



HAL
open science

Caractérisation nutritionnelle en modèles *in vitro* et *in vivo*, de protéines laitières d'assemblages moléculaires différents

Nathalie Atallah

► **To cite this version:**

Nathalie Atallah. Caractérisation nutritionnelle en modèles *in vitro* et *in vivo*, de protéines laitières d'assemblages moléculaires différents. Alimentation et Nutrition. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB026 . tel-03461292

HAL Id: tel-03461292

<https://pastel.hal.science/tel-03461292>

Submitted on 1 Dec 2021

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

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

Caractérisation nutritionnelle en modèles
in vitro et *in vivo*, de protéines laitières
d'assemblages moléculaires différents

*In vitro and in vivo nutritional characterization of
milk proteins with different molecular
arrangements*

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.
Réfèrent : AgroParisTech

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 13/07/2021, par**

Nathalie ATALLAH

Composition du Jury

Valérie MICARD Professeure, Montpellier SupAgro	Présidente
Amélie DEGLAIRE Maître de conférences, (HDR), Agrocampus Ouest	Rapporteur & Examineur
Stéphane WALRAND Professeur, INRAE - Centre Clermont-Auvergne- Rhône Alpes	Rapporteur & Examineur
Frédéric GAUCHERON Chef de projet expert, CNIEL	Examineur

Direction de la thèse

Claire GAUDICHON Professeure, AgroParisTech	Directrice de thèse
Rozenn RAVALLEC Professeure, Université de Lille	Co-Directrice & Examinatrice
Juliane CALVEZ Chargée de recherche, INRAE - Centre IdF-Jouy-en-Josas	Co-Encadrante & Examinatrice
Benoit CUDENNEC Maître de conférences, Université de Lille	Co-Encadrant & Invité
Audrey BOULIER Responsable Scientifique, Ingredia	Tutrice en entreprise & Invitée

Remerciements

La réalisation de ces travaux de thèse a nécessité l'implication de nombreuses personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je souhaiterais commencer tout d'abord par remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail. Je remercie Amélie Deglaire (AgroCampus Ouest) et Stéphane Walrand (INRAE) d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Valérie Micard (Montpellier SupAgro) et Frédéric Gaucheron (CNIEL) d'avoir accepté d'être membres du jury en tant qu'examineurs.

Je souhaiterais poursuivre en remerciant mes directrices de thèse Claire Gaudichon et Rozenn Ravallec, ainsi que mes très nombreux encadrants. Ce projet collaboratif n'aurait jamais pu être réalisé sans vos conseils, vos expertises complémentaires, vos qualités humaines, et votre soutien. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté scientifiquement au cours de toutes les étapes de ce projet. Je remercie grandement Claire Gaudichon de m'avoir fait confiance depuis mon Master pour mener à bien cette thèse. Un grand merci à Rozenn Ravallec pour sa disponibilité et sa bonne humeur. Je tiens à remercier Christophe Flahaut pour sa pédagogie et ses conseils avisés au cours de cette thèse. J'ai une pensée un peu plus particulière pour Juliane Calvez et Benoit Cudennec, qui m'ont suivi de près pendant ces trois années. Je vous remercie tous les deux pour votre investissement, votre écoute, votre optimisme. J'ai beaucoup appris de vous. Je remercie vivement mes responsables au sein d'Ingredia, Audrey Boulier et Alain Baniel. Merci de m'avoir intégrée à Ingredia, et un grand merci pour votre disponibilité, votre bienveillance et les échanges que nous avons pu avoir tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, Maude Le Gall et Didier Dupont, d'avoir pris le temps de participer aux réunions, et d'avoir donné leur point de vue scientifique toujours très intéressant.

Plus globalement, j'adresse mes remerciements à tous les membres de l'Institut Charles Viollette où j'ai réalisé ma première année de thèse, et le laboratoire PNCA, où j'ai effectué les années qui ont suivi. Je remercie Pascal Dhulster et Jean Louis Hilbert de m'avoir accueillie au sein de l'institut Charles Viollette. Merci également à Barbara Deracinois pour l'aide qu'elle

m'a apportée en spectrométrie de masse, et pour sa bonne humeur lors de nos échanges. De manière plus personnelle, je souhaite remercier les personnes avec qui des liens se sont formés lors de mon année passée à Lille : Dahlia, Rezak, Adrien, Désiré, Jonathan, Quentin, Mouna, Alexandre. Merci pour les très bons moments passés ensemble. Je remercie également Sandy, Cyril et Camille de m'avoir initié aux digestions *in vitro*.

Du côté de PNCA, je remercie Dalila Azzout-Marniche de m'avoir intégrée dans son équipe, et Nadezda Khodorova pour l'aide qu'elle m'a apportée lors des analyses de spectrométrie de masse. Je remercie particulièrement Romain Tessier pour ses conseils et pour avoir toujours apporté des réponses à mes nombreuses questions. Un grand merci à Delphine Bouveresse pour les analyses statistiques complexes qu'elle a réalisé pour mon premier article, merci aussi pour les discussions très agréables et ta bienveillance. Je tiens également à remercier Catherine Chaumontet et Julien Piedcoq de m'avoir formée en biologie moléculaire et d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions. Je remercie de même Morgane Dufay pour son travail et son aide précieuse à l'animalerie, Véronique Mathé pour son aide lors des dosages de spectrométrie de masse, Martin Chapelais pour le traitement des échantillons et Vanessa Hudry pour son aide avec les rats.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont aidé à faire avancer ce projet : Romain, Clément, Aziz et Maureen.

D'un point de vue personnel, je remercie tous les docteurs et doctorants à PNCA : Alison, Alya, Armelle, Chloé, Elie, Florence, Gabrielle, Gaëtan, Joanna, Joséphine, Laurianne, Marion, Moufidath, Nathalie, Olivier, Sandra, Simon, Soukaïna, et Trenton. Merci pour le soutien et les très beaux moments passés ensemble. Ces dernières années n'auraient pas été les mêmes sans vous, merci pour toutes les amitiés qui se sont créées.

Au-delà du laboratoire, je tiens également à remercier Marie, Manon, Laury et Camille avec qui la recherche de thèse a démarré en stage de master. Merci d'avoir toujours été présentes dans les années qui ont suivi.

A la « semi-coloc » : Gwen, Camille, Lucie, merci pour les très bons moments passés ensemble, merci d'avoir été à l'écoute et pour le soutien que vous m'avez apportée.

Un énorme merci à mes parents, mes frères et mes grand-mères pour leur soutien sans faille. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours poussée à aller plus loin. Je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui sans vous.

Je souhaite terminer en remerciant Erwan de m'avoir accompagnée dans cette aventure de thèse pendant trois ans. Merci d'avoir toujours été présent et de me donner la force de rester positive même dans les moments de doute, merci de m'encourager à aller toujours plus loin.

Résumé

L'industrie laitière a énormément progressé dans l'extraction d'ingrédients laitiers à haute valeur ajoutée. Or, il existe peu de données reliant l'impact des procédés sur la structure des protéines et la façon dont elles sont digérées puis assimilées. Cette thèse avait donc pour but de mieux connaître les relations entre les structures induites par les procédés pour obtenir différentes matrices protéiques laitières et leur comportement au cours de la digestion.

Les objectifs de nos travaux étaient : 1) évaluer l'impact des procédés sur les matrices protéiques au cours de la digestion *in vitro* statique pour sélectionner celles présentant les profils peptidiques les plus hétérogènes ; 2) identifier un modèle de rat discriminant en termes d'efficacité digestive en étudiant les effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestion ; 3) étudier la digestion et l'utilisation postprandiale des matrices sélectionnées sur la base de l'étude de digestion *in vitro*, sur le modèle de rat le plus discriminant.

Différents profils peptidiques ont été obtenus pour la caséine déminéralisée par rapport à la caséine micellaire native en *in vitro*. En *in vivo*, un niveau d'adiposité plus élevé entraînait une augmentation des valeurs de digestibilité des protéines (94 % pour les jeunes rats avec une adiposité normale et 96 % pour les rats plus âgés avec une adiposité élevée) et semblait compenser les modifications métaboliques postprandiales des protéines associées à un âge plus avancé. Les matrices ont ensuite été étudiées chez le jeune rat avec une adiposité normale. Cette étude a révélé que la structure de la matrice protéique avait un impact sur la digestibilité des protéines avec notamment une baisse de digestibilité pour la matrice composée d'un assemblage de caséines et de protéines solubles. Enfin, l'ensemble de ces travaux montre la complémentarité des méthodes *in vitro* et *in vivo* dans la caractérisation nutritionnelle de matrices.

Abstract

The dairy industry has made great progress in the extraction of high value dairy ingredients. However, there is little scientific data on the impact of industrial processes on the structure of proteins and their digestibility and postprandial metabolism. The aim was thus to better understand the relationship between the structure induced by the processes applied to obtain different milk protein matrices and their behavior during digestion.

The objectives were: 1) to evaluate the impact of processes on milk matrices during static *in vitro* digestion to select those with the most heterogeneous peptide profiles; 2) to identify a discriminating rat model in terms of digestive efficiency by studying the effects of age and adiposity on digestion; 3) to study the digestion and postprandial utilization of the selected matrices, in respect to *in vitro* digestion results, on the most discriminating rat model.

Different peptide profiles were obtained for demineralized casein versus native micellar casein *in vitro*. *In vivo*, a higher level of adiposity resulted in an increase in protein digestibility values (94% for young rats with normal adiposity and 96% for older rats with high adiposity) and appeared to compensate for the postprandial protein metabolic changes associated with older age. Matrices were then studied *in vivo* on young rats with normal adiposity. This study revealed that the structure of the protein matrix had an impact on protein digestibility, with a decrease in digestibility for the matrix that contained an assembly of caseins and whey proteins. Finally, this work shows the complementarity of *in vitro* and *in vivo* methods in the nutritional characterization of matrices.

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract	5
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	11
Liste des abréviations.....	12
Contexte de réalisation de la thèse.....	15
Valorisation scientifique.....	16
Introduction générale.....	18
Chapitre I.....	21
Introduction bibliographique	21
1. Les protéines de lait	22
1.1. Les caséines : structures et propriétés.....	22
1.2. Les protéines solubles : structures et propriétés	28
1.3. Les procédés industriels appliqués au lait.....	32
1.3.1. Les procédés d'extraction des protéines de lait	33
2. Digestion et métabolisme des protéines	41
2.1. Digestion et absorption des protéines	41
2.1.1. La bouche	42
2.1.2. L'estomac	42
2.1.3. L'intestin grêle.....	43
2.1.4. Le côlon	49
2.2. Métabolisme et homéostasie des acides aminés.....	50
2.2.1. Renouvellement du pool protéique	50
2.2.2. Métabolisme splanchnique des acides aminés.....	52

2.2.3.	Métabolisme des acides aminés au niveau des organes périphériques.....	56
2.2.4.	Focus sur la synthèse protéique.....	56
3.	Facteurs modulant la digestion et le métabolisme protéique.....	58
3.1.	La notion de digestibilité	59
3.2.	Facteurs intrinsèques à l'aliment protéique	60
3.2.1.	Effet de la source de protéines : protéines animales vs végétales.....	60
3.2.2.	Effet de la matrice : exemple des protéines laitières	61
3.3.	Impact des procédés de transformation du lait sur la digestion	65
3.4.	Impact des facteurs physiologiques sur la digestion.....	68
3.4.1.	Les effets de l'âge.....	68
3.4.2.	Les effets de l'adiposité.....	71
4.	Modèles de digestion	73
4.1.	Modèles de digestion <i>in vitro</i>	74
4.2.	Modèles de digestion <i>in vivo</i>	80
4.3.	Comparaison des modèles de digestion appliqués aux protéines	84
Chapitre II		87
Travail personnel.....		87
Objectifs des travaux de thèse		88
1.	Obtention des matrices protéiques laitières	89
2.	Digestion <i>in vitro</i> : optimisation du protocole et techniques analytiques.....	91
2.1.	Optimisation du protocole de digestion statique <i>in vitro</i> Infogest.....	91
2.2.	Principe des techniques analytiques	93
2.3.	Analyse des Composantes Communes et Poids Spécifique (ACCPS)	96
3.	Digestion <i>in vivo</i>	97
3.1.	Marquage des protéines de lait au ¹⁵ N	97
3.2.	Evaluation de la digestibilité des protéines et des acides aminés chez le rat.....	98

3.3.	Evaluation du devenir métabolique de l'azote.....	100
3.4.	Evaluation du taux de synthèse protéique dans les différents tissus	100
3.5.	Méthodes analytiques	101
4.	Résultats.....	109
4.1.	Évaluation <i>in vitro</i> de l'impact des procédés industriels sur la digestion gastro-intestinale des matrices protéiques du avec le protocole Infogest (Article 1).	109
4.2.	Un niveau d'adiposité modéré contrebalance les modifications du métabolisme protéique associées au vieillissement chez le rat (Article 2).....	141
4.3.	Digestibilité des protéines et métabolisme postprandial de différentes matrices protéiques laitières chez le rat (Article 3)	178
Chapitre III		215
Discussion.....		215
1.	Discussion sur les modèles de digestion <i>in vitro</i> statique et <i>in vivo</i> chez le rat	216
2.	Caractérisation des matrices protéiques au cours des digestions <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	222
3.	Effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestion de la caséine micellaire native	232
Conclusion		235
Références.....		237

Liste des figures

Figure 1. La composition du lait de vache.....	18
Figure 2. La micelle de caséine.....	25
Figure 3. Le modèle submicellaire.....	26
Figure 4. Les liaisons au sein de la micelle de caséine.	27
Figure 5. Structure d'un monomère de β -lactoglobuline bovine.	29
Figure 6. La structure de l' α -lactalbumine bovine.	31
Figure 7. Schéma de l'extraction des caséines micellaires natives et des protéines solubles.	34
Figure 8. Schéma récapitulatif de la coagulation acide et enzymatique.	36
Figure 9. Schéma des échanges de minéraux, d'eau et de molécules de caséine en fonction des différentes conditions physico-chimiques.	37
Figure 10. Formation de pontage après ajout de la transglutaminase.....	39
Figure 11. La structure du caséinate de sodium et de la micelle de caséine.....	40
Figure 12. Le tractus gastro-intestinal de l'Homme.....	41
Figure 13. Résumé des mécanismes impliqués dans la digestion et l'absorption des protéine	45
Figure 14. Mécanismes de transport des peptides et acides aminés libres dans l'épithélium de l'intestin grêle.....	46
Figure 15. Métabolisme protéique du microbiote intestinal.....	50
Figure 16. Représentation schématique des voies métaboliques principales impliquées dans l'homéostasie des protéines et le métabolisme des acides aminés <i>in vivo</i>	51
Figure 17. Schéma récapitulatif du métabolisme des acides aminés dans le foie.....	54
Figure 18. Schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par une hyperinsulinémie et une hyperaminoacidémie.	58
Figure 19. Cinétiques plasmatiques chez l'Homme après un repas de protéines solubles et de caséines..	62
Figure 20. Flux d'azote exogène dans le jéjunum après ingestion de caséines natives ou de protéines solubles.	64
Figure 21. Schéma simplifié du modèle de digestion <i>in vitro</i> dynamique de l'estomac et de l'intestin grêle (TIM-1).....	78

Figure 22. Récapitulatif des objectifs des travaux de thèse.	89
Figure 23. Procédés d'obtention des matrices laitières.....	90
Figure 24. Schéma explicatif du déroulement de l'optimisation du protocole de digestion in vitro statique Infogest pour les matrices protéiques.....	92
Figure 25. Principe simplifié de la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem.	95
Figure 26. Protocole de marquage du lait au ¹⁵ N.....	97
Figure 27. Protocole d'habituation çà la consommation d'un repas test.....	99
Figure 28. Schéma du modèle simplifié du métabolisme protéique.	100
Figure 29. Schéma du fonctionnement de l'EA-IRMS.	102
Figure 30. Schéma du fonctionnement du GC-C-IRMS.	104
Figure 31. Schéma du fonctionnement du GC-MS.....	105
Figure 32. Représentation schématique simplifiée du fonctionnement de l'UHPLC pour le dosage des acides aminés	107
Figure 33. Schéma récapitulatif de l'utilisation des appareils pour les principales analyses effectuées lors des études <i>in vivo</i>	108
Figure 34. Comparaison des profils de répartition des poids moléculaires des matrices protéiques laitières au cours de la digestion <i>in vitro</i> statique en phase intestinale et <i>in vivo</i> dans le caecum du rat	226
Figure 35. Recouvrements de séquences des principales caséines identifiées, sous forme de carte de chaleur, au cours de la digestion <i>in vitro</i> statique en phase intestinale et <i>in vivo</i> dans le caecum du rat.....	228

