valeurs sont les moyennes ± ET. Le PDCAAS et le DIAAS ont été calculés avec le facteur de conversion azote-protéine 6,25.

[1] n = 9

[2] n = 8 pour le pois, n = 7 pour la caséine

[3] n = 8

Références

1. United Nations - Departement of Economic and Social Affairs. World Population Prospects 2019 [Internet]. 2019;Available from: https://population.un.org/wpp/

2. Drewnowski A, Finley J, Hess JM, Ingram J, Miller G, Peters C. Toward Healthy Diets from Sustainable Food Systems. Curr Dev Nutr 2020;4(6):nzaa083.

3. Whitmee S, Haines A, Beyrer C, Boltz F, Capon AG, de Souza Dias BF, et al. Safeguarding human health in the Anthropocene epoch: report of The Rockefeller Foundation–Lancet Commission on planetary health. The Lancet 2015;386(10007):1973–2028.

4. Tilman D, Clark M. Global diets link environmental sustainability and human health. Nature 2014;515(7528):518–22.

5. Sofiprotéol - BIPE. Prospective sur la place des protéines végétales à l'horizon 2030. Colloque "Les légumineuses à graines en alimentation humaine". Paris, France: 2014.

6. Anses. Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles [Internet]. 2016. Available from: https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2012SA0103Ra-2.pdf

7. Anses. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3). Rapport d'expertise collective. 2017.

8. Diallo A, Deschasaux M, Latino-Martel P, Hercberg S, Galan P, Fassier P, et al. Red and processed meat intake and cancer risk: Results from the prospective NutriNet-Santé cohort study. Int J Cancer 2018;142(2):230–7.

9. Aune D, Chan DSM, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, et al. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. Cancer Causes Control 2013;24(4):611–27.

10. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: Meta-Analysis of Prospective Studies. PLOS ONE 2011;6(6):e20456.

11. Al-Shaar L, Satija A, Wang DD, Rimm EB, Smith-Warner SA, Stampfer MJ, et al. Red meat intake and risk of coronary heart disease among US men: prospective cohort study. BMJ 2020;371:m4141.

12. 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(5):762–75.

13. Brunner EJ, Mosdøl A, Witte DR, Martikainen P, Stafford M, Shipley MJ, et al. Dietary patterns and 15-y risks of major coronary events, diabetes, and mortality. Am J Clin Nutr 2008;87(5):1414–21.

14. Snowdon DA, Phillips RL, Fraser GE. Meat consumption and fatal ischemic heart disease. Prev Med 1984;13(5):490–500.

15. Afshin A, Micha R, Khatibzadeh S, Mozaffarian D. Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: a systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr 2014;100(1):278–88.

16. Fung TT, Rexrode KM, Mantzoros CS, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Mediterranean diet and incidence and mortality of coronary heart disease and stroke in women. Circulation 2009;119(8):1093–100.

17. Martínez-González MÁ, Fuente-Arrillaga C de la, Nunez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Vazquez Z, et al. Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study. BMJ 2008;336(7657):1348–51.

18. Mitrou PN, Kipnis V, Thiébaut ACM, Reedy J, Subar AF, Wirfält E, et al. Mediterranean Dietary Pattern and Prediction of All-Cause Mortality in a US Population: Results From the NIH-AARP Diet and Health Study. Arch Intern Med 2007;167(22):2461–8.

19. Del Gobbo LC, Falk MC, Feldman R, Lewis K, Mozaffarian D. Effects of tree nuts on blood lipids, apolipoproteins, and blood pressure: systematic review, meta-analysis, and dose-response of 61 controlled intervention trials. Am J Clin Nutr 2015;102(6):1347–56.

20. Wang Fenglei, Zheng Jusheng, Yang Bo, Jiang Jiajing, Fu Yuanqing, Li Duo. Effects of Vegetarian Diets on Blood Lipids: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. J Am Heart Assoc 2014;4(10):e002408.

21. FAO. Que sont les légumineuses? In: Légumineuses: Des Graines Nutritives Pour un Avenir Durable. Rome, Italy: 2016.

22. Lefranc-Millot C, Teichman-Dubois V. Protein from vegetable sources: a focus on pea protein. Nov Proteins Food Pharm Agric John Wiley Sons 2018;197–216.

23. UNIP. Rapport d'activité 2012. 2012.

24. Melendrez-Ruiz J, Arvisenet G, Laugel V, Chambaron S, Monnery-Patris S. Do French Consumers Have the Same Social Representations of Pulses as Food Industry Professionals? Foods 2020;9(2):147.

25. FranceAgriMer. Consommation des produits oléo-protéagineux, nouvelles tendances de consommation [Internet]. 2018. Available from: https://www.franceagrimer.fr/fam/content/download/58851/document/06%20-%20Pr%C3%A9sentation%20consommation%20ol%C3%A9o-prot%C3%A9agineux.pdf?version=1

26. OECD/FAO. OECD–FAO Agricultural Outlook 2020-2029. OECD Agriculture statistics (database); 2020.

27. Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. La stratégie nationale protéines végétales. Dossier de presse France Relance [Internet]. 2020. Available from: https://agriculture.gouv.fr/dossier-de-presse-la-strategie-nationale-proteines-vegetales

28. Agreste. Statistique agricole annuelle 2018-2019 données provisoires. 2020.

29. 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(1):141–50.

30. Grand View Research. Pea Protein Market Growth & Trends [Internet]. 2020;Available from: https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-pea-proteins-market

31. Les Echos. Le pois jaune, l'ingrédient secret des start-up vegan [Internet]. 2019;Available from: https://www.lesechos.fr/industrie-services/conso-distribution/le-pois-jaune-lingredient-secret-des-start-up-vegan-1025641

32. Guéguen J, Walrand S, Bourgeois O. Les protéines végétales : contexte et potentiels en alimentation humaine. Cah Nutr Diététique 2016;51(4):177–85.

33. Mariotti F. Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality [Internet]. In: Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention. Elsevier; 2017 [cited 2020 Aug 7]. page 621–42.Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128039687000356

34. Report of an FAO expert consultation. Dietary protein quality evaluation in human nutrition. 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2013.

35. Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. Br J Nutr 2012;108(S2):S238–46.

36. Davila A-M, Blachier F, Gotteland M, Andriamihaja M, Benetti P-H, Sanz Y, et al. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. Pharmacol Res 2013;68(1):95–107.

37. 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. J Anim Sci 2007;85(1):172–80.

38. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a FAO Expert Working Group. Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods, 2-5 March 2014, Bangalore, India. 2014.

39. Tomé D, Jahoor F, Kurpad A, Michaelsen KF, Pencharz P, Slater C, et al. Current issues in determining dietary protein quality and metabolic utilization. Eur J Clin Nutr 2014;68(5):537–8.

40. Gaudichon C, Calvez J. Determinants of amino acid bioavailability from ingested protein in relation to gut health. 2020;24(1):7.

41. 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(6):984–991.

42. Kashyap S, Shivakumar N, Varkey A, Duraisamy R, Thomas T, Preston T, et al. 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(5):980–7.

43. Kashyap S, Varkey A, Shivakumar N, Devi S, Reddy B H R, Thomas T, et al. True ileal digestibility of legumes determined by dual-isotope tracer method in Indian adults. Am J Clin Nutr 2019;110(4):873–82.

44. Devi S, Varkey A, Dharmar M, Holt RR, Allen LH, Sheshshayee MS, et al. 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;150(5):1178–85.

45. 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(8):1363–8.

46. Arnal, MA, Beaufrère, B, Benamouzig, R, Boirie, Y, Cynober, L, Dardevet, D, et al. Dossier scientifique de l'IFN: Les protéines. Tome 1: Le métabolisme et les besoins protéiques chez l'homme. 1997.

47. Mills JN, Tang J. Molecular weight and amino acid composition of human gastricsin and pepsin. J Biol Chem 1967;242(13):3093–3097.

48. Boron WF, Boulpaep EL. Nutrient digestion and absorption. In: Medical physiology: a cellular and molecular approach. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009. page 949–79.

49. Schlamowitz M, Peterson LU. Studies on the optimum pH for the action of pepsin on" native" and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. J Biol Chem 1959;234(12):3137–3145.

50. Gaudichon C, Mahé S, Roos N, Benamouzig R, Luengo C, Huneau J-F, et al. Exogenous and endogenous nitrogen flow rates and level of protein hydrolysis in the human jejunum after [15N]milk and [15N]yoghurt ingestion. Br J Nutr 1995;74(2):251–60.