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristique des enzymes impliqués dans la digestion des protéines.....	43
Tableau 2. Transporteurs d'acides aminés	48
Tableau 3. Classification des acides aminés en fonction de leur devenir dans le foie	55
Tableau 4. Valeurs de digestibilité de l'azote de différentes sources de protéines évaluées par la méthode du bilan azoté chez le jeune rat âgé de 5 semaines et le rat âgé de 20 mois.....	70
Tableau 5. Composition des matrices étudiées.	91
Tableau 6. Répartition des pertes d'azote alimentaire (% pertes alimentaires totales) 6 h après ingestion du repas test contenant des caséines micellaires pour les groupes d'âges et d'adiposité différents.	220
Tableau 7. Répartition des pertes d'azote alimentaire (% pertes alimentaires totales) 6 h après ingestion du repas test contenant différentes matrices de protéines lactières.	221
Tableau 8. Caractéristiques majeures des matrices au cours des digestions <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	231

Liste des 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

AACR : Acide aminé à chaîne ramifiée

AAD : Acide aminé dispensable

AACCPs : Analyse en composantes communes et poids spécifiques

ACP : Analyse en composantes principales

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

AAI : Acide aminé indispensable

AIA : *Acid insoluble ashes* (Cendres Insolubles dans l'Acide)

ARNm : ARN messager

ARNt : ARN de transfert

AP : Atome pourcent

APE : *Atom percent excess* (Excès d'enrichissement)

AUC : *Area under curve* (Aire Sous la Courbe)

CC : Composantes communes

CCK : Cholécystokinine

CID : *Collision induced dissociation* (dissociation induite par collision)

CMP : Caséinomacropéptide

Cr₂O₃ : Oxyde de chrome

Da : Dalton

EA-IRMS : *Elemental analyzer - isotope ratio mass spectrometer* (Analyseur élémentaire – spectrométrie de masse à rapport isotopique)

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

eEF : *Eukaryotic elongation factor*

eIF : *Eukaryotic initiation factor*

eRF : *Eukaryotic release factor*

ESI : *Electrospray ionization* (ionisation par électronébuliseur)

ET : Ecart-type

FAO : *Food and agriculture organization of the United Nations* (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)

FSR : *Fractional synthetic rate* (taux de synthèse protéique fractionnaire)

GC-C-IRMS : *Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry*
(chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique)

GC-MS : *Gas chromatography – mass spectrometry* (Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse)

GCN2 : *General control conderepressible 2*

GIP : *Gastric inhibitory peptide*

GLP-1 : *Glucagon-like-peptide 1*

GDL : Glucono-delta-lactone

HCl : Acide chlorhydrique

H₂SO₄ : Acide sulfurique

LC-MS/MS : *Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*
(Chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem)

MF : Microfiltration

MM : Masse moléculaire

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

m/z : Rapport masse sur charge

SEC : *Size exclusion chromatography* (Chromatographie d'exclusion stérique)

TiO₂ : Dioxyde de titane

PepT1 : *Peptide transporter 1*

PYY : *Peptide YY*

QS : *Quaternary solvent manager* (gestionnaire de solvant quaternaire)

TIM-1 : *TNO gastro-intestinal model 1*

UF : Ultrafiltration

UHPLC : *Ultra-high performance liquid chromatography* (Chromatographie Liquide à Ultra-Haute Performance)

UHT : Ultra-haute température

Contexte de réalisation de la thèse

Ces travaux ont été réalisés au sein de deux unités mixtes de recherche (UMR). J'ai réalisé la première année de ma thèse au sein de l'UMRT BioEcoAgro 1158 INRAE à l'Institut Charles Viollette (ICV) de l'Université de Lille. L'unité est située à Villeneuve d'Ascq (59655) et dirigée par Jean-Louis Hilbert depuis 2020.

Les deux années qui ont suivi ont été réalisées au sein de l'UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA), affiliée à AgroParisTech, à INRAE, et à l'Université Paris-Saclay. L'unité est située dans les locaux d'AgroParisTech à Paris (75005), et est dirigée par Claire Gaudichon depuis 2018. J'étais intégrée à l'équipe « Apport Protéique et Régulation du Métabolisme » (APReM), dirigée par Dalila Azzout-Marniche.

Cette thèse a été menée dans le cadre d'une convention industrielle de formation par la recherche (dispositif CIFRE) avec l'industrie agroalimentaire Ingredia, située à Arras (62), qui a financé ces travaux. Mon travail s'intégrait au service R&D transversal d'Ingredia Dairy expert, dont le directeur est Hervé Gasnier et le responsable R&D est Alain Baniel.

Mon travail de thèse a été encadré par Benoit Cudennec, Rozenn Ravallec, Christophe Flahaut au sein de l'ICV, par Claire Gaudichon et Juliane Calvez au sein de PNCA, et par Audrey Boulier et Alain Baniel au sein d'Ingredia.

Valorisation scientifique

Articles scientifiques

Publié

N. Atallah, B. Deracinois, A. Boulier, A. Baniel, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse, R. Ravallec, C. Flahaut*, B. Cudennec*. **In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol.** *Foods*. 2020; 9(11):1580. <https://doi.org/10.3390/foods9111580>

Rédigés

N. Atallah, C. Gaudichon, A. Boulier, A. Baniel, D. Azzout-Marniche, N. Khodorova, C. Chaumontet, J. Piedcoq, M. Chapelais, J. Calvez. **Moderate adiposity levels counteract protein metabolism modifications associated with aging in rats.**

N. Atallah, C. Gaudichon, A. Boulier, A. Baniel, B. Cudennec, B. Deracinois, D. Azzout-Marniche, N. Khodorova, M. Chapelais, J. Calvez. **Protein digestibility and postprandial metabolism of different milk protein matrices in rats.**

Communications orales

N. Atallah, C. Gaudichon, A. Boulier, A. Baniel, D. Azzout-Marniche, J. Calvez. **Effets de l'âge et de l'adiposité sur la biodisponibilité des protéines et sur le taux de synthèse protéique dans le muscle et le foie chez le rat.** *Journées Francophones de Nutrition 2020*. Live. 25-27 novembre 2020.

N. Atallah, C. Gaudichon, A. Boulier, A. Baniel, D. Azzout-Marniche, N. Khodorova, J. Calvez. **The effects of age and adiposity on protein digestibility and protein synthesis in rats.** *Nutrition 2021*. Live. 7-10 juin 2021.

Communications affichées

N. Atallah, A. Boulier, A. Baniel, J. Calvez, C. Gaudichon, C. Flahaut, Rozenn Ravallec¹, R. Ravallec, B. Cudennec. **Optimization of a static *in vitro* gastro-intestinal digestion method for simple food matrices.** *2nd International Conference on Food Bioactives & Health 2018*. Lisbonne (Portugal). 26-28 septembre 2018.

N. Atallah, B. Deracinois, A. Boulier, A. Baniel, D. Jouan-Rimbaud Bouveresse, R. Ravallec, B. Cudennec, C. Flahaut. ***In vitro* nutritional characterization of milk proteins with different molecular arrangements.** *6th International Conference on Food Digestion 2019*. Grenade (Espagne). 2-4 avril 2019.

N. Atallah, J. Calvez, A. Boulier, A. Baniel, D. Azzout-Marniche, C. Gaudichon. **Effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestibilité de la caséine micellaire chez le rat.** *Journées Francophones de Nutrition 2019*. Rennes (France). 27-29 novembre 2020.

N. Atallah, A. Boulier, A. Baniel, D. Azzout-Marniche, C. Gaudichon, J. Calvez. **The effects of age and adiposity on the digestibility of micellar casein in rats.** *Nutrition 2020*. Live. 1-4 juin 2020.

Introduction générale

La filière laitière occupe une place importante en France avec une production annuelle de lait bovin évaluée à 25 millions de tonnes. L'industrie laitière se positionne deuxième derrière celle de la viande en termes de chiffre d'affaire généré, et la France est le deuxième plus grand producteur de lait d'Europe derrière l'Allemagne [1]. A l'échelle mondiale, la production de lait est en constante augmentation avec 838 millions de tonnes de lait produites en 2018 et une augmentation de la production estimée à 1,7 % par an dans la prochaine décennie [2].

Le lait est un aliment complet d'un point de vue nutritionnel puisqu'il est composé de lipides, de lactose, de protéines, de vitamines et de minéraux. D'un point de vue physicochimique, le lait est composé d'une suspension de caséines micellaires, d'une émulsion de globules gras, et d'une solution soluble de lactose et de protéines solubles [3]. La composition précise du lait varie grandement d'une espèce à l'autre, mais cette thèse se focalisera uniquement sur le lait de vache dont la composition est présentée dans la **Figure 1**.

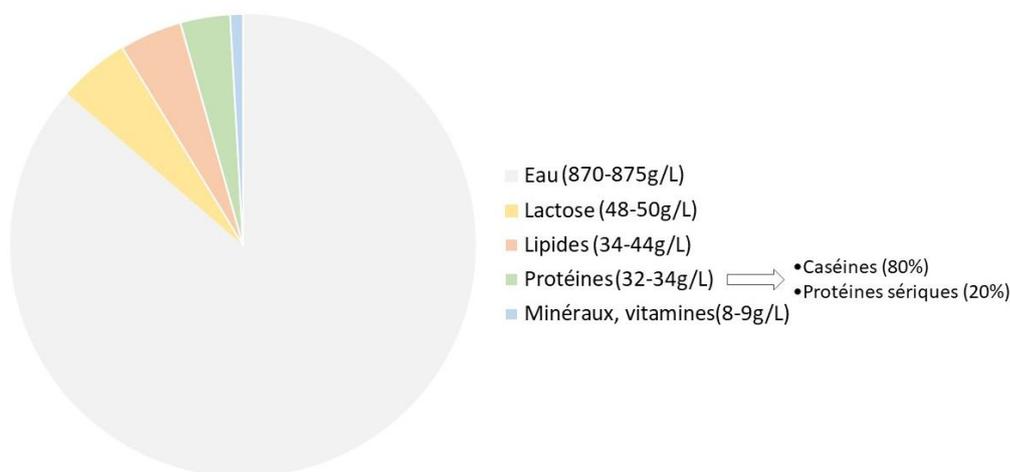


Figure 1. La composition du lait de vache. D'après [3].

La majorité du lait collecté est transformé en produits laitiers grand public (lait conditionné, yaourts, desserts lactés, fromages, beurres et crèmes) mais une part importante est aussi transformée en produits intermédiaires. En effet, depuis les années 1970, les industriels du lait ont énormément progressé dans l'extraction et la fabrication d'ingrédients laitiers à haute

valeur ajoutée. L'industrie laitière dispose aujourd'hui d'outils permettant d'extraire les protéines de lait via des procédés de filtration membranaire non dénaturants. La maîtrise de ces procédés de fractionnement a donc permis d'extraire les protéines sous leur forme native comme c'est le cas pour les caséines micellaires, mais a aussi rendu possible la recombinaison des différents composants du lait afin de générer de nouveaux ingrédients. Au-delà des procédés de fractionnement, les recherches se poursuivent au sein de l'industrie laitière dans le but de développer des protéines innovantes en modifiant leur structure via des procédés chimiques et enzymatiques.

Il existe aujourd'hui peu de données scientifiques reliant la structure des protéines à la façon dont elles sont dégradées au cours de la digestion et à leur devenir après assimilation. Dans ce contexte, l'intérêt de cette thèse était de procéder à la caractérisation nutritionnelle de matrices protéiques laitières obtenues via différents procédés technologiques, afin de les positionner au mieux de leur fonctionnalité sur les secteurs de la nutrition et de la santé. Pour ce faire, les travaux ont été réalisés en différentes étapes visant différents objectifs. Ainsi six matrices protéiques laitières obtenues via différents procédés technologiques ont été étudiées lors de la digestion *in vitro* statique afin de sélectionner celles présentant les profils peptidiques les plus hétérogènes dans le but d'étudier leur digestion et assimilation *in vivo*. Dans un second temps, nous avons évalué les effets de l'âge et l'adiposité sur la digestion de la caséine micellaire native. Cette évaluation avait pour but de rechercher un modèle de rat discriminant en termes d'efficacité digestive afin de caractériser nos matrices protéiques sélectionnées en digestion *in vitro* sur le modèle le plus discriminant. Enfin, la troisième étape avait pour objectif d'étudier la digestion des matrices protéiques sélectionnées sur le modèle de rat discriminant afin de procéder à la caractérisation de leur devenir digestif et métabolique.

Le premier chapitre de ce manuscrit présentera l'état des connaissances actuel sur les divers thématiques abordées dans le cadre de cette thèse. Ce chapitre se divisera en quatre parties : les propriétés des protéines de lait et l'impact des procédés industriels sur leur structure, la digestion et le métabolisme protéique, les facteurs modulant la digestion et le métabolisme protéique, et la comparaison des modèles de digestion. Après une présentation des méthodes analytiques qui ont été utilisées, les travaux seront présentés sous la forme de trois articles

scientifiques, dont un publié dans Foods en 2020. Finalement, le dernier chapitre discutera de l'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail de thèse.

Chapitre I

Introduction bibliographique

1. Les protéines de lait

Les protéines de lait sont classées en deux grandes catégories en fonction de leur réaction en conditions acides ou lors de l'ajout de présure :

- **Les caséines** représentent 80 % des protéines contenues dans le lait. Elles ont la particularité de précipiter lorsqu'un pH de 4,6 est atteint (point isoélectrique) [4]. Elles restent cependant très résistantes à des températures de chauffage élevées et ne coagulent pas après avoir été chauffées pendant 24h à 100 °C ou pendant 25min à 140 °C [5]. La stabilité thermique remarquablement élevée des caséines est probablement due à l'absence de structures secondaires et tertiaires stables. En effet, les caséines sont des protéines peu structurées, très flexibles et non cristallisables. Par conséquent, leur structure tertiaire reste inconnue [6]
- **Les protéines solubles** dites aussi protéines sériques ou protéines du lactosérum constituent 20 % de l'ensemble des protéines de lait. Les protéines solubles ont une structure globulaire avec une structure tertiaire bien établie et restent en solution dans des conditions acides. En revanche, leur structure est altérée lorsqu'elles atteignent des températures de chauffage élevées [6].

1.1. Les caséines : structures et propriétés

Les caséines sont des phosphoprotéines subissant des modifications post-traductionnelles durant lesquelles des groupements phosphate se fixent à leurs résidus de sérine, et plus rarement à leurs résidus de thréonyle [7]. Il existe quatre types de caséines qui se distinguent ainsi par leur degré de phosphorylation et qui sont présentes dans le lait à concentrations variables : les caséines- α_1 , α_2 - β et κ [4,8]. Une fraction mineure, nommée caséine- γ est issue de la protéolyse de la caséine- β par la plasmine [9]. Chaque caséine comporte également des variants génétiques qui diffèrent au niveau de l'insertion de certains acides aminés. Certains types de variants sont plus ou moins abondants dans le lait en fonction de la race de vache [4].

- **Les caséines- α 1** constituent la fraction caséique à hauteur de 40 % dans le lait bovin. Ce sont des polypeptides composés de 199 acides aminés avec une masse moléculaire de 23 kDa. La caséine- α 1 contient 8 résidus de sérine phosphorylés.
- **Les caséines- α 2**, moins présentes, constituent 10 % de la fraction caséique. Elles sont composées de 207 acides aminés avec une masse moléculaire de 25 kDa et contiennent de 9 à 11 résidus de sérine phosphorylés. La caséine- α 2 est la caséine la plus phosphorylée.
- **Les caséines- β** peuvent représenter jusqu'à 45 % de la fraction caséique. Elles sont composées de 209 acides aminés et ont une masse moléculaire de 23 kDa ainsi que 5 résidus de sérine phosphorylés.
- **Les caséines- κ** ont la chaîne polypeptidique la plus courte avec 169 acides aminés et une masse moléculaire de l'ordre de 19 kDa. La caséine- κ est la moins phosphorylée et compte uniquement un résidu sérine phosphorylé.

Les caséines les plus phosphorylées telles que les caséines- α et - β sont très sensibles aux sels de calcium et précipitent en présence d'ions Ca^{2+} en excès [7]. De plus, les caséines présentent des différences de composition et des zones à caractère contrasté. Elles peuvent en effet avoir des régions hydrophobes et hydrophiles mais aussi être glycosylées, tel est le cas de la caséine- κ [7]. Les résidus de proline répartis régulièrement tout au long des chaînes polypeptidiques des caséines empêchent la formation de structures secondaires telles les hélices- α ou les feuillets- β . Cette proportion importante de proline confère aux caséines une conformation dite ouverte et lâche. Ceci est particulièrement le cas pour les caséines- β très riches en proline [9].