51. Gaudichon C, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Daré S, et al. Net Postprandial Utilization of [15N]-Labeled Milk Protein Nitrogen Is Influenced by Diet Composition in Humans. J Nutr 1999;129(4):890–5.

52. 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(4):954–62.

53. 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(10):1970–7.

54. Webb KE. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. J Anim Sci 1990;68(9):3011–22.

55. Goodman BE. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. Adv Physiol Educ 2010;34(2):44–53.

56. Nicolas Gausserès, Sylvain Mahé, Robert Benamouzig, Catherine Luengo, Francoise Ferriere, Jacques Rautureau, et al. [15N]-Labeled Pea Flour Protein Nitrogen Exhibits Good Ileal Digestibility and Postprandial Retention in Humans. Am Soc Nutr Sci 1997;22:3166–97.

57. Evenepoel P, Claus D, Geypens B, Hiele M, Geboes K, Rutgeerts P, et al. Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol 1999;277(5):G935–G943.

58. Montoya CA, Lallés J-P, Beebe S, Montagne L, Souffrant WB, Leterme P. Influence of the Phaseolus vulgaris phaseolin level of incorporation, type and thermal treatment on gut characteristics in rats. Br J Nutr 2006;95(1):116–23.

59. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Protein quality evaluation. Bethesda, Md., USA 4-8 December 1989. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1991.

60. Huisman, J., Jansman, A J M. Dietary effects and some analytical aspects of antinutritional factors in peas (Pisum sativum), common beans (Phaseolus vulgaris) and soyabeans (Glycine max L) in monogastric farm animal. A literature review. Nutr Abstr Rev 1991;61:901–24.

61. Devlin, TM. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Liss; 2006.

62. Daniel H. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. Annu Rev Physiol 2004;66(1):361–84.

63. Grimble GK. The Significance of Peptides in Clinical Nutrition. Annu Rev Nutr 1994;14(1):419–47.

64. Hara H, Funabiki R, Iwata M, Yamazaki K-I. Portal Absorption of Small Peptides in Rats under Unrestrained Conditions. J Nutr 1984;114(6):1122–9.

65. Nussberger S, Steel A, Trotti D, Romero MF, Boron WF, Hediger MA. Symmetry of H+ Binding to the Intra- and Extracellular Side of the H+-coupled Oligopeptide Cotransporter PepT1. J Biol Chem 1997;272(12):7777–85.

66. Moughan PJ, Wolfe RR. Determination of Dietary Amino Acid Digestibility in Humans. J Nutr 2019;

67. Miner-Williams WM, Stevens BR, Moughan PJ. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? Nutr Res Rev 2014;27(2):308–29.

68. Watford M. Glutamine metabolism in rat small intestine: synthesis of three-carbon products in isolated enterocytes. Biochim Biophys Acta BBA-Gen Subj 1994;1200(1):73–78.

69. Blachier F, Boutry C, Bos C, Tomé D. Metabolism and functions of l-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. Am J Clin Nutr 2009;90(3):814S-821S.

70. Watford M, Lund P, Krebs HA. Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes. Biochem J 1979;178(3):589–96.

71. Romero-Gómez M, Jover M, Galán JJ, Ruiz A. Gut ammonia production and its modulation. Metab Brain Dis 2009;24(1):147–57.

72. Chacko A, Cummings JH. Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. Gut 1988;29(6):809–15.

73. Moughan PJ. Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. Nutr Res Rev 2003;16(2):127–41.

74. Stephen AM, Cummings JH. The microbial contribution to human faecal mass. J Med Microbiol 1980;13(1):45–56.

75. van der Wielen N, Moughan PJ, Mensink M. Amino acid absorption in the large intestine of humans and porcine models. J Nutr 2017;147(8):1493–8.

76. Nixon SE, Mawer GE. The digestion and absorption of protein in man: 1. The site of absorption. Br J Nutr 1970;24(1):227–40.

77. Just A, Jørgensen H, Fernández JA. The digestive capacity of the caecum-colon and the value of the nitrogen absorbed from the hind gut for protein synthesis in pigs. Br J Nutr 1981;46(1):209–19.

78. McNeil, N I. Nutritional Implications of Human and Mammalian Large Intestinal Function. Wld Rev lutr Diet 1988;56:1–42.

79. Columbus DA, Lapierre H, Htoo JK, de Lange CFM. Nonprotein Nitrogen Is Absorbed from the Large Intestine and Increases Nitrogen Balance in Growing Pigs Fed a Valine-Limiting Diet. J Nutr 2014;144(5):614–20.

80. Mason VC. Metabolism of nitrogenous compounds in the large gut. Proc Nutr Soc 1984;43(1):45–53.

81. AFSSA. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations. 2007.

82. Jackson AA. Salvage of urea-nitrogen and protein requirements. Proc Nutr Soc 1995;54(2):535–47.

83. Jackson AA. Chronic malnutrition: protein metabolism. Proc Nutr Soc 1993;52(1):1–10.

84. Danielsen M, Jackson AA. Limits of adaptation to a diet low in protein in normal man: urea kinetics. Clin Sci 1992;83(1):103–8.

85. Fouillet H, Juillet B, Bos C, Mariotti F, Gaudichon C, Benamouzig R, et al. Urea-nitrogen production and salvage are modulated by protein intake in fed humans: results of an oral stable-isotope-tracer protocol and compartmental modeling. Am J Clin Nutr 2008;87(6):1702–14.

86. 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.

87. Moughan PJ, Rutherfurd SM. Gut luminal endogenous protein: Implications for the determination of ileal amino acid digestibility in humans. Br J Nutr 2012;108(S2):S258–63.

88. 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(4):349–359.

89. Deglaire A, Moughan PJ, Airinei G, Benamouzig R, Tomé D. Intact and hydrolyzed casein lead to similar ileal endogenous protein and amino acid flows in adult humans. Am J Clin Nutr 2020;111(1):90–97.

90. Twombly J, Meyer JH. Endogenous nitrogen secretions into the digestive tract. J Nutr 1961;74(4):453–460.

91. Souffrant WB, Rerat A, Laplace JP, Darcy-Vrillon B, Köhler R, Corring T, et al. Exogenous and endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. III. Recycling of endogenous nitrogen. Reprod Nutr Dev 1993;33(4):373–382.

92. Miner-Williams W, Moughan PJ, Fuller MF. Endogenous Components of Digesta Protein from the Terminal Ileum of Pigs Fed a Casein-Based Diet. J Agric Food Chem 2009;57(5):2072–8.

93. Tomé D, Bos C. Dietary Protein and Nitrogen Utilization. J Nutr 2000;130(7):1868S-1873S.

94. Calloway DH, Margen S. Variation in Endogenous Nitrogen Excretion and Dietary Nitrogen Utilization as Determinants of Human Protein Requirement. J Nutr 1971;101(2):205–16.

95. Wu G. Intestinal Mucosal Amino Acid Catabolism. J Nutr 1998;128(8):1249–52.

96. Pacy PJ, Price GM, Halliday D, Quevedo MR, Millward DJ. Nitrogen Homoeostasis in man: The Diurnal Responses of Protein Synthesis and Degradation and Amino Acid Oxidation to Diets with Increasing Protein Intakes. Clin Sci 1994;86(1):103–18.

97. Young VR, Marchini JS. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. Am J Clin Nutr 1990;51(2):270–289.

98. Waterlow JC. The requirements of adult man for indispensable amino acids. Discussion. In: European journal of clinical nutrition. 1996. page S151–79.

99. Buse MG, Reid SS. Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. J Clin Invest 1975;56(5):1250–61.

100. Fulks RM, Li JB, Goldberg AL. Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. J Biol Chem 1975;250(1):290–8.

101. Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine Stimulates Translation Initiation in Skeletal Muscle of Postabsorptive Rats via a Rapamycin-Sensitive Pathway. J Nutr 2000;130(10):2413–9.

102. Nagasawa T, Kido T, Yoshizawa F, Ito Y, Nishizawa N. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. J Nutr Biochem 2002;13(2):121–127.

103. Fouillet H, Bos C, Gaudichon C, Tomé D. Approaches to Quantifying Protein Metabolism in Response to Nutrient Ingestion. J Nutr 2002;132(10):3208S-3218S.

104. Rand WM, Pellett PL, Young VR. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. Am J Clin Nutr 2003;77(1):109–27.

105. World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO ad hoc Expert Committee (WHO Technical Report Series, No. 522). Geneva: 1973.

106. EFSA NDA Panel. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for protein. EFSA Journal 2012;10(2).

107. Tarnopolsky M. Protein Requirements for Endurance Athletes. Eur J Sport Sci 2004;4(1):1–15.

108. Phillips SM. Protein requirements and supplementation in strength sports. Nutrition 2004;20(7):689–95.

109. Reeds PJ. Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. J Nutr 2000;130(7):1835S-1840S.

110. Rose WC. The amino acid requirements of adult man. Nutr Abstr Rev 1957;27(3):631–47.

111. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Geneva: World Health Organization; 1985.

112. 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(12):2866–70.

113. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Indicator Amino Acid Oxidation: Concept and Application. J Nutr 2008;138(2):243–6.

114. Dewey KG, Beaton G, Fjeld C, Lönnerdal B, Reeds P. Protein requirements of infants and children. Eur J Clin Nutr 1996;50 Suppl 1:S119-147; discussion S147-150.

115. Widdowson EM, Southgate DAT, Hey EN. Body Composition of the Fetus and Infant. In: Visser HKA, editor. Nutrition and Metabolism of the Fetus and Infant: Rotterdam 11–13 October 1978. Dordrecht: Springer Netherlands; 1979. page 169–77.

116. IoM (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. National Academies Press. Washington D.C., USA. 2005;

117. Bujnowski D, Xun P, Daviglus ML, Van Horn L, He K, Stamler J. Longitudinal Association between Animal and Vegetable Protein Intake and Obesity among Men in the United States: The Chicago Western Electric Study. J Am Diet Assoc 2011;111(8):1150-1155.e1.

118. Vergnaud A-C, Norat T, Mouw T, Romaguera D, May AM, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Macronutrient Composition of the Diet and Prospective Weight Change in Participants of the EPIC-PANACEA Study. PLOS ONE 2013;8(3):e57300.

119. Ministère des Solidarités et de la Santé. Programme National Nutrition Santé 2019-2023 [Internet]. 2019. Available from: https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/pnns4_2019-2023.pdf

120. 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 Res Int 2018;107:423–36.

121. Dupont D, Alric M, Blanquet-Diot S, Bornhorst G, Cueva C, Deglaire A, et al. Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? Crit Rev Food Sci Nutr 2019;59(10):1546–62.

122. Rutherfurd, S M, Fanning, A C, Miller, B J, Moughan, P J. Protein digestibility-corrected amino acid scores and digestible indispensable amino acid scores differentially describe protein quality in growing male rats. J Nutr 2015;145(2):372–9.

123. Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, et al. Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. Gastroenterology 2002;123(1):50–9.

124. 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). Br J Nutr 2017;117(4):490–9.

125. Morens C, Bos C, Pueyo ME, Benamouzig R, Gausserès N, Luengo C, et al. Increasing Habitual Protein Intake Accentuates Differences in Postprandial Dietary Nitrogen Utilization between Protein Sources in Humans. J Nutr 2003;133(9):2733–40.

126. Bos C, Juillet B, Fouillet H, Turlan L, Daré S, Luengo C, et al. Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. Am J Clin Nutr 2005;81(1):87–94.

127. Magali Lacroix, Cécile Bos, Joëlle Léonil, Gheorge Airinei, Catherine Luengo, Sophie Daré, 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.

128. Levesque CL, Moehn S, Pencharz PB, Ball RO. Review of advances in metabolic bioavailability of amino acids. Livest Sci 2010;133(1–3):4–9.

129. Millward DJ, Layman DK, Tomé D, Schaafsma G. Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. Am J Clin Nutr 2008;87(5):1576S–1581S.

130. Chapman, D G, Castillo, R, Campbell, J A. Evaluation of protein in foods: 1. A method for the determination of protein efficiency ratios. Can J Biochem Physiol 1959;37.

131. Government of Canada CFIA. Elements within the Nutrition Facts Table [Internet]. [cited 2020 Jan 2];Available from: https://www.inspection.gc.ca/food/requirements-and-guidance/labelling/industry/nutrition-labelling/elements-within-the-nutrition-facts-table/eng/1389206763218/1389206811747?chap=7#s10c7

132. Deglaire A, Moughan PJ. Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. Br J Nutr 2012;108(S2):S273–81.

133. Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, et al. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. Am J Physiol-Endocrinol Metab 2001;280(2):E340–8.

134. Mahé S, Roos N, Benamouzig R, Davin L, Luengo C, Gagnon L, et al. Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. Am J Clin Nutr 1996;63(4):546–52.

135. Fouillet H, Mariotti F, Gaudichon C, Bos C, Tomé D. Peripheral and Splanchnic Metabolism of Dietary Nitrogen Are Differently Affected by the Protein Source in Humans as Assessed by Compartmental Modeling. J Nutr 2002;132(1):125–33.

136. Linn T, Santosa B, Grönemeyer D, Aygen S, Scholz N, Busch M, et al. Effect of long-term dietary protein intake on glucose metabolism in humans. Diabetologia 2000;43(10):1257–65.

137. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. Nat Med 2011;17(4):448–53.

138. Pye, K.M., Wakefield, A.P., Aukema, H.M. High Mixed Protein Diet Reduces Body Fat without Altering the Mechanical Properties of Bone in Female Rats. J Nutr 2009;139:2099–2105.

139. Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. Br J Nutr 2003;89(2):239–48.

140. Bohé J, Low A, Wolfe RR, Rennie MJ. Human Muscle Protein Synthesis is Modulated by Extracellular, Not Intramuscular Amino Acid Availability: A Dose-Response Study. J Physiol 2003;552(1):315–24.

141. Nair KS, Short KR. Hormonal and Signaling Role of Branched-Chain Amino Acids. J Nutr 2005;135(6):1547S-1552S.

142. Barzel US, Massey LK. Excess Dietary Protein Can Adversely Affect Bone. J Nutr 1998;128(6):1051–3.

143. Cao JJ, Johnson LK, Hunt JR. A Diet High in Meat Protein and Potential Renal Acid Load Increases Fractional Calcium Absorption and Urinary Calcium Excretion without Affecting Markers of Bone Resorption or Formation in Postmenopausal Women. J Nutr 2011;141(3):391–7.

144. FAO. Amino-Acid content of foods and biological data on proteins. FAO food and nutrition series [Internet]. 1970;Available from: http://www.fao.org/3/AC854T/AC854T00.htm#TOC

145. Sarwar G, Sosulski FW, Bell JM, Bowland JP. Nutritional Evaluation of Oilseeds and Legumes as Protein Supplements to Cereals. In: Friedman M, editor. Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins. Boston, MA: Springer US; 1978. page 415–41.

146. Mangels R, Group VR, Messina V, Messina M. The Dietitian's Guide to Vegetarian Diets: Issues and Applications. Jones & Bartlett Learning; 2004.

147. Katz DL, Doughty KN, Geagan K, Jenkins DA, Gardner CD. Perspective: The public health case for modernizing the definition of protein quality. Adv Nutr 2019;10(5):755–764.

148. Cruz GADR, Gomes MRA. Protein Quality and in Vivo Digestibility of Different Varieties of Bean (Phaseolus vulgaris L.) Qualidade da Proteína. 2003.

149. Acevedo-Pacheco L, Serna-Saldívar SO. In vivo protein quality of selected cereal-based staple foods enriched with soybean proteins. Food Nutr Res 2016;60(1):31382.

150. Nosworthy MG, Neufeld J, Frohlich P, Young G, Malcolmson L, House JD. Determination of the protein quality of cooked Canadian pulses. Food Sci Nutr 2017;5(4):896–903.

151. Young VR, Fajardo L, Murray E, Rand WM, Scrimshaw NS. Protein requirements of man: Comparative nitrogen balance response within the submaintenance-to-maintenance range of intakes of wheat and beef proteins. J Nutr 1975;105(5):534–542.

152. Bos C, Airinei G, Mariotti F, Benamouzig R, Bérot S, Evrard J, et al. The Poor Digestibility of Rapeseed Protein Is Balanced by Its Very High Metabolic Utilization in Humans. J Nutr 2007;137(3):594–600.

153. Oberli M, Marsset-Baglieri A, Airinei G, Santé-Lhoutellier V, Khodorova N, Rémond D, 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(10):2221–8.

154. Mariotti F, Pueyo ME, Tome D, Berot S, Benamouzig R, Mahe S. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. 2001;131:1706–1713.

155. Mariotti F, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Daré S, Gaudichon C, et al. Nutritional Value of [15N]-Soy Protein Isolate Assessed from Ileal Digestibility and Postprandial Protein Utilization in Humans. J Nutr 1999;129(11):1992–7.

156. 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 15N-labelled proteins. Br J Nutr 2002;87(4):315–23.