En conditions biologiques, les caséines se lient entre elles et forment des agrégats de plusieurs milliers de molécules d'un diamètre moyen de 150 à 200 nm [10]. Cet assemblage supra moléculaire de caséines est connu sous le nom de « micelle de caséine » [11]. La micelle de caséine est composée de 92 % de caséines et de 8 % de minéraux dont majoritairement du calcium soluble, mais aussi du magnésium, du sodium et du potassium qui représentent les cations, ainsi que du phosphate inorganique, du citrate et du chlorure qui forment les anions. Le calcium micellaire est majoritairement lié au phosphate inorganique et une partie est directement liée à la caséine par l'intermédiaire des résidus phosphosérines qui sont des phosphates organiques. Ainsi, le phosphate de calcium colloïdal du lait peut être défini comme

un mélange de caséinate de calcium (contenant le phosphate organique) et de phosphate de calcium (contenant le phosphate inorganique) [12].

De nombreux travaux ont été réalisés sur la structure de la micelle de caséine depuis les années 1960 mais la structure interne de la micelle fait toujours l'objet de débats [13]. Toutefois, il est généralement accepté que le phosphate de calcium colloïdal contribuerait à la stabilisation de la micelle de caséine. Un grand nombre de modèles a été proposé et ils peuvent être catégorisés en trois grands groupes : le modèle « cœur enveloppe », le modèle submicellaire dit aussi « modèle à sous-unités », le modèle nanocluster connu aussi sous le nom de « modèle à structure ouverte ».

Le modèle cœur enveloppe

Le modèle « cœur enveloppe » est le modèle le plus simple et a tout d'abord été proposé par Waugh (**Figure 2**) [14]. Ce modèle propose que le cœur de la micelle soit constitué de monomères de caséines- α 1 et - β dotés d'une boucle de phosphate chargée. Ces monomères s'agrègent ensemble pour former le noyau, et la taille du noyau est limitée par la formation d'une couche de caséines- α 1 et caséines- κ se liant entre elles. Ainsi, les caséines- κ sont dispersées sur toute la surface périphérique de la micelle et la taille de la micelle est dictée par la quantité de caséine- κ disponible. Cependant, ce modèle plutôt simpliste ne prend pas en compte l'importance du rôle déjà démontré du phosphate de calcium colloïdal. Pour cela, les modèles les plus retenus actuellement sont le modèle submicellaire et le modèle nanocluster.

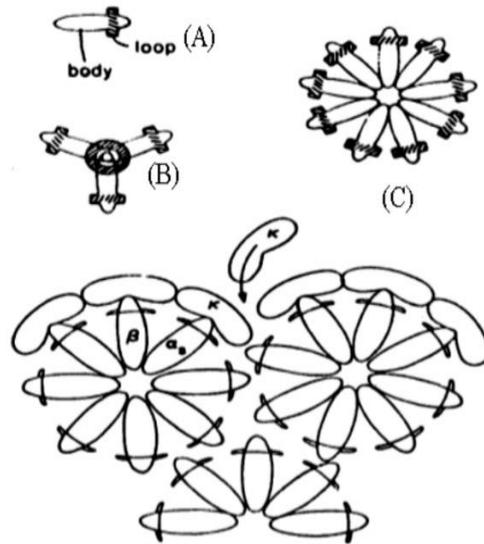


Figure 2. La micelle de caséine. (A) Modèle de monomère pour les α_1 - ou β -caséines avec boucle chargée. (B) Un tétramère de monomères de α_1 -caséine. (C) Modèle planaire pour un polymère central d' α_1 - et β -caséines avec les caséines- κ présentes en périphérie. D'après [14].

Le modèle submicellaire

Le modèle submicellaire (**Figure 3**) a été formulé en premier lieu [15] et découle des observations issues des premières études réalisées sur les caséines purifiées. Ces études ont démontré que les caséines formaient des agrégats relativement larges (submicelles) en l'absence de calcium, et que ces agrégats pouvaient constituer de larges complexes colloïdaux après l'ajout de calcium [16]. Ainsi, il a été proposé que la micelle soit constituée de sous-unités plus petites, connues sous le nom de « submicelles », elles-mêmes formées d'un certain nombre de caséines.

Le premier modèle submicellaire fut établi par Shimmin et Hill [17] et repris par Morr [18]. Dans ce modèle, les submicelles seraient composées de caséines- α_1 , - β et - κ qui se lieraient entre elles par des liaisons hydrophobes. Les submicelles s'agrègeraient ensuite grâce à la présence de phosphate de calcium colloïdal. La formation de ponts phosphocalcique entre les submicelles permettrait alors de constituer la micelle de caséine. Plusieurs modèles furent proposés à partir de celui-ci, mais le modèle le plus récent fut proposé par Wasltra [19] et précise qu'il existerait deux types de submicelles. Un premier, hydrophobe, se trouvant à l'intérieur de la micelle et qui serait constitué de caséines- α et - β et un deuxième, plus hydrophile, constitué de caséines- α et - κ et qui aurait une taille plus importante.

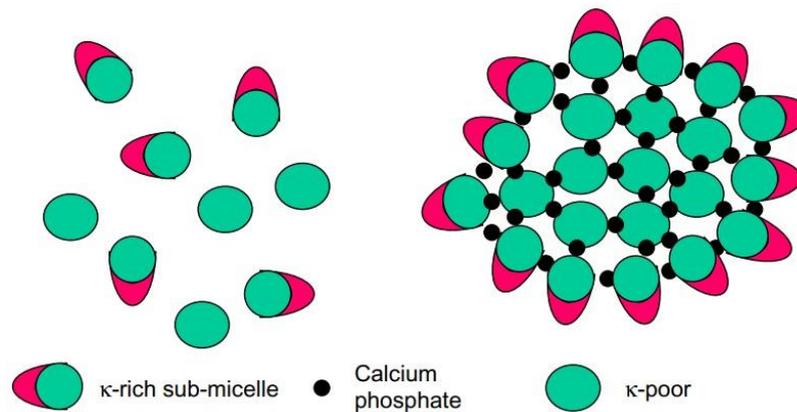


Figure 3. Le modèle submicellaire. Ce modèle représente les deux types de submicelles : celles hydrophobes présentes au cœur de la micelle de caséine, et celles hydrophiles présentes à l'extérieur de la micelle. Dans ce modèle, les submicelles sont liées entre elles via des ponts phosphocalciques. D'après [20].

Le modèle nanocluster

Le deuxième modèle le plus répandu propose que la micelle de caséine soit un gel minéralisé formé de milliers de caséines se liant ensemble via des nanoclusters de phosphate de calcium colloïdaux (**Figure 4**) [21,22]. Les nanoclusters de phosphate de calcium seraient ainsi responsables de la réticulation des caséines et du maintien du réseau de la micelle [22]. Il existerait deux types de liens au sein de la micelle de caséine : un premier où deux régions hydrophobes (ou plus) de différentes molécules de caséines se lieraient entre elles, et un deuxième issu de la liaison entre les nanoclusters de phosphate de calcium et les résidus de sérines phosphorylés des caséines. Les nanoclusters de phosphate de calcium étant chargés positivement joueraient alors un rôle d'agent neutralisant en se liant aux résidus de sérine phosphorylés des caséines chargées négativement. La caséine- κ étant moins phosphorylée que les autres caséines, celle-ci se lierait uniquement via des interactions hydrophobes et se trouverait donc à la surface de la micelle. Ainsi, la présence de caséines- κ limiterait la croissance de la micelle [22].

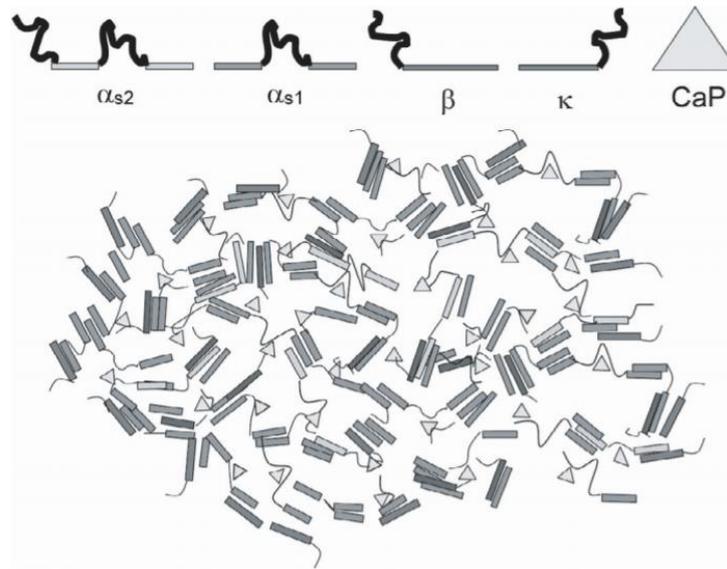


Figure 4. Les liaisons au sein de la micelle de caséine. Les interactions protéine-protéine se produisent entre les régions hydrophobes (barres rectangulaires) tandis que les régions hydrophiles de la protéine (boucles) se lient aux amas de phosphate de calcium (triangles). La caséine κ se trouve à la surface. D'après [22].

Les modèles de structure interne de la micelle ont été établis à partir de méthodes d'analyse physique telles que la microscopie électronique et par la mesure de diffusion de neutrons (SANS) ou de rayons X (SAXS). En revanche, la préparation des échantillons en amont de ces techniques pourrait conduire à des artefacts et il n'est pas encore possible d'élucider de manière définitive l'hypothèse d'un de ces modèles [15]. En effet, à l'heure actuelle, il n'existe aucun moyen de dissocier la micelle de caséine tout en garantissant le maintien de son intégrité. Le traitement de la micelle par acidification ou par acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) provoquerait la dissolution du phosphate de calcium, tandis qu'un traitement à l'urée conserverait le phosphate de calcium mais dissocierait les sous-micelles potentiellement existantes [15].

Malgré les débats portant sur la structure interne de la micelle, il est admis dans tous les modèles que la caséine- κ est hydrophile et se trouve à la surface de la micelle. Les caséines- κ présentes sur la surface de la micelle limiteraient sa croissance en formant une enveloppe de chaîne polypeptidique protubérante épaisse de 5 à 10 nm. Cette structure polypeptidique confère à la micelle une stabilité stérique et lui fournit des forces de répulsion maintenant à l'écart les micelles de caséines individuelles [23].

1.2. Les protéines solubles : structures et propriétés

Après précipitation isoélectrique des caséines dans le lait, le liquide restant est une solution diluée de protéines (protéines de lactosérum ou solubles) constituée de lactose, de sels, de vitamines [5]. Les protéines solubles se distinguent en différentes catégories et sont présentes en quantités variables. Dans le lait bovin, on retrouve de la plus abondante à la moins abondante la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, la sérumalbumine et les immunoglobulines. D'autres fractions mineures telles que la lactoferrine ou les lysozymes s'y trouvent également, ainsi que des particules azotées peptidiques appelées « protéose-peptone ».

Les protéines solubles diffèrent des caséines en termes de structure, de propriétés, et de composition en acides aminés. Elles sont globulaires, présentent une structure tertiaire et existent dans le lait sous forme de monomères ou d'oligomères tandis que les caséines existent sous la forme d'agrégats beaucoup plus complexes pour constituer la micelle [24]. De plus, les protéines solubles ne précipitent pas à pH isoélectrique, commencent à se dénaturer à une température de 62 °C [25] et se dénaturent complètement à une température de 90 °C [26]. En revanche, les caséines sont des protéines qui restent stables à des températures élevées [27]. Les deux types de protéines diffèrent aussi en termes de composition en acides aminés. Les protéines solubles ont une composition en proline bien inférieure à celle des caséines mais ont une teneur plus riche en acides aminés soufrés. En effet, le soufre présent dans les caséines provient majoritairement de la méthionine. Les protéines solubles sont très riches en cystéine et cystine, ce qui leur confère une très bonne valeur nutritionnelle [5].

La β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline a été caractérisée en profondeur et représente la protéine soluble la plus abondante puisqu'elle constitue près de 50 % de la fraction sérique soit 12 % des protéines de lait de vache [28]. C'est une petite protéine formée d'une seule chaîne polypeptidique de 162 acides aminés avec une masse moléculaire de 18,3 kDa [29]. Il existe dix variants génétiques de la β -lactoglobuline, mais les plus répandus sont les variants A et B qui diffèrent au niveau de la substitution de deux acides aminés [8]. La structure quaternaire de la β -lactoglobuline varie et la protéine peut se présenter sous forme de monomère, de dimère ou d'oligomère en

fonction des conditions de pH, de force ionique, et de température dans lesquelles elle se trouve [5]. Ces états d'association variables sont le résultat d'un équilibre entre des interactions hydrophobes, électrostatiques et des liaisons hydrogène [30].

La structure primaire de la β -lactoglobuline révèle la présence de cinq résidus de cystéine dont quatre se lient ensemble pour former des ponts disulfures (Cys66-Cys160 et Cys106-Cys119 ou Cys121). Le cinquième résidu comporte un groupe thiol (-SH) et se trouve enfouie au cœur de la structure à température ambiante [26,31]. Ce groupe thiol libre a un rôle essentiel dans les réactions de polymérisation provoquées par un traitement thermique [32]. La structure secondaire comprendrait à peu près 15 % d'hélices- α , 50 % de feuillets- β et le reste de la structure serait désordonné [33]. Elle serait donc composée de 8 feuillets- β antiparallèles formant une cavité hydrophobe ainsi que d'une hélice- α composée de trois tours (**Figure 5**), chacun faisant environ 3,5 acides aminés.

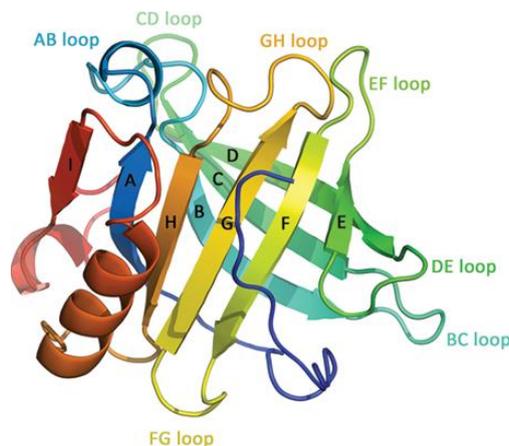


Figure 5. Structure d'un monomère de β -lactoglobuline bovine. Huit β -brins (A-H) forment le calice central antiparallèle du feuillet- β . L'hélice- α à trois spires est représentée en rouge. Le neuvième brin β (I) et la boucle AB sont impliqués dans la formation du dimère. La chaîne polypeptidique est représentée par plusieurs couleurs, commençant en bleu à l'extrémité N-terminale et se terminant en rouge à l'extrémité C-terminale. D'après [31].

La structure et l'agrégation de la β -lactoglobuline dépendent fortement des conditions de pH et de température. Entre 60-70 ° C, la protéine se dénature de manière réversible, tandis qu'à une température élevée (> 90 ° C) elle se déplie, exposant son groupement thiol, et provoquant ainsi une agrégation irréversible de la protéine avec elle-même et d'autres protéines telles que la caséine-k et l' α -lactalbumine [32]. A température ambiante, et lorsque

la β -lactoglobuline est proche de son point isoélectrique ou du pH du lait (soit à un pH compris entre 5,5 et 6,5) elle se trouve sous forme de dimère stabilisé par des interactions électrostatiques [34]. A mesure que le pH diminue, et plus précisément à partir d'un pH égal à 4,65, les dimères de β -lactoglobuline se polymérisent en octamères. En revanche, à un pH inférieur à 2, les dimères de β -lactoglobuline se dissocient en monomères de manière réversible et cela s'explique par des forces électrostatiques répulsives très robustes augmentant à un pH faible [32]. Ces études démontrent ainsi que le couple température/pH demeure très important puisqu'il impacte fortement la conformation de la β -lactoglobuline.

L' α -lactalbumine

L' α -lactalbumine est une protéine globulaire constituée de 123 acides aminés et ayant une masse moléculaire de 14,2 kDa. Elle constitue environ 22 % des protéines solubles dans le lait bovin et a la particularité d'être constituée d'un ion calcium Ca^{2+} [5] et de présenter des sites de liaison du zinc. L'ion calcium favoriserait le repliement de la protéine ainsi que la formation de ponts disulfures. Il existe trois variants de cette protéine mais le plus répandu dans le lait bovin est le variant B qui diffère au niveau de la substitution d'un acide aminé par rapport au variant A [4].