157. Calvez J, Benoit S, Piedcoq J, Khodorova N, Azzout-Marniche D, Tomé D, et al. Very low ileal nitrogen and amino acid digestibility of zein compared to whey protein isolate in healthy volunteers. Am J Clin Nutr 2020;nqaa274.

158. Le Gall M, Quillien L, Guéguen J, Rogniaux H, Sève B. Identification of Dietary and Endogenous Ileal Protein Losses in Pigs by Immunoblotting and Mass Spectrometry. J Nutr 2005;135(5):1215–22.

159. 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(S2):S315–32.

160. Grala W, Verstegen MWA, Jansman AJM, Huisman J, van Leeuwen P. Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soyabean products, peas or rapeseed hulls. Anim Feed Sci Technol 1999;80(3–4):231–45.

161. Friedman M, Brandon DL. Nutritional and Health Benefits of Soy Proteins. J Agric Food Chem 2001;49(3):1069–86.

162. Ravindran V, Cabahug S, Ravindran G, Bryden W. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. Poult Sci 1999;78(5):699–706.

163. Torre M, Rodriguez AR, Saura-Calixto F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. Crit Rev Food Sci Nutr 1991;30(1):1–22.

164. Vaintraub IA, Bulmaga VP. Effect of phytate on the in vitro activity of digestive proteinases. J Agric Food Chem 1991;39(5):859–61.

165. Reddy, N. R. Occurrence, distribution, content and dietary intake of phytate. In: Food Phytates. NR Reddy and SK Sethe, editors, FL: CRC Press; 2001. page 25–52.

166. Gilani GS, Sepehr E. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. J Nutr 2003;133(1):220–225.

167. Pellett PL. World Essential Amino Acid Supply with Special Attention to South-East Asia. Food Nutr Bull 1996;17(3):1–31.

168. Sarwar, G. Digestibility of protein and bioavailability of amino acids in foods. World Rev Nutr Diet 1987;54:26–70.

169. Gilani GS, Cockell KA, Sepehr E. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acid availability in foods. J AOAC Int 2005;88(3):967–87.

170. Tessier R, Calvez J, Khodorova N, Gaudichon C. Protein and amino acid digestibility of 15N Spirulina in rats. Eur J Nutr [Internet] 2020 [cited 2020 Dec 16];Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00394-020-02368-0

171. Oberli M, Lan A, Khodorova N, Santé-Lhoutellier V, Walker F, Piedcoq J, 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(8):1506–13.

172. Han F, Han F, Wang Y, Fan L, Song G, Chen X, et al. Digestible indispensable amino acid scores of nine cooked cereal grains. Br J Nutr 2019;121(1):30–41.

173. Oliveira MSF, Htoo JK, Stein HH. The direct and difference procedures result in similar estimates for amino acid digestibility in feed ingredients fed to growing pigs. J Anim Sci 2020;98(8):skaa225.

174. 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(12):1752–9.

175. Reynaud Y, Buffière C, Cohade B, Vauris M, Liebermann K, Hafnaoui N, et al. True ileal amino acid digestibility and digestible indispensable amino acid scores (DIAASs) of plant-based protein foods. Food Chem 2021;338:128020.

176. 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. J Nutr 2005;135(3):404–9.

177. Gausserès N, Mahé S, Benamouzig R, Luengo C, Drouet H, Rautureau J, et al. The gastro-ileal digestion of 15 N-labelled pea nitrogen in adult humans. Br J Nutr 1996;76(1):75–85.

178. Bos C, Mahé S, Gaudichon C, Benamouzig R, Gausserès N, Luengo C, et al. Assessment of net postprandial protein utilization of 15N-labelled milk nitrogen in human subjects. Br J Nutr 1999;81(3):221–6.

179. Evenepoel P, Geypens B, Luypaerts A, Hiele M, Ghoos Y, Rutgeerts P. Digestibility of Cooked and Raw Egg Protein in Humans as Assessed by Stable Isotope Techniques. J Nutr 1998;128(10):1716–22.

180. 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(S2):S183–211.

181. 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. J Nutr 1997;127(5):758–64.

182. Jørgensen H, Brandt K, Lauridsen C. Year rather than farming system influences protein utilization and energy value of vegetables when measured in a rat model. Nutr Res 2008;28(12):866–78.

183. Ruales, J., Nair, B. M. Nutritional quality of the protein in quinoa (Chenopodium quinoa, Willd) seeds. Plant Foods Human Nutr 1992;42:1–11.

184. Tessier R, Khodorova N, Calvez J, Kapel R, Quinsac A, Piedcoq J, et al. 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 2019;00:1–8.

185. Gatel F. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. Anim Feed Sci Technol 1994;45(3):317–48.

186. Rackis JJ. Biological and physiological factors in soybeans. J Am Oil Chem Soc 1974;51(1Part2):161A-174A.

187. Wu, Williams WP, Kunkel ME, Acton JC, Huang Y, Wardlaw FB, et al. Amino Acid Availability and Availability-Corrected Amino Acid Score of Red Kidney Beans (Phaseolus vulgaris L.). J Agric Food Chem 1996;44(5):1296–301.

188. Lewis JH, Taylor FHL. Comparative Utilization of Raw and Autoclaved Soy Bean Protein by the Human. Proc Soc Exp Biol Med 1947;64(1):85–7.

189. Batista, KA, Prudêncio, SH, Fernandes, KF. Changes in the Functional Properties and Antinutritional Factors of Extruded Hard-To-Cook Common Beans (Phaseolus Vulgaris, L.). J. Food Sci.2010;

190. Yagoub AA, Abdalla AA. Effect of domestic processing methods on chemical composition, in vitro digestibility of protein and starch and functional properties of bambara groundnut (Voandzeia subterranea) seed. Res J Agric Biol Sci 2007;3(1):24–34.

191. Kannan S, Nielsen SS, Mason AC. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores for Bean and Bean−Rice Infant Weaning Food Products. J Agric Food Chem 2001;49(10):5070–4.

192. Uppal V, Bains K. Effect of germination periods and hydrothermal treatments on in vitro protein and starch digestibility of germinated legumes. J Food Sci Technol 2012;49(2):184–91.

193. Wada Y, Lönnerdal B. Effects of Different Industrial Heating Processes of Milk on Site-Specific Protein Modifications and Their Relationship to in Vitro and in Vivo Digestibility. J Agric Food Chem 2014;62(18):4175–85.

194. Rutherfurd SM, Moughan PJ, van Osch L. Digestible reactive lysine in processed feedstuffs: Application of a new bioassay. J Agric Food Chem 1997;45(4):1189–1194.

195. González-Vega JC, Kim BG, Htoo JK, Lemme A, Stein HH. Amino acid digestibility in heated soybean meal fed to growing pigs1. J Anim Sci 2011;89(11):3617–25.

196. Erbersdobler HF. Nutritional Impact of Food Processing. Bibl Nutr Dieta 1989;43:140–155.

197. Csapó J, Albert C, Csapó-Kiss Z. The D-amino acid content of foodstuffs. Acta Univ Sapientiae Aliment 2009;2:5–30.

198. de Vrese M, Frik R, Roos N, Hagemeister H. Protein-Bound D-Amino Acids, and to a Lesser Extent Lysinoalanine, Decrease True Ileal Protein Digestibility in Minipigs as Determined with 15N-Labeling. J Nutr 2000;130(8):2026–31.

199. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT [Internet]. 2017;Available from: www.fao.org/faostat/en/#home

200. Bourgeois M, Jacquin F, Cassecuelle F, Savois V, Belghazi M, Aubert G, et al. A PQL (protein quantity loci) analysis of mature pea seed proteins identifies loci determining seed protein composition. PROTEOMICS 2011;11(9):1581–94.

201. Tzitzikas EN, Vincken J-P, de Groot J, Gruppen H, Visser RGF. Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition. J Agric Food Chem 2006;54(2):425–33.

202. Dahl WJ, Foster LM, Tyler RT. Review of the health benefits of peas (Pisum sativum L.). Br J Nutr 2012;108(S1):S3–10.

203. Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. Plant Cell 1995;7(7):945–56.

204. 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(1):107–110.

205. Boye J, Zare F, Pletch A. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. Food Res Int 2010;43(2):414–31.

206. Tömösközi S, Lásztity R, Haraszi R, Baticz O. Isolation and study of the functional properties of pea proteins. Food Nahr 2001;45(6):399–401.

207. Mondor M, Aksay S, Drolet H, Roufik S, Farnworth E, Boye JI. Influence of processing on composition and antinutritional factors of chickpea protein concentrates produced by isoelectric precipitation and ultrafiltration. Innov Food Sci Emerg Technol 2009;10(3):342–7.

208. Rubio LA, Pérez A, Ruiz R, Guzmán MÁ, Aranda-Olmedo I, Clemente A. Characterization of pea (Pisum sativum) seed protein fractions. J Sci Food Agric 2014;94(2):280–7.

209. Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M, Pusztai A. Perspectives into Factors Limiting in Vivo Digestion of Legume Proteins: Antinutritional Compounds or Storage Proteins? J Agric Food Chem 2000;48(3):742–9.

210. Crévieu I, Carré, B, Chagneau A-M, Quillien L, Guéguen J, Bérot S. Identification of Resistant Pea (Pisum sativum L.) Proteins in the Digestive Tract of Chickens. J Agric Food Chem 1997;45(4):1295–300.

211. Yang H, Guérin-Deremaux L, Zhou L, Fratus A, Wils D, Zhang C, et al. Evaluation of nutritional quality of a novel pea protein. Agro Food Ind Hi-Tech 2012;23(8):10.

212. Adam CL, Gratz SW, Peinado DI, Thomson LM, Garden KE, Williams PA, et al. Effects of Dietary Fibre (Pectin) and/or Increased Protein (Casein or Pea) on Satiety, Body Weight, Adiposity and Caecal Fermentation in High Fat Diet-Induced Obese Rats. PLOS ONE 2016;11(5):e0155871.

213. Overduin J, Guérin-Deremaux L, Wils D, Lambers TT. NUTRALYS pea protein: characterization of in vitro gastric digestion and in vivo gastrointestinal peptide responses relevant to satiety. Food Nutr Res 2015;59(1):25622.

214. Re R, Pombo S, Calame W, Lefranc-Millot C, Guérin-Deremaux L. The satiating effect of NUTRALYS® pea protein leads to reduced energy intake in healthy humans. J Nutr Health Food Sci 2016;4(3):1–10.

215. Smith CE, Mollard RC, Luhovyy BL, Anderson GH. The effect of yellow pea protein and fibre on short-term food intake, subjective appetite and glycaemic response in healthy young men. Br J Nutr 2012;108(S1):S74–80.

216. Tan S-Y, Siow PC, Peh E, Henry CJ. Influence of rice, pea and oat proteins in attenuating glycemic response of sugar-sweetened beverages. Eur J Nutr 2018;57(8):2795–803.

217. Li H, Prairie N, Udenigwe CC, Adebiyi AP, Tappia PS, Aukema HM, et al. Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. J Agric Food Chem 2011;59(18):9854–60.

218. Troszyńska A, Ciska E. Phenolic compounds of seed coats of white and coloured varieties of pea (Pisum sativum L.) and their total antioxidant activity. Czech J Food Sci 2011;20(No. 1):15–22.

219. 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. J Nutr 2013;143(9):1466–73.

220. Halton TL, Willett WC, Liu S, Manson JE, Albert CM, Rexrode K, et al. Low-carbohydrate-diet score and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 2006;355(19):1991–2002.

221. Jones DB. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. USDA Circ 1941;183:1–21.

222. Sosulski FW, Imafidon GI. Amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors for animal and plant foods. J Agric Food Chem 1990;38(6):1351–6.

223. Sarwar G, Christensen DA, Finlayson AJ, Friedman M, Hackler LR, Mackenzie SL, et al. Inter- and Intra-Laboratory Variation in Amino Acid Analysis of Food Proteins. J Food Sci 1983;48(2):526–31.

224. Mosse J. Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. J Agric Food Chem 1990;38(1):18–24.

225. Tkachuk R. Nitrogen-to-protein conversion factors for cereals and oilseed meals. Cereal Chem 1969;46:419–24.

226. Morr CV. Recalculated Nitrogen Conversion Factors for Several Soybean Protein Products. J Food Sci 1982;47(5):1751–2.

227. United States Department of Agriculture. Data Laboratory and Agricultural Research Service (2004) USDA National nutrient database for standard refence. Release 17 [Internet]. Available from: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/SR17/sr17.html.

228. Banque du Ciqual (Anses). Table de composition nutritionnelle des aliments [Internet]. Available from: https://ciqual.anses.fr/

229. 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. Nutr Rev 2016;74(9):584–99.

230. Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A, Wolfe RR. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. Am J Physiol-Endocrinol Metab 2006;291(2):E381–7.

231. Daenzer M, Petzke KJ, Bequette BJ, Metges CC. Whole-Body Nitrogen and Splanchnic Amino Acid Metabolism Differ in Rats Fed Mixed Diets Containing Casein or Its Corresponding Amino Acid Mixture. J Nutr 2001;131(7):1965–72.

232. Melina V, Craig W, Levin S. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Vegetarian Diets. J Acad Nutr Diet 2016;116(12):1970–80.

233. Mariotti, Gardner. Dietary Protein and Amino Acids in Vegetarian Diets—A Review. Nutrients 2019;11(11):2661.

234. Clarys P, Deliens T, Huybrechts I, Deriemaeker P, Vanaelst B, De Keyzer W, et al. Comparison of Nutritional Quality of the Vegan, Vegetarian, Semi-Vegetarian, Pesco-Vegetarian and Omnivorous Diet. Nutrients 2014;6(3):1318–32.

235. Allès B, Baudry J, Méjean C, Touvier M, Péneau S, Hercberg S, et al. Comparison of Sociodemographic and Nutritional Characteristics between Self-Reported Vegetarians, Vegans, and Meat-Eaters from the NutriNet-Santé Study. Nutrients 2017;9(9):1023.

236. Bodwell CE, Satterlee LD, Hackler LR. Protein digestibility of the same protein preparations by human and rat assays and by in vitro enzymic digestion methods. Am J Clin Nutr 1980;33(3):677–86.

237. Rich N, Satterlee LD, Smith JL. A comparison of in vivo apparent protein digestibility in man and rat to in vitro protein digestibility as determined using human and rat pancreatins and commercially available proteases. Nutr Rep Int 1980;21(2):285–300.

238. Marletta L, Carbonaro M, Carnovale E. In-vitro protein and sulphur amino acid availability as a measure of bean protein quality. J Sci Food Agric 1992;59(4):497–504.

239. Fuller MF, Milne A, Harris CI, Reid TM, Keenan R. Amino acid losses in ileostomy fluid on a protein-free diet. Am J Clin Nutr 1994;59(1):70–3.

240. Mahe S, Huneau JF, Marteau P, Thuillier F, Tome D. Gastroileal nitrogen and electrolyte movements after bovine milk ingestion in humans. Am J Clin Nutr 1992;56(2):410–416.

241. Schaafsma G. Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. Br J Nutr 2012;108(S2):S333–6.

242. Libao-Mercado AJO, Zhu CL, Cant JP, Lapierre H, Thibault J-N, Sève B, et al. Dietary and Endogenous Amino Acids Are the Main Contributors to Microbial Protein in the Upper Gut of Normally Nourished Pigs. J Nutr 2009;139(6):1088–94.

243. Jensen BB, Jørgensen H. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. Appl Environ Microbiol 1994;60(6):1897–904.

244. Darragh AJ, Hodgkinson SM. Quantifying the Digestibility of Dietary Protein. J Nutr 2000;130(7):1850S-1856S.

245. Sauer WC, Stothers SC, Parker RJ. Apparent and true availabilities of amino acids in wheat and milling by-products for growing pigs. Can J Anim Sci 1977;57(4):775–84.

246. 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(1):61–5.

247. 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(01):29.

248. Darcy-Vrillon B, Souffrant W, Laplace J, Rérat A, Corring T, Vaugelade P, et al. Exogenous and endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. II. Ileal and faecal digestibilities and absorption of amino acids. Reprod Nutr Dev 1991;31(5):561–73.

249. Darragh AJ, Moughan PJ. The Three-Week-Old Piglet as a Model Animal for Studying Protein Digestion in Human Infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995;21(4):387–393.

250. Forsum E, Göranzon H, Rundgren M, Thilén M, Hambraeus L. Protein Evaluation of Mixed Diets: Comparative Study in Man and in the Pig and Rat of Vegetable-Animal and Vegetable Protein Diets. Ann Nutr Metab 1981;25(3):137–50.

251. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. Food Chem Toxicol 2001;39(3):209–28.

252. Fuller MF, Reeds PJ. Nitrogen Cycling in the Gut. Annu Rev Nutr 1998;18(1):385–411.

253. 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(S2):S247–57.