La structure tertiaire de l' α -lactalbumine est typique d'une protéine globulaire. Elle possède une structure tridimensionnelle très semblable à celle du lysozyme avec lequel elle partage 62,6 % d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés [4,5]. Sa structure est composée de quatre ponts disulfures stabilisant les deux domaines dont est constituée la protéine à l'état natif [5]. Le premier domaine, plus large, est composé d'hélices- α et le deuxième domaine, plus petit, est composé de feuillets- β (**Figure 6**). Ces deux domaines sont liés ensemble par un pont disulfures (Cys 73-Cys 91) formant une boucle comportant le site principal de fixation de l'ion de calcium [35]. Un deuxième site de liaison de calcium plus éloigné du premier a également été localisé à la surface de la protéine. Une des fonctionnalités les plus intéressantes de l' α -lactalbumine est sa capacité à se lier à des cations tels que le magnésium, le sodium ou le potassium. Ces derniers peuvent rentrer en compétition avec les ions de calcium et induire des changements au niveau de sa structure [35].

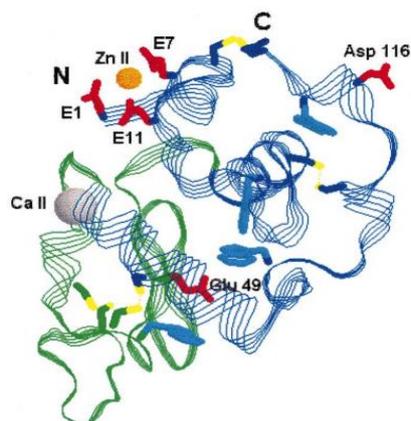


Figure 6. La structure de l'α-lactalbumine bovine. Le domaine d'hélices-α est représenté en bleu et le domaine de feuillets-β en vert. Les ponts disulfures sont de couleur jaune et les résidus prenant part à la coordination des ions Zn²⁺ en rouge. Les sites de liaisons du calcium et du zinc sont représentés en gris et orange respectivement. D'après [35].

La dénaturation de l'α-lactalbumine se fait à des températures plus faibles que celle de la β-lactoglobuline, et plus précisément autour de 64 °C mais cette dénaturation est souvent réversible. De plus, la dénaturation due aux conditions de températures ou de pression dépend fortement de la présence de cations métalliques [35]. En effet, il a été démontré qu'après suppression des ions de calcium, la température de dénaturation de l'α-lactalbumine passait de 64 °C à 35 °C [36]. Cela s'explique par la stabilité que procurent les ions de calcium à la structure tertiaire. Cependant ceci est réversible puisqu'il a aussi été démontré que l'ajout d'ions calcium accélérât et favorisait le repliement de la protéine [37]. A un pH faible, la protéine est dénaturée de manière moins réversible et adopte un état particulier connu sous le nom d'état « globule fondu ». Dans cet état, l'α-lactalbumine maintient sa structure globulaire, mais devient plus enflée à cause d'une forte augmentation de son hydratation [35].

Les autres fractions sériques

L'albumine sérique bovine (ASB) est la troisième fraction sérique majeure et représente 5 à 10 % des protéines solubles totales. Cette protéine est présente dans le sérum sanguin des mammifères ainsi que dans le lait. C'est une protéine large et complexe formée d'une chaîne polypeptidique de 582 acides aminés et ayant un poids moléculaire de 66,3 kDa. Elle est caractérisée par un nombre élevé de résidus de cystéine et possède 17 ponts disulfures

intramoléculaires qui stabilisent sa structure tertiaire, ainsi qu'un groupement thiol libre se trouvant au niveau du résidu Cys34 [5]. Sa structure tertiaire précise n'est toujours pas entièrement caractérisée mais sa conformation serait similaire à l'albumine sérique humaine à hauteur de 76 % [38].

Les immunoglobulines sont une famille de glycoprotéines qui confèrent une protection contre les micro-organismes pathogènes à la muqueuse colique [39]. Le colostrum ainsi que le lait de vache en contiennent différents types (IgA, IgM et IgG) et les IgG demeurent les plus abondants. Sa structure est composée majoritairement de feuillets- β [5].

La lactoferrine est une glycoprotéine globulaire qui existe sous forme de monomère et qui a la capacité de se lier au fer (Fe^{3+}). Elle est composée d'une séquence de 680 acides aminés avec une masse moléculaire de 80 kDa [40].

La fraction des protéoses peptones est une mixture de peptides très complexe produite sous l'action des plasmines. Cette fraction n'a été que très peu caractérisée et semblerait avoir un faible impact technologique [41].

1.3. Les procédés industriels appliqués au lait

Au cours des 50 dernières années, l'industrie laitière a beaucoup évolué en passant d'un simple système de production de lait, de beurre, et de fromage à un système développant des procédés d'extraction afin de valoriser au mieux les matières premières issues du lait [42]. Ces procédés ont permis à l'industrie laitière de créer des ingrédients laitiers à haute valeur ajoutée et de les utiliser dans diverses préparations agro-alimentaires telles que l'enrichissement en protéines de certains aliments, la stabilisation de certains desserts ou l'optimisation du ratio protéines solubles : caséines dans les laits infantiles.

Le lait est un aliment très nutritif et par conséquent très favorable au développement bactérien. Pour assurer sa sécurité et qualité sanitaire, le lait subit donc souvent un traitement thermique en amont des procédés d'extraction. Le type de traitement thermique varie et s'étend de la thermisation (65 °C pendant 15 sec) à la stérilisation (120 °C pendant 10-20 min) ou au traitement à ultra-haute température (UHT : 138-142 °C pendant quelques secondes)

[5]. Avant d'extraire les protéines, l'étape de traitement thermique est souvent couplée à une étape d'écémage dont le processus consiste à centrifuger le lait dans l'objectif de séparer matière grasse et sérum [43]. Cette étape d'écémage est nécessaire avant de procéder à une technique de filtration étant donné que la taille des particules des globules gras et des bactéries est très proche. La séparation des composants du lait peut se faire grâce à deux types de techniques : soit par précipitation simultanée des caséines et protéines solubles sous la triple action d'un traitement thermique, un abaissement de pH et l'ajout de chlorure de calcium, soit par rétention sélective des protéines avec un système de filtration membranaire [44].

1.3.1. Les procédés d'extraction des protéines de lait

Les procédés non dénaturants : ultrafiltration et microfiltration tangentielle

Les procédés membranaires sont utilisés pour séparer deux liquides d'une composition différente, et permettent ainsi de concentrer en éliminant l'eau ou en sélectionnant un composé spécifique [45]. Dans le cas du lait, les principaux procédés de filtration non dénaturants utilisés sont l'ultrafiltration (UF) et la microfiltration (MF) tangentielle, mais aussi l'osmose inverse et la nanofiltration qui ne seront pas discutés dans ce manuscrit.

Ainsi, pour séparer les protéines, le lait est mis dans un système confiné par une membrane, et une pression est créée par une pompe alimentant le système et par une valve accélératrice au niveau du rétentat. Les deux procédés fonctionnent par exclusion de taille et permettent ainsi aux petites molécules de passer à travers la membrane pour former le perméat et les plus grandes molécules sont retenues pour former le rétentat [46].

La différence principale entre ces deux techniques est que l'UF est un procédé de séparation moléculaire dont la taille des pores de la membrane est comprise entre 2 à 20 nm, tandis que la MF est un procédé de séparation particulaire avec une taille de pores plus élevée, comprise entre 0,1 et 10 μm . De plus, la MF dispose d'une pression faible de part et d'autre de la membrane, tandis que l'UF utilise une membrane fonctionnant à haute pression [45].

Le choix de la taille des pores de la membrane et le traitement du lait en amont sont des facteurs importants (**Figure 7**). Ainsi, lorsqu'une membrane MF de 1,4 μm est utilisée, les bactéries (10-100 μm) et les globules gras (10 μm) sont rejetés par la membrane dans le rétentat, et la caséine micellaire (50-500 nm), les protéines du lactosérum (3-6 nm), le lactose (1 nm), les minéraux et l'eau traversent la membrane. Lorsqu'une membrane MF de 0,1 μm est utilisée avec du lait écrémé, les micelles de caséine sont retenues tandis que les protéines solubles passent à travers la membrane, créant ainsi efficacement des concentrés de caséines micellaires natives purifiées [47]. De plus, afin d'obtenir un concentré de protéines solubles davantage épuré, le perméat peut ensuite subir une autre étape de filtration, généralement de l'UF ou de la diafiltration. La diafiltration est un autre principe consistant à ajouter de l'eau, afin d'éliminer certains composants non désirés [45].

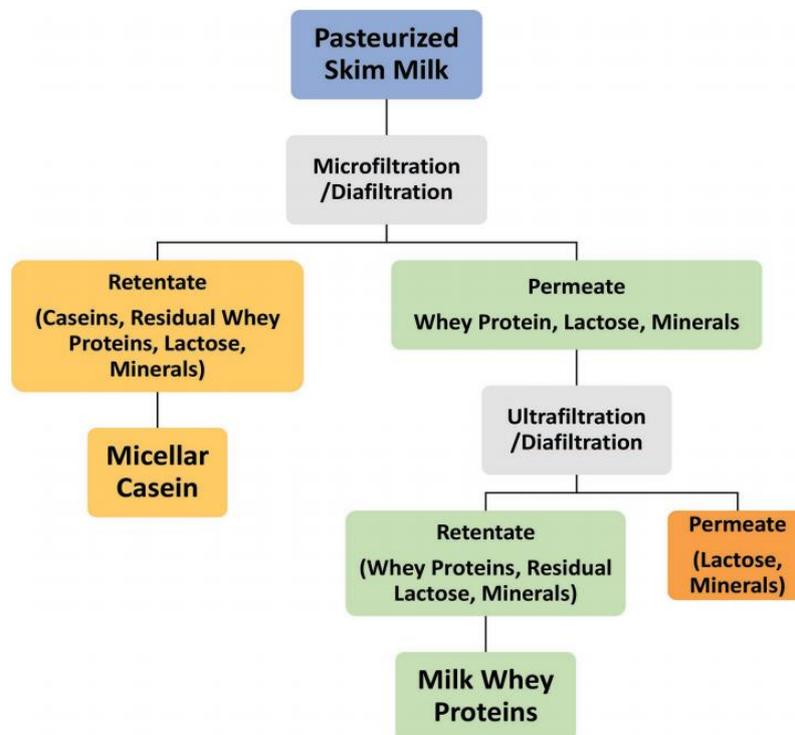


Figure 7. Schéma de l'extraction des caséines micellaires natives et des protéines solubles. D'après [47].

Les procédés d'extraction dénaturants : coagulation enzymatique et acide

Bien que les procédés de coagulation soient régulièrement appliqués pour la fabrication de fromages et de yaourts, le lait peut aussi être soumis à des procédés de coagulation acides et enzymatiques dans l'objectif d'extraire ses protéines.

La coagulation enzymatique implique l'ajout de chymosine afin d'induire la déstabilisation des particules de protéines de lait. Plus précisément, la chymosine hydrolyse la liaison peptidique se situant entre les acides aminés 105 et 106 de la caséine- κ et libère ainsi ce qu'on appelle le caséinomacropéptide (CMP) qui est responsable des répulsions stériques et électrostatiques entre micelles. Ainsi, comme les caséines- κ se trouvent à la surface des micelles de caséines, le retrait du CMP entraîne une réduction de la charge globale des micelles et provoque leur déstabilisation. Ensuite, les caséines passent par une phase d'agrégation dans laquelle elles forment un réseau de micelles qui s'associent ensemble via des liaisons hydrophobes. Ce réseau dépend de la présence d'ions calcium et nécessite de plus une température qui ne soit pas trop élevée. Une phase de séparation se produit ensuite et ce réseau de caséines se réorganise par un processus connu sous le nom de synérèse et au cours duquel le lactosérum exsude [45,48]. La caséine est par la suite purifiée avec des lavages à l'eau sous forte agitation afin d'éliminer le lactose. La dispersion de caséines est ensuite pasteurisée et séparée par centrifugation, puis séchée, fréquemment par attrition [45].

Le processus de coagulation acide s'effectue tout simplement par l'abaissement du pH du lait à 4,6 qui entraîne la précipitation de la caséine. Cette acidification peut être réalisée par l'ajout de cultures bactériennes qui fermentent le lactose en acide lactique, l'ajout direct d'acides minéraux tels que l'HCl (acide chlorhydrique) ou l'H₂SO₄ (acide sulfurique), l'utilisation de glucono-delta-lactone (GDL) qui s'hydrolyse et libère de l'acide gluconique, l'injection de dioxyde de carbone, ou par une combinaison de ces méthodes [49]. La méthode d'acidification dépend du résultat recherché, mais l'abaissement progressif du pH par l'ajout de souches bactériennes ou de glucono-delta-lactone permet d'obtenir un gel. En effet, quand le lait atteint un pH de 5,5, les micelles de caséines fusionnent entre elles grâce à des interactions hydrophobes. De plus, cette diminution de pH provoque une déminéralisation partielle du phosphate de calcium colloïdal et favorise l'association des monomères de caséines présents dans la micelle. Finalement, l'abaissement du pH diminue aussi les répulsions électrostatiques

entre micelles, et ainsi, en dessous d'un pH égal à 5,2 le lait forme un réseau gélifié [48]. En revanche, lorsque l'acidification est réalisée par l'addition brutale d'HCl ou d'H₂SO₄, une floculation de la caséine se produit par déminéralisation complète. De plus, en fonction des températures choisies pendant l'acidification, il est possible d'obtenir des caséines avec des structures différentes. Par exemple, lorsque la température est inférieure à 10 °C, les agrégats de caséines formés sont fins avec une charge minérale faible, tandis que les agrégats sont plus gros et minéralisés avec des températures plus élevées (40-45 °C). Ainsi, en fonction du résultat recherché, l'acide est mélangé au lait écrémé à la température voulue, puis le mélange est chauffé à 45-55 °C afin de provoquer la floculation des caséines. Les agrégats de caséines sont par la suite séparés facilement des protéines solubles par centrifugation ou filtration et c'est ainsi que les caséines acides sont obtenues [45]. Le précipité de caséines peut alors être lavé plusieurs fois afin de se débarrasser du lactose, des sels, et traces d'acides, et atteindre un degré de purification satisfaisant [44]. Le résumé des différents procédés de coagulation se trouvent dans la **Figure 8**.

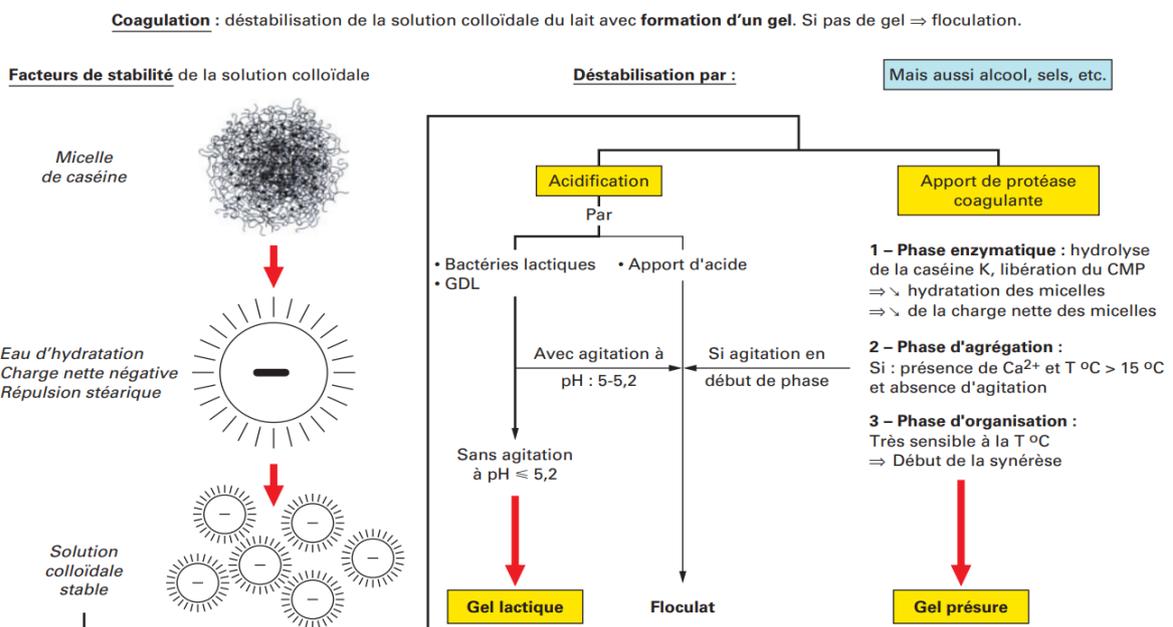


Figure 8. Schéma récapitulatif de la coagulation acide et enzymatique. CMP : caséinomacropeptide ; GDL : glucono-delta-lactone. D'après [45].