254. Rutherfurd 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(7–8):292–300.

255. Donkoh A, Moughan PJ, Smith WC. The laboratory rat as a model animal for determining ileal amino acid digestibility in meat and bone meal for the growing pig. Anim Feed Sci Technol 1994;49(1):57–71.

256. Sales J, Janssens GPJ. Acid-insoluble ash as a marker in digestibility studies: a review. J Anim Feed Sci 2003;12(3):383–401.

257. Rutherfurd, S M, Moughan, P J. The Digestible Amino Acid Composition of Several Milk Proteins: Application of a New Bioassay. J Dairy Sci 1997;81:909–17.

258. Fuller MF, Tomé D. In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. J AOAC Int 2005;88(3):923–34.

259. Kim BG, Lee SA, Park KR, Stein HH. At least three days of adaptation are required before indigestible markers (chromium, titanium, and acid insoluble ash) are stabilized in the ileal digesta of 60-kg pigs, but values for amino acid digestibility are affected by the marker. J Anim Sci 2020;

260. Kavanagh S, Lynch PB, O'Mara F, Caffrey PJ. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. Anim Feed Sci Technol 2001;89(1):49–58.

261. Mroz Z, Bakker GCM, Jongbloed AW, Dekker RA, Jongbloed R, van Beers A. Apparent digestibility of nutrients in diets with different energy density, as estimated by direct and marker methods for pigs with or without ileo-cecal cannulas. J Anim Sci 1996;74(2):403–12.

262. Boutry C, Chevalier L, Fouillet H, Fénart E, Evrard J, Gaudichon C, et al. Effect of rapeseed protein on postprandial tissue protein metabolism in rats. Proc Nutr Soc 2008;67(OCE5).

263. Bergen WG. Contribution of Research with Farm Animals to Protein Metabolism Concepts: A Historical Perspective. J Nutr 2007;137(3):706–10.

264. Guilloteau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? Nutr Res Rev 2010;23(1):4–22.

265. Stein HH, Shipley CF, Easter RA. Technical note: a technique for inserting a T-cannula into the distal ileum of pregnant sows. J Anim Sci 1998;76(5):1433–6.

266. Bax M-L, Buffière C, Hafnaoui N, Gaudichon C, Savary-Auzeloux I, Dardevet D, et al. 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(4):e61252.

267. Sauer, W.C., Fan, M.Z., Mosenthin, R. Methods for measuring ileal digestibility in pigs. In: Farm Animal Metabolism and Nutrition, pp. 279–306 [JPF D'Mello, editor]. Wallingford, UK: CAB International. Wallingford, UK: CABI; 2000. page 279–306.

268. Le Gall M, Quillien L, Sève B, Guéguen J, Lallès JP. Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (Pisum sativum L.) lectin and pea albumin 21. J Anim Sci 2007;85(11):2972–81.

269. Tamminga S, Schulze H, Van Bruchem J, Huisman J. The nutritional significance of endogenous N-losses along the gastro-intestinal tract of farm animals. Arch Tierernahr 1995;48(1–2):9–22.

270. Nyachoti, C M, de Lange, C F M, McBride, B W, Schulze, H. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. Can J Anim Sci 1997;77(1):149–63.

271. 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. Anim Feed Sci Technol 2002;98(1–2):49–60.

272. Fan MZ, Sauer WC, Hardin RT, Lien KA. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in pigs: effect of dietary amino acid level1. J Anim Sci 1994;72(11):2851–9.

273. Columbus D. Evidence for validity of ileal digestibility coefficients in monogastrics. Br J Nutr :9.

274. Wykes LJ, Fiorotto M, Burrin DG, Del Rosario M, Frazer ME, Pond WG, et al. Chronic Low Protein Intake Reduces Tissue Protein Synthesis in a Pig Model of Protein Malnutrition. J Nutr 1996;126(5):1481–8.

275. Butts CA, Moughan PJ, Smith WC. Endogenous amino acid flow at the terminal ileum of the rat determined under conditions of peptide alimentation. J Sci Food Agric 1991;55(2):175–187.

276. Leterme P, Monmart T, Théwis A, Morandi P. Effect of Oral and Parenteral N Nutrition vs N-Free Nutrition on the Endogenous Amino Acid Flow at the Ileum of the Pig. J Sci Food Agric 1996;71(2):265–71.

277. Moughan PJ, Leenaars GSM. Endogenous amino acid flow in the stomach and small intestine of the young growing pig. J Sci Food Agric 1992;60(4):437–42.

278. Moughan PJ, Butts CA, Rowan AM, Deglaire A. Dietary peptides increase endogenous amino acid losses from the gut in adults. Am J Clin Nutr 2005;81(6):1359–65.

279. de Lange CFM, Sauer WC, Mosenthin R, Souffrant WB. The Effect of Feeding Different Protein-Free Diets on the Recovery and Amino Acid Composition of Endogenous Protein Collected from the Distal Ileum and Feces in Pigs. J Anim Sci 1989;67(3):746–54.

280. Moughan PJ, Souffrant WB, Hodgkinson SM. Physiological approaches to determining gut endogenous amino acid flows in the mammal. Arch Für Tierernaehrung 1998;51(2–3):237–52.

281. Leterme P, Théwis A, François E, Van Leeuwen P, Wathelet B, Huisman J. The Use of 15N-Labeled Dietary Proteins for Determining True Ileal Amino Acid Digestibilities Is Limited by Their Rapid Recycling in the Endogenous Secretions of Pigs. J Nutr 1996;126(9):2188–98.

282. Gaudichon C, Mahé S, Luengo C, Laurent C, Meaugeais P, Krempf M, et al. A 15N-leucine-dilution method to measure endogenous contribution to luminal nitrogen in the human upper jejunum. Eur J Clin Nutr 1996;50:261–268.

283. Hess V, Thibault JN, 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(11):1969–77.

284. 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(2):123–30.

285. Moter V, Stein HH. Effect of feed intake on endogenous losses and amino acid and energy digestibility by growing pigs,. J Anim Sci 2004;82(12):3518–25.

286. Hess V, Sève B. Effects of body weight and feed intake level on basal ileal endogenous losses in growing pigs. J Anim Sci 1999;77(12):3281–8.

287. Schulze H, Verstegen MWA, Tamminga S, Huisman J. Endogenous ileal nitrogen losses in pigs: dietary factors [Internet]. 1994 [cited 2020 Aug 26]. Available from: http://edepot.wur.nl/205158

288. Baglieri A, Mahé S, Benamouzig R, Savoie L, Tomé D. Digestion Patterns of Endogenous and Different Exogenous Proteins Affect the Composition of Intestinal Effluents in Humans. J Nutr 1995;125(7):1894–903.

289. Ansia I, Stein HH, Vermeire DA, Brøkner C, Drackley JK. Ileal digestibility and endogenous protein losses of milk replacers based on whey proteins alone or with an enzyme-treated soybean meal in young dairy calves. J Dairy Sci 2020;103(5):4390–407.

290. Miner-Williams W, Deglaire A, Benamouzig R, Fuller MF, Tomé D, Moughan PJ. Endogenous proteins in the ileal digesta of adult humans given casein-, enzyme-hydrolyzed casein- or crystalline amino-acid-based diets in an acute feeding study. Eur J Clin Nutr 2014;68(3):363–9.

291. Metges CC, Petzke KJ, El-Khoury AE, Henneman L, Grant I, Bedri S, et al. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. Am J Clin Nutr 1999;70(6):1046–58.

292. Rowan, A. M., Moughan, P. J., Wilson, M. N. 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.

293. Bos C, Metges CC, Gaudichon C, Petzke KJ, Pueyo ME, Morens C, et al. Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans. J Nutr 2003;133(5):1308–15.

294. Mahé S, Fauquant J, Gaudichon C, Roos N, Maubois JL, Tome D. 15N-Labelling and preparation of milk, casein and whey proteins. Le Lait 1994;74(4):307–12.

295. Fromentin C, Sanders P, Nau F, Anton M, Fromentin G, Tomé D, et al. A pilot study for the intrinsic labeling of egg proteins with 15N and 13C. Rapid Commun Mass Spectrom 2012;26(1):43–8.

296. van Vliet S, Beals JW, Parel JT, Hanna CD, Utterback PL, Dilger AC, et al. Development of Intrinsically Labeled Eggs and Poultry Meat for Use in Human Metabolic Research. J Nutr 2016;146(7):1428–33.