Les procédés appliqués après l'extraction des protéines et leurs effets sur la structure

L'organisation et les propriétés fonctionnelles des caséines sont influencées par de nombreux facteurs tels que la température, le pH, l'environnement et la force ionique. Ainsi, après extraction des caséines, des procédés de transformation peuvent être appliqués ultérieurement pour modifier leur structure. Il existe de nombreux procédés de transformations, mais seuls les procédés pertinents dans le cadre de cette thèse seront discutés dans cette section.

Les relations entre les structures et les fonctionnalités des molécules de caséine micellaires natives ou des caséines modifiées sont complexes. De plus, toutes les modifications des facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques peuvent changer les techno-fonctionnalités des caséines [10]. Les échanges de minéraux, d'eau et de molécules de caséine se produisant à l'intérieur de la micelle lors de différents procédés technologiques tels que l'acidification, le traitement thermique, le refroidissement, l'ajout de chélateurs, de chlorure de sodium ou de cations divalents sont présentés dans la **Figure 9**.

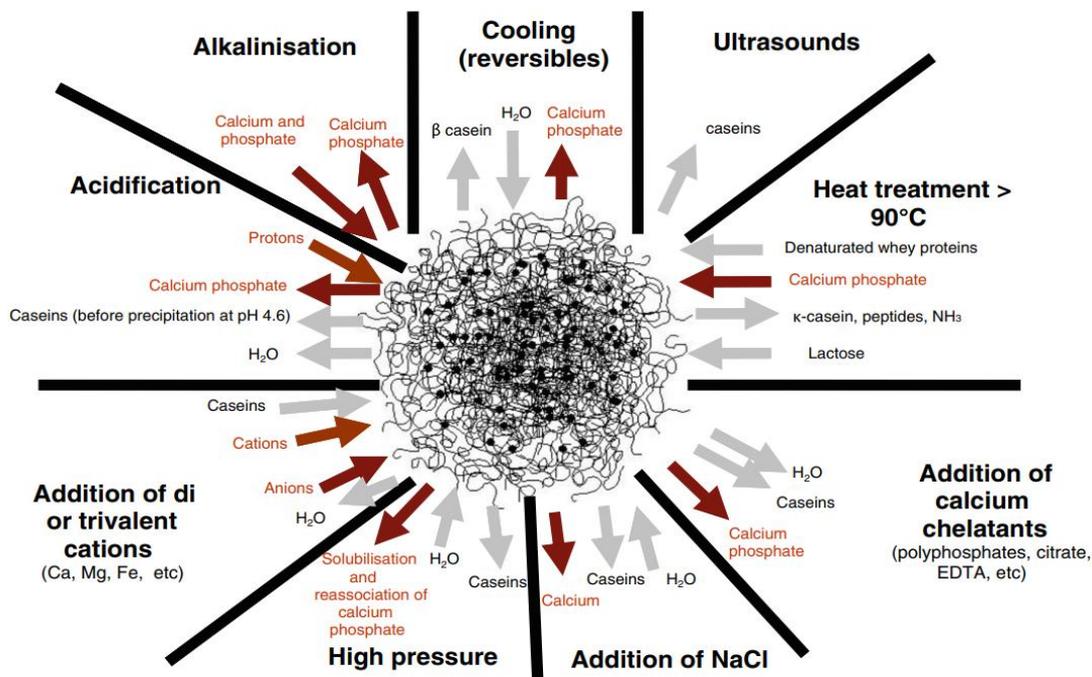


Figure 9. Schéma des échanges de minéraux, d'eau et de molécules de caséine en fonction des différentes conditions physico-chimiques. D'après [12].

Un moyen facile de modifier l'organisation supramoléculaire des micelles de caséine consiste à modifier leur contenu en phosphate de calcium colloïdal. Comme il a été évoqué, le phosphate de calcium colloïdal contribue à la structure et à la stabilité de la micelle de caséine. La déminéralisation peut se faire par l'ajout de sels d'acidification ou de chélation du calcium comme l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), le polyphosphate ou le citrate.

Au niveau structural, la déminéralisation provoque une diminution quantitative des micelles de caséines et induit la formation de petites particules de caséines en suspension [50]. De plus, le processus de déminéralisation réduit le nombre de nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal instables se trouvant à l'intérieur de la micelle, tout en n'impactant pas le nombre des nanoclusters plus stables [51]. En effet, dans la caséine micellaire native, les clusters de phosphate de calcium colloïdal sont composés d'une certaine fraction (environ 15-17%) présentant moins de résidus phosphorylés. Ces clusters de phosphate de calcium colloïdal sont les premiers à être éliminés de la micelle lors de la déminéralisation, car ils sont moins stables [51]. La diminution de la concentration de ces clusters conduirait ensuite à une structure plus lâche et poreuse des caséines déminéralisées [52]. Au niveau des propriétés fonctionnelles, les modifications structurales apportées par la déminéralisation diminuent le pouvoir moussant des caséines [50]. De plus une autre étude a montré que la déminéralisation de la caséine améliorerait ses propriétés émulsifiantes, mais diminuait la stabilité de ses émulsions [53]. Il existe aussi un impact de la déminéralisation sur la réhydratation puisque les caséines déminéralisées forment de gros agrégats non dissous qui résistent à l'agitation. La formation de ces agrégats est d'autant plus importante que la température de réhydratation est élevée [52].

Un procédé couramment appliqué dans l'industrie laitière est celui de la réticulation des caséines micellaires à partir de la transglutaminase. La transglutaminase est une enzyme d'origine microbienne qui a la capacité de provoquer une réaction de transamidation entre des résidus de glutamine et de lysine (**Figure 10**) [54]. Ainsi, cette réaction de pontage peut donc être utilisée industriellement pour réticuler la caséine micellaire. Les stabilités des micelles de caséines natives et des caséines réticulées par la transglutaminase ont été étudiées face à des agents de dissociation, de l'éthanol et le chauffage dans une plage de pH comprise entre 7,0 et 2,0. L'étude a montré que les caséines réticulées avaient une stabilité colloïdale plus élevée que les caséines micellaires natives dans toutes les conditions étudiées.

Selon la littérature et les résultats retrouvés dans ce travail, la transglutaminase a augmenté la stabilité des caséines non seulement par son action de pontage, mais aussi par la stabilisation de la surface en brosse des caséines-K [55]. Ainsi, les micelles de caséines réticulées ont pu former des particules de nanogel plus stables à la coagulation induite par la chaleur que les micelles de caséine natives [10].

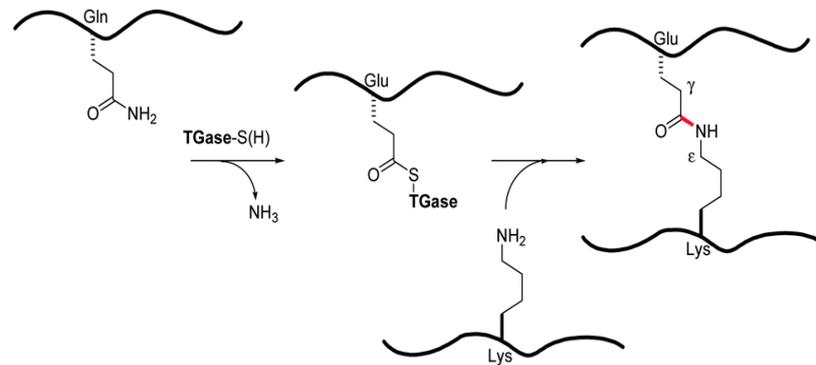


Figure 10. Formation de pontage après ajout de la transglutaminase. D'après [54].

Comme il a été discuté dans la section précédente, les caséines peuvent être extraites par l'ajout d'acides forts tels que l'HCl ou l'H₂SO₄. L'acidification brutale provoque la floculation des caséines, qui deviennent alors acides et très hydratées puisqu'elles sont composées de 50 % d'eau. Deux cas de figures se présentent : ces caséines peuvent subir une étape de séchage et de broyage afin d'être commercialisées en tant que telles, ou elles sont transformées en caséinates par neutralisation. La neutralisation induit une solubilisation partielle ou totale de ces caséines acides, et en fonction de la base utilisée, sont produits soit des caséinates de sodium (hydroxyde de sodium), soit de potassium (hydroxyde de potassium), ou bien de calcium (hydroxyde de calcium). Les caséinates sont ensuite séchés et dispersés à l'aide d'un atomiseur ou d'un sécheur à cylindres qui influe sur la qualité des poudres obtenues. Ainsi, les propriétés et fonctionnalités des caséinates seront variables en fonction de leur structure, leur niveau de minéralisation mais aussi d'affinité pour l'eau [45].

Les techno-fonctionnalités des caséinates (sodium, potassium ou calcium) sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire et peuvent améliorer la viscosité, la structure, la texture de gels et les propriétés émulsifiantes et moussantes de différents produits alimentaires [10]. Au niveau de la structure des micelles de caséines et des caséinates de sodium, des différences sont observées dans la **Figure 11**. En effet, les particules de caséinates de sodium ont des

formes irrégulières et une structure poreuse [56], tandis que la micelle de caséine a une apparence sphérique recouverte par des structures tubulaires ou cylindriques, lui conférant un aspect chevelu à la surface [57]. Ces images démontrent ainsi l'impact des procédés de transformation sur la structure d'une protéine et indiquent qu'une protéine peut donc avoir la même séquence en acide aminés mais une structure différente. De plus, une étude a démontré une différence au niveau de la manière dont les deux types de caséines étaient digérés via un modèle de digestion dynamique (description du modèle **Section 4.2**). En effet, l'hydrolyse gastrique de la poudre de lait contenant des caséines micellaires intactes était beaucoup plus lente que celle de la poudre de caséinate de sodium grâce à sa meilleure capacité de coagulation [58]. Cette étude offre donc de nouvelles perspectives sur la cinétique de coagulation des différents ingrédients protéiques laitiers, et souligne ainsi le rôle critique de la matrice alimentaire dans sa dégradation au cours de la digestion.

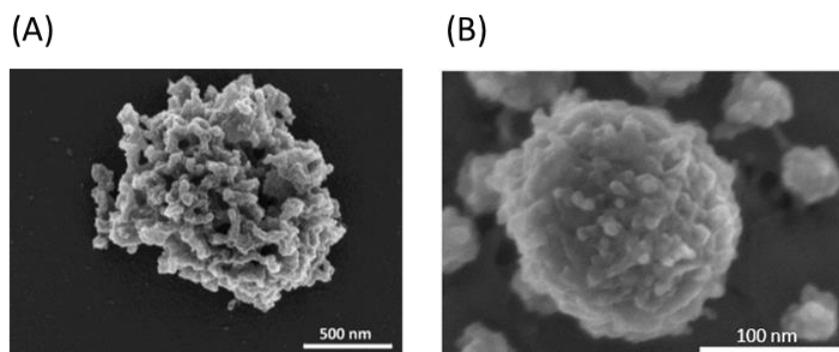


Figure 11. La structure du caséinate de sodium et de la micelle de caséine. Les images ont été obtenues par *Scanning Electron Microscopy* (ou « microscopie électronique à balayage » en français). (A) d'après [59] et (B) d'après [57].

A l'inverse des caséinates de sodium, les techno-fonctionnalités des micelles de caséine sont moins étudiées et utilisées dans l'industrie. Ainsi, la compréhension de la relation entre leurs structures et leurs fonctions est d'un intérêt majeur pour proposer des produits laitiers nouveaux et innovants [10].

2. Digestion et métabolisme des protéines

2.1. Digestion et absorption des protéines

La digestion est un processus physiologique complexe ayant pour objectif de transformer les aliments ingérés en nutriments absorbables par l'organisme. Ce processus est assuré par le tractus gastro-intestinal : le tractus supérieur comprenant la cavité orale, l'œsophage, l'estomac et les trois segments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) ; et le tractus inférieur comprenant le gros intestin composé, lui-même du caecum, du côlon, du rectum et du canal anal. La digestion est aussi réalisée à l'aide des organes digestifs accessoires qui sont les glandes salivaires, le pancréas exocrine, le foie et la vésicule biliaire [60]. L'ensemble des processus de digestion varie en fonction de la nature et de la composition de l'aliment digéré (glucides, lipides, fibres ou protéines). Ce manuscrit se focalisera uniquement sur la digestion et l'absorption des protéines, et cette section présentera la digestion chez l'Homme.

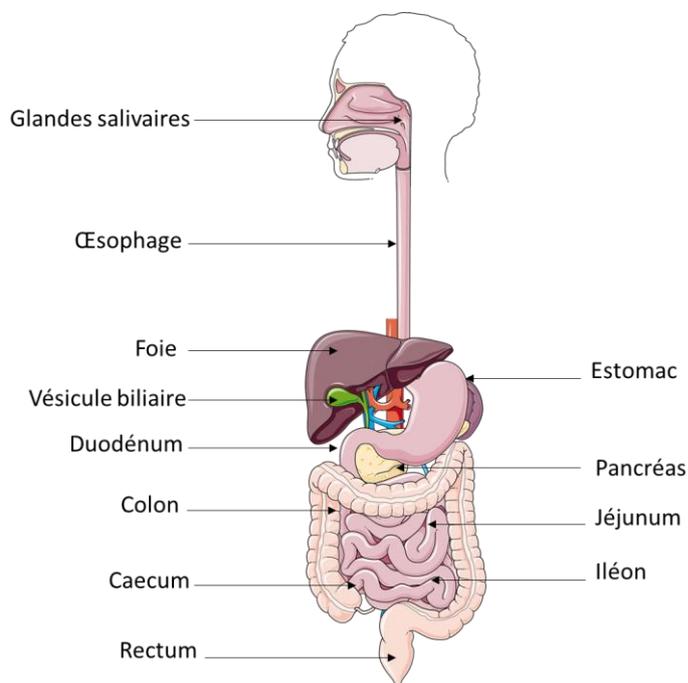


Figure 12. Le tractus gastro-intestinal de l'Homme. L'intestin grêle se divise en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin est composé du caecum, du côlon, et du rectum.

2.1.1. La bouche

La digestion commence au moment où l'aliment est ingéré par la mastication dans la bouche et la sécrétion d'enzymes par les glandes salivaires. Ces enzymes sont les amylases dans le cas de la digestion des glucides et les lipases dans le cas des lipides. Dans le cas particulier des protéines, la digestion enzymatique ne débute que dans l'estomac, et la phase orale ne consiste qu'à déstructurer l'aliment et à le mettre en suspension dans la salive [61].

2.1.2. L'estomac

Le bol alimentaire arrive dans l'estomac par des mouvements péristaltiques tout au long de l'œsophage, provoquant ainsi la sécrétion d'acide chlorhydrique (HCl) par les cellules pariétales de l'estomac. L'acide chlorhydrique dénature les protéines qui se déplient partiellement, exposant ainsi leurs liaisons peptidiques. De plus, les cellules de la paroi gastrique sécrètent la pepsine sous une forme inactive, ou zymogène, appelée pepsinogène. L'environnement acide de l'estomac altère la conformation du pepsinogène qui se clive et devient actif par autocatalyse. Ainsi, après activation, la pepsine exerce son rôle d'endopeptidase avec notamment une plus grande spécificité pour la partie C-terminale des résidus d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) [62]. Dans l'estomac, les protéines sont hydrolysées à hauteur de 10 à 15 % [61] et seule une faible quantité d'acides aminés libres est générée à ce stade [63].

Les contractions des muscles lisses au niveau de l'antrum de l'estomac réduisent la taille des particules alimentaires et permettent au chyme (l'aliment partiellement digéré) d'atteindre le duodénum via le pylore. Le chyme est évacué dans l'intestin grêle, la vitesse de vidange gastrique est influencée par différents facteurs tels que la nature [64,65], la consistance [66], et la valeur énergétique du repas [67,68]. D'un point de vue physiologique, la vidange gastrique est régulée par des hormones telles que la cholécystokinine (CCK), le *gastric inhibitory peptide* (GIP), le glucagon, le *glucagon-like-peptide 1* (GLP-1) et le peptide YY (PYY) qui la retardent quand elles sont sécrétées dans le tractus gastro-intestinal [69]. La vitesse de vidange gastrique est importante puisqu'elle impacte le devenir métabolique des acides

aminés en contrôlant la cinétique d'absorption des protéines [70] (discuté dans la **partie 3** de cette introduction).

2.1.3. L'intestin grêle

Digestion dans l'intestin grêle

Lorsque le chyme atteint l'intestin grêle, la digestion enzymatique se poursuit avec la sécrétion des protéases pancréatiques. L'arrivée du chyme dans le duodénum provoque la libération de la sécrétine qui à son tour stimule la sécrétion du bicarbonate de sodium. La sécrétion de bicarbonate a pour rôle de neutraliser l'acidité stomacale du chyme provoquant la dénaturation irréversible et donc l'inactivation de la pepsine [71], et permet aussi d'atteindre le pH optimal pour l'action des enzymes pancréatiques, qui varie de 6 dans le duodénum à 7,4 dans l'iléon terminal. Il existe différents types d'enzymes libérés par le pancréas sous leur forme inactive de zymogène (**Tableau 1**) : le trypsinogène, le chymotrypsinogène, la proélastase et les procarboxypeptidases.

Tableau 1. Caractéristique des enzymes impliqués dans la digestion des protéines. D'après [61].

Enzyme	Activation	Action	Points de clivage	Produits
Pepsine	Autoactivation	Endopeptidase	Tyr, Phe, Leu, et Asp	Larges peptides et AA libres
Trypsine	Entéropeptidase et trypsinogène	Endopeptidase	Arg, Lys, et AA basiques	Oligopeptides (2 à 6 AA)
Chymotrypsine	Trypsine	Endopeptidase	Tyr, Trp, Phe, Leu, Gln, Met	Oligopeptides (2 à 6 AA)
Elastase	Trypsine	Endopeptidase	Ala, Gly, Tyr, Phe, Trp	Oligopeptides (2 à 6 AA)
Carboxypeptidase A	Trypsine	Exopeptidase	AA situés à l'extrémité carboxylique	AA libres
Carboxypeptidase B	Trypsine	Exopeptidase	Arg, Leu, Met, Glu, Asp	AA libres
Amino-peptidases	Cytoplasme des entérocytes	Exopeptidase	Terminaison amine	AA libres

Le trypsinogène est activé en trypsine sous l'action de l'entéropeptidase (anciennement entérokinase) située au niveau de la bordure en brosse jéjunale. L'activation de la trypsine provoque ensuite une réaction en cascade et catalyse ainsi le clivage des autres zymogènes pour les activer. De ce fait, les protéases pancréatiques peuvent cliver les polypeptides en oligopeptides et en acides aminés. La trypsine, la chymotrypsine et l'élastase sont des endopeptidases. La trypsine est l'enzyme la plus spécifique et clive les liaisons peptidiques au niveau des résidus de lysine et d'arginine. La chymotrypsine et l'élastase quant à elles sont moins spécifiques. Ainsi, la chymotrypsine hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des résidus d'acides aminés hydrophobes, et l'élastase agit au niveau des liaisons adjacentes aux résidus d'alanine, de glycine et de sérine [61].

Les oligopeptides générés par les endopeptidases sont ensuite soumis à l'action des exopeptidases qui regroupent les carboxypeptidases A et B sécrétées aussi initialement sous forme de zymogènes. Elles hydrolysent les liaisons peptidiques situées au niveau de la partie C-terminale. A ce stade de la digestion, le produit de dégradation des protéines équivaut à 30 % d'acides aminés libres et 70 % d'oligopeptides d'une taille de 2 à 8 acides aminés [61]. Les acides aminés libres, les di- et les tri-peptides sont absorbés par les entérocytes et les oligopeptides continuent d'être hydrolysés, ou exercent leur activité biologique par des voies métaboliques qui ne sont pas encore toutes élucidées [72]. L'étape finale de la digestion des protéines a lieu au niveau de la membrane de la bordure en brosse et à l'intérieur des entérocytes. A la surface de la membrane de la bordure en brosse se trouvent des aminopeptidases qui hydrolysent les oligopeptides principalement en di- et tri-peptides ainsi qu'en acides aminés libres [73]. Les acides aminés libres et les di- et tri-peptides sont ensuite transportés dans les entérocytes par des systèmes de transport spécifiques. Une fois arrivés à l'intérieur des cellules, ces petits peptides sont hydrolysés par des peptidases cytoplasmiques afin de libérer des acides aminés libres qui seront utilisés directement par les entérocytes, ou convoyés via la veine porte vers les différents organes et tissus [74]. Un résumé de la digestion et l'absorption des protéines est présenté dans la **Figure 13**, avec les systèmes de transport spécifiques décrits de manière plus détaillée dans le paragraphe suivant.

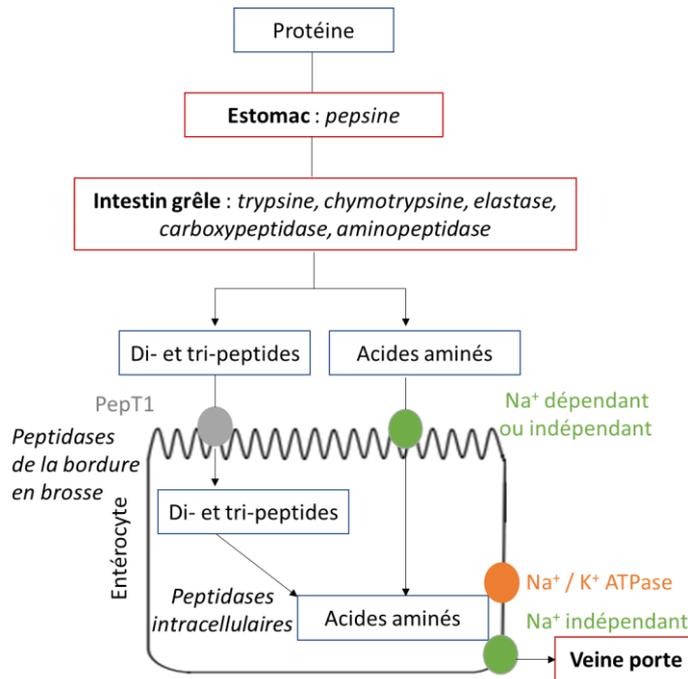


Figure 13. Résumé des mécanismes impliqués dans la digestion et l'absorption des protéines. D'après [61].

Absorption dans l'intestin grêle

Le système d'absorption intestinale des composés protéiques est un processus complexe du fait de la variété des molécules libérées lors de la digestion (acides aminés, di- et tri-peptides, oligopeptides). L'absorption des di- et tri-peptides et des acides aminés libres issus de la digestion des protéines se fait tout au long de l'intestin grêle mais principalement au niveau proximal pour les peptides et au niveau distal pour les acides aminés libres [74]. De plus, il a été mis en évidence chez l'Homme [75] et chez le rat [76] que certains di- et tri-peptides pouvaient être résistants aux peptidases cytosoliques et seraient transportés intacts vers la circulation sanguine. L'absorption de plus gros peptides ayant une séquence de 10-51 acides aminés a aussi été observée [76,77], ainsi que l'absorption de protéines entières [78–80] mais seule une fraction très mineure traverserait l'épithélium intestinal sous forme intacte [81].

L'entrée dans les entérocytes depuis la lumière intestinale peut se faire de plusieurs manières : par voie paracellulaire ou par voie transcellulaire (**Figure 14**) [82]. La voie transcellulaire inclut différents modes de passages qui sont la diffusion passive au travers des entérocytes, l'endocytose, et l'absorption par des systèmes de transports spécifiques.

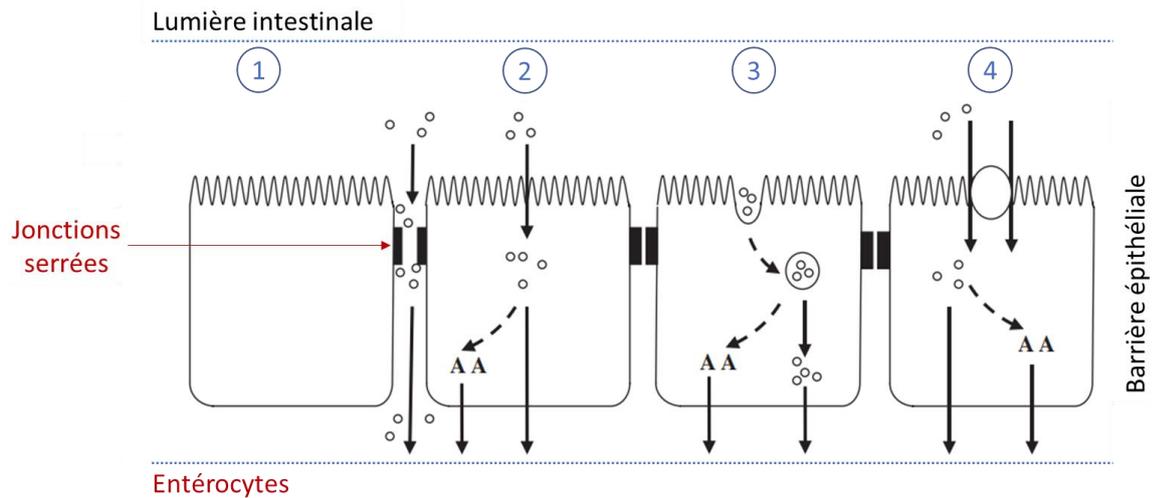


Figure 14. Mécanismes de transport des peptides et acides aminés libres dans l'épithélium de l'intestin grêle. 1) Voie paracellulaire : l'augmentation de la perméabilité des jonctions serrées peut permettre le passage peptides. 2) Diffusion passive : les peptides traversent les entérocytes en fonction de leurs propriétés. 3) Endocytose : les peptides sont transportés par la formation d'une vésicule puis libérés par exocytoses. 4) Transport actif médié par un transporteur (PepT1). À l'intérieur de l'entérocyte, les peptides peuvent être hydrolysés en leurs acides aminés constitutifs avant d'être transportés à travers la membrane basolatérale par des transporteurs d'acides aminés spécifiques. D'après [82].

Le passage par voie paracellulaire est conditionné par l'organisation des structures qui maintiennent en contact les cellules épithéliales intestinales adjacentes. Ces structures comportent les jonctions serrées, les jonctions d'ancrage et les jonctions communicantes. Une augmentation de la perméabilité des jonctions serrées permet le passage de molécules (surtout les cations et petits peptides hydrosolubles) à travers les pores [83].

La diffusion passive des molécules à travers les entérocytes dépend fortement des propriétés lipophiles des peptides et seuls les peptides très liposolubles ont la possibilité de pénétrer la membrane hydrophobe [83]. L'endocytose implique surtout le passage des peptides plus larges qui sont transportés à l'aide de vésicules. Ces vésicules migrent de la membrane apicale à la membrane basolatérale avec laquelle elles fusionnent dans le but de libérer les peptides par exocytose [78,82]. Finalement, la majorité de l'absorption des peptides et acides aminés libres se fait via les transporteurs spécifiques présents aux membranes apicales ou basolatérales des entérocytes. Bien que ce moyen d'absorption soit coûteux d'un point de vue énergétique, cela reste le moyen d'absorption majoritaire chez le sujet sain [78].

Dans le cas des di- et tri-peptides, le principal transporteur identifié est le *peptide transporter 1* (PepT1), un système à faible affinité et haute capacité, capable de transporter les 400 dipeptides et 8000 tripeptides issus de la combinaison des 20 acides aminés alimentaires [84]. Ce système est très efficace puisqu'il a été démontré que le transport des acides aminés sous forme de peptides était plus rapide que celui des mêmes acides aminés consécutifs sous forme libre [85]. PepT1 est un cotransporteur peptide/proton dont la force motrice est un gradient électrochimique H^+ dirigé de la lumière intestinale vers le cytoplasme des entérocytes [86]. Ce gradient électrochimique est généré et maintenu par des échangeurs Na^+/H^+ (connus aussi sous le nom d'ATPases) présents sur la membrane de la bordure en brosse, couplés à des échangeurs Na^+/H^+ présents au niveau de la membrane basolatérale et qui permettent d'éliminer le Na^+ des cellules. L'activité de PepT1 peut être influencée par différents facteurs dont la concentration et le type de substrat, ou alors la sécrétion de certaines hormones [87]. Les mécanismes ne sont pas bien élucidés, en revanche il a été révélé que certains dipeptides alimentaires pouvaient directement réguler l'activité de PepT1 en stimulant l'expression de son gène [88,89]. De plus, l'insuline [90] ou l'hormone de croissance hGH [91] pourraient aussi moduler son activité.

L'absorption des acides aminés s'effectue par le biais d'une très grande variété de systèmes de transport acceptant des groupes d'acides aminés plutôt que des acides aminés individuels [92]. Les transporteurs peuvent présenter une stéréospécificité ou alors transporter plusieurs groupes acides aminés différents. De la même manière, les acides aminés peuvent être transportés via divers transporteurs [61]. Ainsi, les transporteurs d'acides aminés ont été définis en fonction de deux critères principaux : le type d'acides aminés transportés (acide, neutre, zwitterionique, basique) et le mécanisme de transport utilisé (un co-transporteur d'acides aminés (Na^+ ou H^+), un uniport ou un symport). Les détails concernant les différents transporteurs d'acides aminés se trouvent dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Transporteurs d'acides aminés. D'après [92].

Catégorie	Système	Famille SLC	AA transporté	Type	Situation membranaire
AA neutres	B ⁰ AT1	SLC6A19	Tous les AA	Co transport AA/Na ⁺	Apicale
AA neutres	ASCT2	SLC1A5	AA neutres	Antiport AA/Na ⁺ cotransport non électrogénique	Apicale
AA neutres	4F2/LAT2	SLC3A2/ SLC7A8	AA neutres sauf Proline	Echangeur AA/AA	Basolatérale
AA neutres et cationiques	BAT/b ⁰⁺ AT	SLC3A1/ SLC7A9	AA cationiques et cystéine	Echangeur AA/AA	Apicale
AA cationiques	4F2/γ ⁺ LAT1	SLC3A2/ SLC7A7	AA cationiques	Antiport AA/Na ⁺	Basolatérale
AA anioniques	EAAT3	SLC1A1	AA anioniques surtout Glutamate	Co-transport AA/Na ⁺ et K ⁺	Apicale
Autres	PAT1	SLC36A1	Proline et Glycine	Co-transport AA/H ⁺	Apicale
Autres	IMINO	SLC6A20	Proline	Co-transport AA/Na ⁺	Apicale

Comme mentionné précédemment, au cours de la digestion des protéines, certains peptides peuvent résister à l'hydrolyse complète par les peptidases et traverser la barrière épithéliale intestinale sous forme intacte. De ce fait, de nombreuses études ont été menées sur ces peptides, et plus particulièrement sur leurs activités biologiques et leurs bénéfices potentiels pour la santé. Ils sont qualifiés de peptides bioactifs et sont composés généralement d'une séquence de 3 à 20 acides aminés [93]. Il existe à ce jour plus de 4000 peptides bioactifs recensés sur BIOPEP, une base de données mettant à disposition des outils pour évaluer les protéines comme précurseurs de peptides bioactifs [94]. Le champ d'activité des peptides bioactifs est très large et comprend des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire en abaissant l'hypertension [95] ou l'hypercholestérolémie [96], des activités antioxydantes [97] ou encore des activités au niveau de la régulation de la prise alimentaire via leurs effets sur la sécrétion d'hormones [72,98,99]. Pour identifier ces peptides bioactifs, il est donc nécessaire d'avoir recours à la peptidomique, qui se définit comme l'analyse qualitative et quantitative complète de tous les peptides présents dans un échantillon biologique [100]. Appliqué au

domaine de l'alimentation, cette discipline a pour but d'étudier le peptidome, c'est-à-dire l'ensemble de peptides issus d'une matrice alimentaire, mais aussi de suivre son évolution pendant les procédés de transformation, de stockage, ou pendant la digestion [101]. Ainsi, en partant d'un mélange peptidique obtenu au cours de la digestion, la peptidomique permet d'aboutir à l'identification et la caractérisation des peptides du mélange.

2.1.4. Le côlon

Entre la part de protéines endogènes (protéines issues des sécrétions digestives et des cellules desquamées) et la part de protéines alimentaires, il est estimé qu'une quantité non négligeable, d'environ 12 à 18 g de protéines par jour pénètre le côlon, en fonction de la quantité de protéine ingérée [102]. Chez l'Homme, une étude a démontré que l'azote total entrant dans le côlon serait majoritairement sous forme de protéines non digérées (50 %), de peptides résistants aux enzymes digestives (20-30 %) et serait également composé d'urée, d'ammoniaque, et d'acides aminés libres ayant échappé à l'absorption (<10-15 %) [103]. La part précise de protéine alimentaire intacte atteignant le côlon reste à ce jour indéterminée [102]. Ces composés protéiques sont digérés par le microbiote colique grâce à des protéases et peptidases extracellulaires, et libèrent des acides aminés qui pénètrent dans les bactéries afin d'être utilisés dans différentes voies métaboliques [104]. Certains servent directement de substrat pour la synthèse protéique des bactéries, et d'autres sont catabolisés et génèrent divers métabolites tels que des acides gras à chaîne courte ou ramifiée, du sulfure d'hydrogène, de l'ammoniac et des composés phénoliques ou indoliques [104]. L'ammoniac peut aussi être directement généré à partir de l'urée sous l'action d'uréases bactériennes. De plus, des acides aminés peuvent être synthétisés *de novo* par la flore bactérienne à partir de composés précurseurs dérivés du métabolisme central, tels que le pyruvate ou l'oxalate [104]. Le détail des réactions est résumé dans la **Figure 15**.