297. Pennings B, Pellikaan WF, Senden JMG, van Vuuren AM, Sikkema J, van Loon LJC. The production of intrinsically labeled milk and meat protein is feasible and provides functional tools for human nutrition research. J Dairy Sci 2011;94(9):4366–73.

298. Boirie Y, Fauquant J, Rulquin H, Maubois JL, Beaufrère B. Production of large amounts of [13C]leucine-enriched milk proteins by lactating cows. J Nutr 1995;125(1):92–8.

299. Vince A, O'Grady F, Dawson AM. The Development of Ileostomy Flora. J Infect Dis 1973;128(5):638–41.

300. Gorjbach SL, Nahas L, Weinstein L, Levitan R, Patterson JF. Studies of intestinal microflora. IV. The microflora of ileostomy effluent: a unique microbial ecology. Gastroenterology 1967;53(6):874–80.

301. van der Wielen N, Khodorova NV, Gerrits WJJ, Gaudichon C, Calvez J, Tomé D, et al. Blood 15N:13C Enrichment Ratios Are Proportional to the Ingested Quantity of Protein with the Dual-Tracer Approach for Determining Amino Acid Bioavailability in Humans. J Nutr 2020;150(9):2346–52.

302. 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(6):1024–32.

303. Gilani GS, Peace RW, Botting HG, Brulé D. Digestibility of protein and amino acids in selected foods as determined by a rat balance method. Plant Foods Hum Nutr 1989;39(1):23–32.

304. Rutherfurd SM, Bains K, Moughan PJ. Available lysine and digestible amino acid contents of proteinaceous foods of India. Br J Nutr 2012;108(S2):S59–68.

305. Eggum BO, Juliano BO, Villareal CP, Perez CM. Effect of treatment on composition and protein and energy utilization of rice and mung bean by rats. Plant Foods Hum Nutr 1984;34(4):261–72.

306. Willett W, Rockström J, Loken B, Springmann M, Lang T, Vermeulen S, et al. Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. The Lancet 2019;393(10170):447–92.

307. Kusch-Brandt S. Towards More Sustainable Food Systems— 14 Lessons Learned. Int J Env Res Public Health 2020;8.

308. Meybeck A, Gitz V. Sustainable diets within sustainable food systems. Proc Nutr Soc 2017;76(1):1–11.

309. Guillin FM, Gaudichon C, Guérin-Deremaux L, Lefranc-Millot C, Azzout-Marniche D, Khodorova N, et al. Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine. Br J Nutr 2020;1–9.

310. Tessier R. 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. 2020;

311. Rutherfurd 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. page 11.9.1-11.9.37.

312. Fernandez SR, Parsons CM. Bioavailability of the Digestible Lysine and Valine in Cottonseed and Soybean Meals for Chicks. Poult Sci 1996;75(2):216–23.

313. Pahm AA, Pedersen C, Stein HH. Application of the Reactive Lysine Procedure To Estimate Lysine Digestibility in Distillers Dried Grains with Solubles Fed to Growing Pigs. J Agric Food Chem 2008;56(20):9441–6.

314. Fox PF, McSweeney PLH, editors. Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A / Part B [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2003 [cited 2021 Jan 28]. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8602-3

315. Young VR, Puig M, Queiroz E, Scrimshaw NS, Rand WM. Evaluation of the protein quality of an isolated soy protein in young men: relative nitrogen requirements and effect of methionine supplementation. Am J Clin Nutr 1984;39:16–24.

316. Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL. A method of expressing numerically the growth-promoting value of proteins. J Biol Chem 1919;37(2):223–9.

317. Mansilla WD, Marinangeli CPF, Cargo-Froom C, Franczyk A, House JD, Elango R, et al. Comparison of methodologies used to define the protein quality of human foods and support regulatory claims. Appl Physiol Nutr Metab 2020;45(9):917–26.

318. Bajaj S, Mickelson O, Lillevik HA, Baker LR, Bergen WG, Gill JL. Prediction of protein efficiency ratio of peas from their albumin content 1. Crop Sci 1971;11(6):813–5.

319. US Department of Agriculture. Food Data Central [Internet]. 2019;Available from: https://fdc.nal.usda.gov/

320. Food and Drug Administration (FDA). U.S Food and Drug Administration. 21CFR101.9. 2018. Silver springs, Md.

321. Moughan PJ. Modelling protein metabolism in the pig - critical evaluation of a simple reference model. Model Growth Pig 1995;103–12.

322. Gahl MJ, Finke MD, Crenshaw TD, Benevenga NJ. Use of a four-parameter logistic equation to evaluate the response of growing rats to ten levels of each indispensable amino acid. J Nutr 1991;121(11):1720–1729.

323. National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Third revised edition, 1978 [Internet]. Washington, D.C.: National Academies Press; 1978 [cited 2019 May 2]. Available from: https://www.nap.edu/catalog/20047

324. Jagger S, Wiseman J, Cole DJA, Craigon J. Evaluation of inert markers for the determination of ileal and faecal apparent digestibility values in the pig. Br J Nutr 1992;68(3):729–39.

325. Wang T, Adeola O. Digestibility index marker type, but not inclusion level affects apparent digestibility of energy and nitrogen and marker recovery in growing pigs regardless of added oat bran1. J Anim Sci 2018;96(7):2817–25.

326. Olukosi OA, Bolarinwa OA, Cowieson AJ, Adeola O. Marker type but not concentration influenced apparent ileal amino acid digestibility in phytase-supplemented diets for broiler chickens and pigs1. J Anim Sci 2012;90(12):4414–20.

327. Köhler T, Huisman J, Hartog LAD, Mosenthin R. Comparison of different digesta collection methods to determine the apparent digestibilities of the nutrients at the terminal ileum in pigs. J Sci Food Agric 1990;53(4):465–75.

328. Snipes RL. Anatomy of the cecum of the laboratory mouse and rat. Anat Embryol (Berl) 1981;162(4):455–74.

329. Lacroix M, Léonil J, Bos C, Henry G, Airinei G, Fauquant J, et al. Heat Markers and Quality Indexes of Industrially Heat-Treated [15N] Milk Protein Measured in Rats. J Agric Food Chem 2006;54(4):1508–17.

330. Oberli M, Douard V, Beaumont M, Jaoui D, Devime F, Laurent S, 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(2):1700570.

331. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson M-P, Maubois J-L, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. Proc Natl Acad Sci 1997;94(26):14930–5.

332. Yin Y-L, McEvoy JDG, Schulze H, McCracken KJ. Studies on cannulation method and alternative indigestible markers and the effects of food enzyme supplementation in barley-based diets on ileal and overall apparent digestibility in growing pigs. Anim Sci 2000;70(1):63–72.

333. Kavanagh S, Lynch PB, O'Mara F, Caffrey PJ. A comparison of total collection and marker technique for the measurement of apparent digestibility of diets for growing pigs. Anim Feed Sci Technol 2001;89(1–2):49–58.

334. Vicente F, Sarraseca A, de Vega A, Guada JA. Performance of several Cr and Yb analytical techniques applied to samples of different biological origin (digesta or faeces). J Sci Food Agric 2004;84(15):2035–40.

335. Goullé J-P, Saussereau É, Mahieu L, Coulant I, Plougonven S, Guerbet M, et al. Validation du dosage du chrome par ICP-MS avec cellule de collision dans les matrices biologiques et concentrations usuelles. Ann Toxicol Anal 2011;23(4):211–6.

336. García E, Cabrera C, Lorenzo ML, LÓpez MC, SÁnchez J. Estimation of chromium bioavailability from the diet by an in vitro method. Food Addit Contam 2001;18(7):601–6.

337. Gunčaga J, Lentner C, Haas HG. Determination of chromium in feces by atomic absorption spectrophotometry. Clin Chim Acta 1974;57(1):77–81.

338. Rutherfurd SM, Montoya CA, Moughan PJ. Effect of Oxidation of Dietary Proteins with Performic Acid on True Ileal Amino Acid Digestibility As Determined in the Growing Rat. J Agric Food Chem 2014;62(3):699–707.

339. Noack J, Dongowski G, Hartmann L, Blaut M. The Human Gut Bacteria Bacteroides thetaiotaomicron and Fusobacterium varium Produce Putrescine and Spermidine in Cecum of Pectin-Fed Gnotobiotic Rats. J Nutr 2000;130(5):1225–31.

340. Islam KBMS, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, et al. Bile Acid Is a Host Factor That Regulates the Composition of the Cecal Microbiota in Rats. Gastroenterology 2011;141(5):1773–81.

341. Stein HH, Pedersen C, Wirt AR, Bohlke RA. Additivity of values for apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in mixed diets fed to growing pigs. J Anim Sci 2005;83(10):2387–2395.