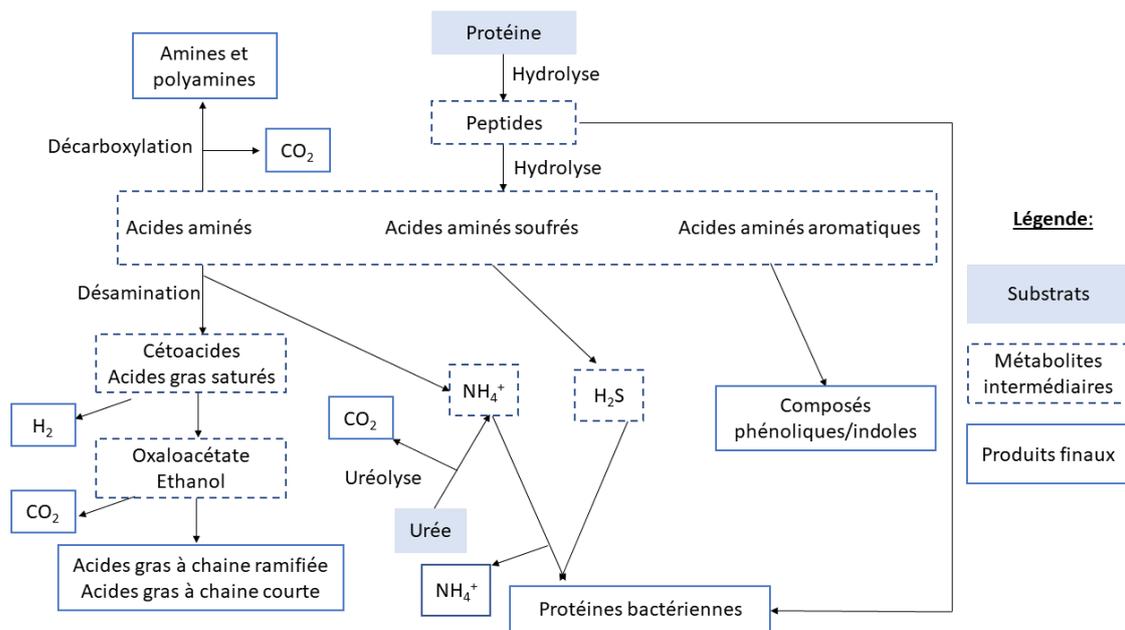


Figure 15. Métabolisme protéique du microbiote intestinal. D'après [104].

En ce qui concerne l'absorption dans le côlon, l'expression de transporteurs d'acides aminés et de PepT1 chez l'Homme [105] laisserait penser qu'une absorption des acides aminés au niveau colique peut encore avoir lieu. Cependant, l'expression génique de ces transporteurs ne prouve pas que ceux-ci sont actifs ou même présents sur les membranes apicales et basolatérales des colonocytes [106], et bien qu'une absorption des acides aminés ait été démontrée chez le jeune porc [107,108], il est actuellement admis que celle-ci serait mineure chez les espèces non-ruminantes [109]. Des études *in vivo* supplémentaires seraient nécessaires afin de valider l'hypothèse d'une absorption colique significative des acides aminés et di et tri-peptides, et si elle venait à être démontrée, il serait alors important de la prendre en compte dans l'évaluation de la qualité des protéines alimentaires.

2.2. Métabolisme et homéostasie des acides aminés

2.2.1. Renouvellement du pool protéique

Chez l'homme adulte de 70 kg en bonne santé, les protéines constituent environ 12 kg de sa masse corporelle. Ces 12 kg de protéines sont distribués de manière à peu près égale entre

les protéines musculaires et non-musculaires [110]. Ces protéines corporelles sont constamment renouvelées par des mécanismes de synthèse et de dégradation protéique (**Figure 16**). Ce processus est connu sous le nom de turnover protéique, et se définit comme le maintien de l'équilibre entre la synthèse protéique et la dégradation protéique (protéolyse).

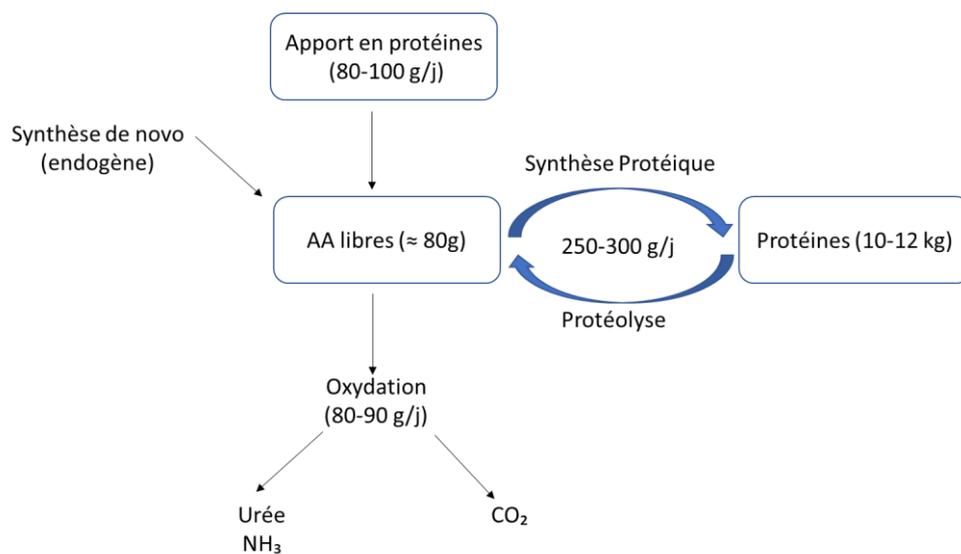


Figure 16. Représentation schématique des voies métaboliques principales impliquées dans l'homéostasie des protéines et le métabolisme des acides aminés *in vivo*. D'après [111].

La vitesse de renouvellement protéique varie en fonction des tissus. Elle est estimée à 250 g/jour répartis différemment : 80 g/jour pour les muscles, 120 g/jour pour le foie, le pancréas, l'intestin et les cellules sanguines, et le reste pour les autres tissus [112]. Il n'existe pas de réserves de protéines corporelles, mais la synthèse protéique est assurée grâce à un compartiment d'acides aminés libres corporels se renouvelant tous les jours à partir des protéines ingérées, dégradation des protéines corporelles, et de la synthèse d'acides aminés de novo [112]. Les protéines corporelles sont ainsi en permanence catabolisées et synthétisées.

Bien qu'il existe une centaine d'acides aminés présents dans la nature, seuls 20 sont requis par l'organisme pour la synthèse de toutes les protéines corporelles [113]. De plus, parmi ces 20 acides aminés, il en existe neuf qui sont dits indispensables : l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Ces

acides aminés sont indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme à partir de substrats usuels à une vitesse suffisante pour répondre aux besoins [114]. Ainsi, ils doivent être apportés en quantité suffisante par l'alimentation, pour maintenir une croissance normale chez les enfants et adolescents, et un bon équilibre azoté chez les adultes [115]. Les acides aminés non indispensables quant à eux peuvent être directement synthétisés à partir de précurseurs carbonés et azotés, principalement dans le foie, via diverses voies métaboliques.

2.2.2. Métabolisme splanchnique des acides aminés

L'étape digestive est une étape clé de l'assimilation des protéines puisqu'elle contrôle le flux de libération des acides aminés dans la circulation portale afin qu'ils rejoignent le pool d'acides aminés corporels [112]. Le foie, l'intestin, ainsi que leurs organes accessoires (rate et pancréas) constituent les tissus splanchniques. Pendant la phase postprandiale, les acides aminés absorbés sont d'abord métabolisés par l'aire splanchnique avant d'être disponibles pour les tissus périphériques, et en particulier les muscles [116]. Le foie et le tractus gastro-intestinal constituent environ 10 % du poids des protéines corporelles. En revanche, ils représentent 30 à 35 % de la dépense énergétique et du renouvellement des protéines du corps entier [117–119]. Le coût métabolique substantiel de l'aire splanchnique est lié aux nombreuses fonctions physiologiques critiques qu'elle assure pour l'organisme tels que la digestion, l'uréogénèse, la gluconéogénèse et la synthèse protéique [120]. Les acides aminés atteignant l'aire splanchnique sont à la fois d'origine alimentaire et endogènes. Une fois absorbés par l'intestin, les acides aminés ont trois devenir possibles : (1) l'incorporation directement dans les synthèses protéiques ; (2) la conversion par transamination ou désamination en d'autres acides aminés, substrats métaboliques ou composés intermédiaires ; ou (3) l'oxydation complète en CO₂ à des fins énergétiques [120].

Pour réaliser ces réactions métaboliques, l'aire splanchnique extrait les acides aminés par le biais de deux sources différentes. Dans le cas de l'intestin, les acides aminés reçus sont alimentaires mais aussi endogènes avec un apport provenant directement de la lumière intestinale ainsi que de la circulation systémique via les artères mésentériques supérieures et inférieures. Dans le cas du foie, les acides aminés exogènes et endogènes sont délivrés grâce

à l'intestin grêle et sont également issus de la circulation systémique via l'artère hépatique [121,122]. Les quantités d'acides aminés retenues puis utilisées par l'aire splanchnique dépendent de plusieurs facteurs tels que la composition du repas, la quantité et qualité des protéines, les cinétiques de digestion ou encore de paramètres physiologiques comme l'âge. Ces différents facteurs sont discutés dans la **partie 3** de cette introduction.

Métabolisme des acides aminés au niveau intestinal

L'épithélium étant en renouvellement tous les 4 à 5 jours [123], l'intestin participe fortement au coût métabolique des tissus splanchniques. Le système gastro-intestinal a pour fonction principale de digérer et d'absorber les nutriments. Au cours de ce processus, les organes digestifs utilisent des quantités substantielles d'acides aminés afin d'assurer la synthèse des protéines structurales et sécrétoires. De plus, l'énergie oxydative nécessaire pour le transport actif des nutriments, et la reconstitution des cellules épithéliales et des enzymes digestives renforce ce besoin élevé en acides aminés [120].

La quantité d'acides aminés exogènes retenue dans la lumière et tissus du tractus gastro-intestinal peut atteindre 30 à 50 % selon la quantité de protéines dans le régime alimentaire et la composition du repas [124]. Chez des porcs en bonne santé ayant reçu un repas de caséine par voie entérale, l'extraction des acides aminés par les viscères drainés par la veine porte était estimée à 40 – 65 % [125]. Le sort métabolique n'est pas le même pour tous les acides aminés présents dans l'intestin grêle car ils peuvent être dégradés, synthétisés ou alors rester intacts.

La revue de la littérature de Wu *et al.*, suggère qu'il y aurait un catabolisme substantiel des acides aminés à chaîne ramifiée (AACR : incluant la leucine, isoleucine, et valine) dans l'intestin grêle de différents mammifères. Chez le chien, il est estimé que, 30 % de la leucine serait extraite par l'intestin grêle [126] et cette valeur s'étendrait de 20 à 30 % chez l'Homme [127]. Chez le porc en croissance 30 à 40 % des AACR seraient séquestrés par l'intestin [118]. Par ailleurs la glutamine, le glutamate et l'aspartate sont les acides aminés alimentaires les plus catabolisés par l'entérocyte, et sont donc peu disponibles pour les autres tissus [128]. Environ 55 %, 66 %, et presque 100 % de glutamine délivrée par voie entérale sont séquestrés au

premier passage par l'intestin grêle des humains adultes [129], des rats adultes [130] et des porcs en croissance [118] respectivement.

Métabolisme des acides aminés au niveau hépatique

Après avoir été absorbés et partiellement catabolisés par l'intestin grêle, les acides aminés rejoignent le foie via la veine porte. Le foie est un organe majeur de captation et de métabolisme des acides aminés. Il est estimé que 20 % des acides aminés captés par le foie sont utilisés pour sa synthèse protéique, 57 % sont catabolisés et 23 % sont excrétés dans la circulation sanguine en direction des organes périphériques [112]. Le foie synthétise ses propres enzymes (comme la transaminase), mais aussi des protéines qu'il excrète dans la circulation telles que l'albumine, ou encore du fibrinogène ou la *retinol binding protein*. Les réactions de catabolisme démarrent dans le foie principalement par des réactions de désamination et de transamination (**Figure 17**).

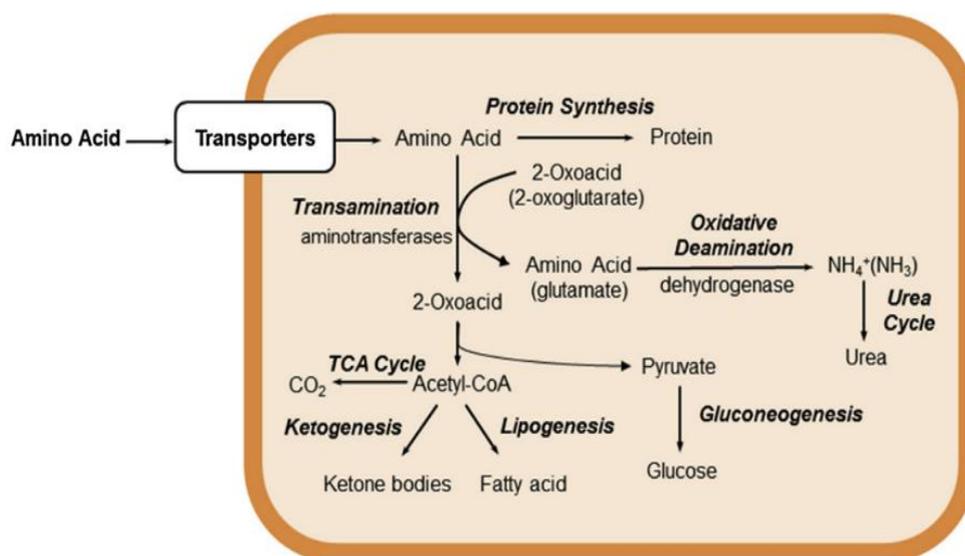


Figure 17. Schéma récapitulatif du métabolisme des acides aminés dans le foie. D'après [131].

Pendant la désamination, l'acide aminé perd son groupe α -aminé, et lors de la transamination, un transfert du groupe α -aminé vers un acide α -cétonique a lieu, conduisant ainsi à la

formation d'un nouvel acide aminé. Les squelettes carbonés issus de la désamination peuvent être convertis en de nombreux métabolites énergétiques en fonction des besoins, notamment en glucose via la néoglucogenèse, ou en corps cétoniques via la cétogenèse. En fonction du devenir de leur squelette carboné, certains acides aminés peuvent ainsi être qualifiés de glucoformateurs ou de cétoformateurs (**Tableau 3**) [112]. Ces squelettes carbonés peuvent aussi être oxydés dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie (ATP) et libérer du CO₂ [132]. Par transamination, de nombreux acides aminés transfèrent le groupe α-aminé au 2-oxoglutarate pour former du glutamate, qui est ensuite désaminé par oxydation et produit des ions ammonium (NH₄⁺). La désamination oxydative du glutamate est catalysée par la glutamate déshydrogénase qui est localisée dans les mitochondries, et le NH₄⁺ qui en résulte intègre le cycle de l'urée [131].

Tableau 3. Classification des acides aminés en fonction de leur devenir dans le foie. D'après [112].

AA glucoformateurs	AA cétoformateurs	AA glucoformateurs et cétoformateurs
Ala, Gly, Ser, Cys, Pro, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Met, Val, His Pro	Leu	Phe, Ile, Trp, Tyr, Lys

La synthèse de l'urée permet d'éviter l'accumulation d'ammonium toxique et de bicarbonate (HCO₃⁻) qui sont ainsi évacués de l'organisme sous forme d'urée. Après sa formation, la majorité de l'urée est transportée dans les reins via le sang puis excrétée dans les urines. Cependant, il est aussi estimé qu'environ 10 % de l'urée est transformée par les bactéries du côlon en ammoniac, qui serait ensuite utilisé pour la synthèse des acides aminés de novo dans l'organisme, notamment en période de jeûne. Les 10 % de l'urée restants sont excrétés dans les fèces [133].

2.2.3. Métabolisme des acides aminés au niveau des organes périphériques

Après séquestration par l'aire splanchnique, les acides aminés non utilisés sont rendus disponibles pour les tissus périphériques. Les taux de synthèse protéique dans les organes périphériques sont nettement inférieurs à ceux dans les tissus splanchniques. Ceci est particulièrement le cas des tissus musculaires qui ont les taux de synthèse protéique les plus faibles de tous les tissus, alors qu'ils représentent la plus grande proportion de masse protéique du corps entier. Des études de modélisation compartimentale ont montré que la rétention postprandiale de l'azote alimentaire par les tissus périphériques variait entre 20 % et 40 % respectivement en fonction de la source protéique [134] et de la composition du repas [135].