342. 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. Anim Feed Sci Technol 2002;98(1):49–60.

343. Low AG. Nutrient absorption in pigs. J Sci Food Agric 1980;31(11):1087–1130.

344. Buraczewska L. Secretion of nitrogenous compounds in the small intestine of pigs. Acta Physiol Pol 1979;30:319–26.

345. 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(2):193–8.

346. Gorissen SHM, Trommelen J, Kouw IWK, Holwerda AM, Pennings B, Groen BBL, et al. Protein Type, Protein Dose, and Age Modulate Dietary Protein Digestion and Phenylalanine Absorption Kinetics and Plasma Phenylalanine Availability in Humans. J Nutr 2020;150(8):2041–50.

347. Liu J, Klebach M, Visser M, Hofman Z. Amino Acid Availability of a Dairy and Vegetable Protein Blend Compared to Single Casein, Whey, Soy, and Pea Proteins: A Double-Blind, Cross-Over Trial. Nutrients 2019;11(11):2613.

348. Vangsoe M, Thogersen R, Bertram H, Heckmann L-H, Hansen M. Ingestion of Insect Protein Isolate Enhances Blood Amino Acid Concentrations Similar to Soy Protein in A Human Trial. Nutrients 2018;10(10):1357.

349. Geboes KP, Bammens B, Luypaerts A, Malheiros R, Buyse J, Evenepoel P, et al. Validation of a New Test Meal for a Protein Digestion Breath Test in Humans. J Nutr 2004;134(4):806–10.

350. Rutherfurd SM, Moughan PJ. Available versus digestible dietary amino acids. Br J Nutr 2012;108(S2):S298–305.

351. Deglaire A, Fromentin C, Fouillet H, Airinei G, Gaudichon C, Boutry C, et al. Hydrolyzed dietary casein as compared with the intact protein reduces postprandial peripheral, but not whole-body, uptake of nitrogen in humans. Am J Clin Nutr 2009;90(4):1011–22.

352. Boirie Y, Gachon P, Corny S, Fauquant J, Maubois JL, Beaufrere B. Acute postprandial changes in leucine metabolism as assessed with an intrinsically labeled milk protein. Am J Physiol-Endocrinol Metab 1996;271(6):E1083–91.

353. Wolfe RR, Park S, Kim I-Y, Starck C, Marquis BJ, Ferrando AA, et al. Quantifying the contribution of dietary protein to whole body protein kinetics: examination of the intrinsically labeled proteins method. Am J Physiol-Endocrinol Metab 2019;317(1):E74–84.

354. Bennet WM, Gan-Gaisano MC, Haymond MW. Tritium and 14C isotope effects using tracers of leucine and alpha-ketoisocaproate. Eur J Clin Invest 1993;23(6):350–5.

355. Weber E, Ehrlein H-J. Relationships Between Gastric Emptying and Intestinal Absorption of Nutrients and Energy in Mini Pigs. Dig Dis Sci 1998;43(6):1141–53.

356. Holwerda AM, Lenaerts K, Bierau J, Wodzig WKWH, Loon LJC van. Food ingestion in an upright sitting position increases postprandial amino acid availability when compared with food ingestion in a lying down position. Appl Physiol Nutr Metab [Internet] 2017 [cited 2021 Feb 1];Available from: https://cdnsciencepub.com/doi/abs/10.1139/apnm-2016-0522

357. Rafii M, Pencharz PB, Ball RO, Tomlinson C, Elango R, Courtney-Martin G. Bioavailable Methionine Assessed Using the Indicator Amino Acid Oxidation Method Is Greater When Cooked Chickpeas and Steamed Rice Are Combined in Healthy Young Men. J Nutr 2020;150(7):1834–44.

358. Humayun MA, Elango R, Moehn S, Ball RO, Pencharz PB. Application of the Indicator Amino Acid Oxidation Technique for the Determination of Metabolic Availability of Sulfur Amino Acids from Casein versus Soy Protein Isolate in Adult Men. J Nutr 2007;137(8):1874–9.

359. Prolla IRD, Rafii M, Courtney-Martin G, Elango R, da Silva LP, Ball RO, et al. Lysine from Cooked White Rice Consumed by Healthy Young Men Is Highly Metabolically Available When Assessed Using the Indicator Amino Acid Oxidation Technique. J Nutr 2013;143(3):302–6.

ÉCOLE DOCTORALE
Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES)

Titre : Qualité nutritionnelle de la protéine de pois et développement méthodologique sur la digestibilité des acides aminés chez le rat et chez l'Homme

Mots clés : Protéine de pois – Digestibilité – Isotopes stables – Méthode double traceur – Homme – Rat

Résumé : Pour une alimentation plus durable, il est nécessaire d'identifier des alternatives végétales aux protéines animales. Le pois présente de nombreux avantages, mais sa digestibilité doit être évaluée. Or, l'évaluation de la digestibilité iléale des acides aminés (AA) est sujette à des difficultés méthodologiques. Chez le rat, il n'existe pas de méthode validée. Chez l'Homme, la méthode directe standard est très invasive car elle nécessite de collecter les pertes digestives par intubation. Une nouvelle méthode plasmatique minimalement invasive, dite « double traceur », a été proposée. Elle repose sur l'ingestion simultanée d'une protéine test marquée au ^{2}H et d'une protéine de référence de digestibilité connue, marquée au ^{13}C. Les objectifs de nos travaux étaient : 1) évaluer la qualité nutritionnelle de la protéine de pois jaune en comparaison à la caséine et au gluten par l'étude de la digestibilité et d'autres critères de qualité, chez le rat et chez l'Homme ; 2) développer les méthodes de mesure de la digestibilité iléale des AA dans ces deux modèles. Chez l'Homme, il s'agissait de comparer la méthode double traceur à la méthode directe par l'étude d'isolats protéiques marqués au ^{15}N et au ^{2}H. La digestibilité élevée obtenue pour les AA de la protéine de pois, chez le rat (95%) et chez l'Homme (94%), révèle sa haute qualité nutritionnelle. Sa comparaison à la caséine et au gluten la positionne favorablement parmi l'offre de protéines disponibles. La composition en AA équilibrée de la protéine de pois couplée à sa haute digestibilité a abouti à des scores de qualité DIAAS satisfaisants (1,00 chez l'Homme, 0,88 chez le rat). Chez le rat, nous avons montré que la digestibilité cæcale vraie pourrait approximer la digestibilité iléale vraie. Chez l'Homme, la méthode double traceur a fourni des valeurs de digestibilité variables, qui étaient physiologiques pour certains AA et incohérentes pour d'autres. Cette méthode nécessite davantage de mises au point mais reste prometteuse.

Title: Nutritional quality of pea protein and development of methods for assessing amino acid digestibility in rats and humans

Keywords: Pea protein – Digestibility – Stable isotopes – Dual tracer method – Human – Rat

Abstract: To achieve a more sustainable diet, it is necessary to identify plant-based alternatives to animal proteins. Pea exhibits many benefits, but its digestibility has to be evaluated. The evaluation of ileal amino acid (AA) digestibility is subject to methodological difficulties. In rats, no validated method exists. In humans, the standard direct method requires intubation to collect the digestive losses and is highly invasive. A new minimally invasive plasma method, called "dual tracer", has been proposed. It is based on the simultaneous ingestion of a ^{2}H-labelled test protein and a ^{13}C-labelled reference protein of known digestibility. The objectives of this work were 1) to evaluate the nutritional quality of yellow pea protein in comparison to casein and gluten, through the assessment of digestibility and other quality criteria, in rats and humans; 2) to develop methods for measuring ileal AA digestibility in these two models. In humans, the aim was to compare the dual tracer method and the direct method by studying protein isolates that were labelled with ^{15}N and ^{2}H. The high AA digestibility obtained for pea protein, in rats (95%) and in humans (94%), ensures a high nutritional quality. The comparison with casein and gluten favourably positions pea protein among the available protein supply. The balanced AA composition of pea protein and its high digestibility resulted in an adequate DIAAS (1.00 in humans, 0.88 in rats). In rats, we showed that true cecal digestibility could approximate true ileal digestibility. In humans, the dual tracer method yielded variable AA digestibility values, some of which were physiological and others were inconsistent. The dual tracer method needs further development but remains promising.

Maison du doctorat de l'Université Paris-Saclay
2ème étage aile ouest, Ecole normale supérieure Paris-Saclay
4 avenue des Sciences,
91190 Gif sur Yvette, France