Les acides aminés préférentiellement transférés et utilisés par les tissus périphériques sont les AACR. En effet, l'étape initiale du catabolisme des AACR n'a pas lieu majoritairement dans le foie en raison de la faible activité hépatique de l'aminotransférase d'acides aminés à chaîne ramifiée, la première enzyme à être impliquée dans la voie du catabolisme des AACR [136]. Cette enzyme est particulièrement présente dans les muscles où 60 % des AACR alimentaires sont métabolisés. Cela conduit ainsi à la formation de glutamate à partir du transfert du groupe amine à un α -cétoglutarate, mais aussi à des acides cétoniques à chaîne ramifiée. Ces acides réaminés circulent ensuite dans l'organisme et peuvent servir de substrat énergétique pour les organes [137].

2.2.4. Focus sur la synthèse protéique

La synthèse protéique débute avec une étape de transcription durant laquelle les informations du code génétique de la protéine à synthétiser sont transférées de l'ADN à l'ARN messager (ARNm). Une fois que l'ARNm est transcrit, il est composé de triplets de nucléotides appelés codons correspondant à des acides aminés spécifiques. Après la transcription, l'ARNm est transporté du noyau vers le cytoplasme où sa traduction en protéine se déroule en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Ces étapes sont médiées par des facteurs d'initiations eIFs (« *eukaryotic Initiation Factor* » de l'anglais), d'élongation eEFs (« *eukaryotic elongation factors* » de l'anglais), et de terminaison eRFs (« *eukaryotic release factors* » de

l'anglais). L'ARN de transfert (ARNt) déchiffre le code de l'ARNm et chaque type d'acide aminé possède son propre type d'ARNt qui le lie à la chaîne polypeptidique en formation lors de l'élongation [138].

L'insuline et les acides aminés ont des rôles de régulateurs sur la synthèse des protéines corporelles. Le rôle précis de l'insuline continue de faire l'objet de débat, mais certaines études montrent que l'insuline aurait la capacité de stimuler le transport des acides aminés dans les tissus avec un effet plus important selon le système de transport [139] ou le tissu en question. En effet, il a été démontré que l'impact de l'insuline sur la stimulation de la synthèse protéique était plus important au niveau musculaire que dans le foie [140]. En revanche, les études ne démontrent pas un rôle exclusif de l'insuline sur l'anabolisme protéique puisque celui-ci est généralement associé à une hyperaminoacidémie [141–144]. Il est aussi possible que l'insuline aurait surtout un rôle d'inhibiteur de la protéolyse [145–147]. Les acides aminés quant à eux, auraient directement un rôle stimulateur de la synthèse protéique [148]. Contrairement à l'insuline, leur effet stimulant s'étendrait aussi plus largement aux tissus splanchniques [149]. De plus, il semble également que les AACR jouent un rôle important dans la stimulation de la synthèse protéique, notamment au niveau musculaire. Des études *in vitro* réalisées sur cellules musculaires ont montré que les AACR stimulaient la synthèse protéique et inhibaient la protéolyse [150,151] et des résultats similaires ont été retrouvés chez le rat [152,153] avec un rôle particulièrement important de la leucine. En effet, parmi les AACR, la leucine aurait le rôle le plus efficace [154] par sa capacité à agir seule sur la régulation de la synthèse protéique, indépendamment de la présence des autres acides aminés [155].

De nombreuses voies sont impliquées dans le contrôle de la synthèse protéique, mais seules les voies de signalisation régulées par la présence d'acides aminés et/ou d'insuline, soit principalement les voies *General Control Conderepressible 2* (GCN2) et *Mammalian Target Of Rapamycin* (mTOR), sont décrites brièvement ici (**Figure 18**).

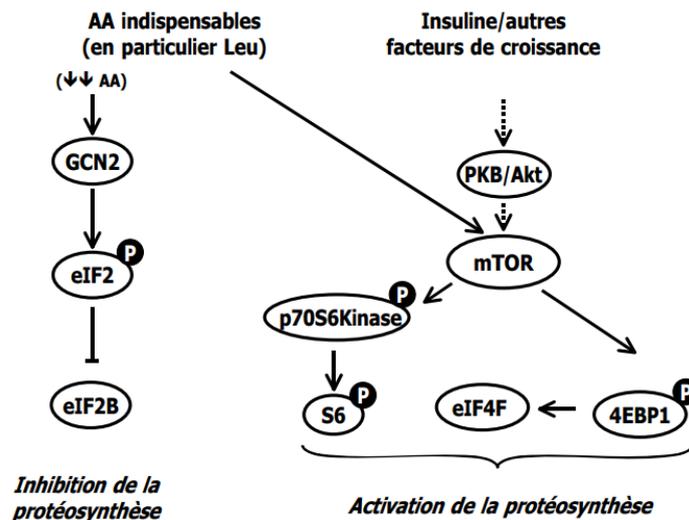


Figure 18. Schéma récapitulatif des voies de signalisation activées par une hyperinsulinémie et une hyperaminoacidémie. D'après [111].

Ainsi, en cas d'hyperinsulinémie ou d'hyperaminoacidémie, la voie mTOR est activée et cela entraîne la phosphorylation d'*Eukaryotic translation initiation factor 4 E binding protein* (4EBP1) et de la P70S6Kinase qui sont impliqués dans l'initiation de la traduction. Cela déclenche alors la phosphorylation de la *ribosomal protein* (S6) qui est une protéine de la sous unité ribosomale 40S impliquée dans la traduction d'ARNm [156]. Le mécanisme par lequel la leucine entraîne l'activation de mTOR n'est pas bien compris, mais un consensus commun est que l'insuline et la leucine empruntent les mêmes voies de signalisation conduisant à la stimulation de la traduction de l'ARNm et de l'élongation de la traduction [157]. En cas de déficit en un ou plusieurs acides aminés indispensables, les ARNt non chargés s'accumulent et déclenchent la voie GCN2, phosphorylant le facteur *Eukaryotic initiation factor 2 α* (EIF2 α) qui est responsable de la traduction des protéines [158], et inhibant ainsi la synthèse protéique.

3. Facteurs modulant la digestion et le métabolisme protéique

De nombreux facteurs sont capables de moduler la manière dont les protéines sont digérées et métabolisées par l'organisme. Ces facteurs peuvent être soit intrinsèques à la matrice alimentaire, soit liés au statut physiologique de l'organisme. Les protéines de sources différentes varient en termes de structure et composition, et les traitements de

transformation industriels peuvent modifier cette structure. De plus, les facteurs physiologiques tels que l'âge, la composition corporelle, ou alors des physiopathologies digestives sont susceptibles de jouer un rôle dans la digestion. Dans les paragraphes suivants, les effets des paramètres physiologiques sur la digestibilité et le métabolisme des protéines se limiteront aux effets de l'âge et de l'adiposité.

3.1. La notion de digestibilité

La digestibilité est une composante de la biodisponibilité représentée par la fraction de protéine ingérée qui est absorbée par l'intestin grêle. Celle-ci peut être estimée au niveau fécal ou iléal, au niveau de la protéine ou au niveau de chaque acide aminé individuellement. Néanmoins, comme mentionné dans le **paragraphe 2.1.4**, les acides aminés non absorbés dans l'intestin grêle et entrant dans le côlon sont métabolisés par les bactéries coliques puis convertis en ammoniac et autres composés. Ceci peut conduire à une surestimation de la digestibilité lorsqu'elle est évaluée au niveau fécal et il est recommandé d'estimer la digestibilité des protéines et des acides aminés au niveau de l'iléon terminal, c'est-à-dire à la fin de la zone d'absorption des acides aminés par l'intestin grêle [159].

La digestibilité s'exprime en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Digestibilité (\%)} = \frac{\text{azote ingéré} - \text{azote non digéré}}{\text{azote ingéré}} \times 100$$

La digestibilité apparente prend en compte les pertes azotées totales, c'est-à-dire endogènes et alimentaires alors que la digestibilité vraie ou réelle prend en compte uniquement les pertes alimentaires [110]. Les pertes endogènes correspondent aux sécrétions gastriques, bilio-pancréatiques et intestinales pendant la digestion. L'azote bactérien contribue également de manière importante aux pertes endogènes [82].

Les différentes méthodes de mesure de la digestibilité ainsi que les modèles les plus courants seront présentés dans la **section 4.2**. Dans la section suivante, les paramètres jouant sur la digestion et le métabolisme des protéines sont discutés.

3.2. Facteurs intrinsèques à l'aliment protéique

3.2.1. Effet de la source de protéines : protéines animales vs végétales

Les protéines de sources animales et végétales diffèrent non seulement en termes de composition en acides aminés (notamment indispensables), mais aussi en termes de digestibilité [160]. En effet, les protéines animales (œuf, lait, viandes) ont généralement des valeurs de digestibilité plus élevées que les sources végétales, en particulier lorsque celles-ci sont dans leur matrice originelle. Ainsi, la digestibilité des sources protéiques animales est généralement supérieure à 95 %, tandis que celle des sources végétales varie entre 50-80 % si les parois cellulaires sont toujours présentes et 80-90 % après purification. La digestibilité inférieure des protéines végétales est attribuée à la présence de parois cellulaires, de niveaux élevés de fibres insolubles et de facteurs antinutritionnels, qui rendent la dégradation des protéines plus difficile et par conséquent les nutriments moins biodisponibles pour être utilisés par l'organisme [161]. De plus, la structure hydrophobe en feuillets- β des protéines végétales et une quantité relativement faible en hélices- α par rapport aux protéines animales facilitent l'agrégation des protéines, limitant encore l'action des enzymes digestives et finalement la digestibilité de ces protéines [162].

La source protéique peut également avoir un effet sur le devenir métabolique des protéines. Chez l'Homme, après consommation de protéines de soja, des volontaires sains synthétisaient une quantité plus importante d'urée qu'après la consommation de caséines [163]. Cette production d'urée plus élevée s'expliquait par une meilleure composition en acides aminés des caséines par rapport au soja, et par des différences au niveau des cinétiques de digestion entre les deux sources protéiques. En effet les protéines de soja sont digérées plus rapidement que les protéines de lait, entraînant alors une incorporation plus rapide de l'azote alimentaire dans le pool d'acides aminés libres, d'urée et de protéines corporels [164].

La production d'urée plus faible après ingestion de caséines comparé aux protéines de soja se traduisait aussi par une augmentation de la synthèse protéique nette après ingestion de caséines [163]. Des résultats similaires ont été observés chez le porc où les synthèses protéiques intestinales et hépatiques étaient supérieures après ingestion de caséines par rapport au soja, et où une plus grande production d'urée a été mise en évidence après

ingestion de protéines de soja [125]. De plus, les pics de concentrations d'acides aminés libres observées dans le foie après ingestion de soja stimulent l'uréogénèse et limitent la quantité d'acides aminés disponibles pour l'aire périphérique [164] et pour soutenir l'anabolisme postprandial musculaire [165]. Ces résultats vont dans le même sens qu'une étude réalisée par Fouillet *et al.*, dans laquelle la rétention postprandiale de l'azote était significativement plus élevée dans les pools azotés périphériques après ingestion de protéines de lait qu'après ingestion de protéines de soja. Les acides aminés disponibles pour la synthèse de protéines périphériques étaient ainsi mieux utilisés dans le cas de l'ingestion de protéines de lait [134]. En revanche, cette production d'urée augmentée après ingestion de protéines végétales était aussi associée à son hydrolyse accrue au niveau intestinal, permettant alors d'épargner l'azote et de contrebalancer la production d'urée plus élevée constatée après ingestion de protéines de soja [166].

Ainsi, ces différences entre des sources protéiques animales et végétales montrent l'impact important de la structure et composition d'une protéine sur le devenir digestif et métabolique des protéines et des acides aminés.

3.2.2. Effet de la matrice : exemple des protéines laitières

Comme il a été discuté dans la première section de cette introduction bibliographique (1.1), les protéines solubles et les caséines possèdent des structures très différentes, ce qui impacte leur digestion et utilisation par l'organisme.

Les protéines solubles diffèrent des caséines par leur résistance à la digestion. En effet, des études *in vivo* [167] et *in vitro* [168–170] ont montré la résistance des protéines solubles face à l'hydrolyse de la pepsine gastrique. Cette résistance peut d'abord s'expliquer par leur structure globulaire compacte qui les rend extrêmement résistantes à la protéolyse [6]. La protéine soluble la plus résistante est la β -lactoglobuline qui reste inaltérée même au bout de 60 min de simulation de la digestion gastrique *in vitro* [169]. Les résultats sur l' α -lactalbumine sont plus controversés et diffèrent d'une étude à l'autre [171]. En fonction des études, l' α -lactalbumine est soit encore plus résistante aux digestions gastriques et duodénales que la β -lactoglobuline [172], soit très hydrolysable [173]. Il a également été démontré que

l'interaction moléculaire de la β -lactoglobuline avec la phosphatidylcholine, une molécule protectrice de la muqueuse gastrique, protégerait aussi la protéine de la digestion duodénale par la trypsine et la chymotrypsine [169]. Au niveau jéjunal, après ingestion de caséines, les peptides résistants à la digestion identifiés provenaient des deux caséines les plus abondantes, à savoir la caséine- β et la caséine- α 1 [174]. Les peptides faisaient une taille comprise entre 450 et 1800 Da, et la majorité comportait au moins deux résidus de proline, résistants aux enzymes gastriques et pancréatiques ainsi qu'aux peptidases épithéliales. Suite à l'ingestion de protéines solubles, 146 peptides résistants ont été identifiés et la grande majorité (72 %) provenait de la β -lactoglobuline et se trouvaient aux niveaux 40–58 et 122–137 de la séquence protéique [174]. Les caséines et protéines solubles diffèrent aussi en termes de cinétiques d'évacuation depuis l'estomac. Une étude réalisée par Mahé *et al.*, chez des sujets jeunes et en bonne santé ayant ingéré de la caséine ou de la β -lactoglobuline a montré que les protéines solubles étaient plus rapidement évacuées vers la partie jéjunale supérieure [175]. Ce résultat a été confirmé par Boirie *et al.*, qui a par la suite introduit la notion de protéines lentes et protéines rapides [176]. En effet, les caséines sont couramment connues sous le terme de « protéines lentes » tandis que les protéines solubles sont connues sous celui de « protéines rapides » selon leur vitesse de vidange gastrique (**Figure 19**).

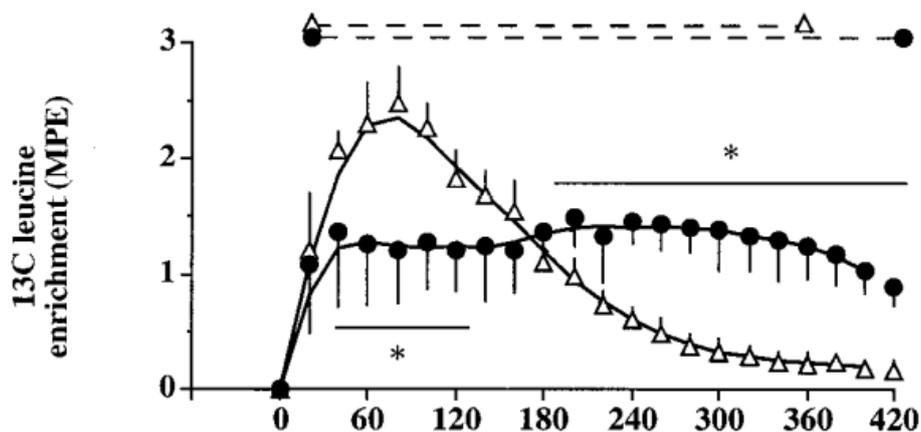


Figure 19. Cinétiques plasmatiques chez l'Homme après un repas de protéines solubles et de caséines. Les protéines solubles sont représentées par les triangles et les caséines par les cercles noirs. Le symbole * indique une différence significative entre les deux repas et les lignes pointillées une différence significative par rapport à la ligne de base (P 0,05). D'après [176].

Ces différences de cinétiques de digestion s'expliquent par la coagulation et/ou la précipitation des caséines dans l'environnement acide de l'estomac, tandis que les protéines solubles restent solubles et sont rapidement évacuées de l'estomac [176]. En outre, il semble que la résistance des protéines solubles à l'hydrolyse engendre des cinétiques d'apparition de l'azote alimentaire et des acides aminés dans l'intestin grêle différentes de celles de la caséine. Il est possible que l'évacuation rapide des protéines solubles de l'estomac leur fasse passer moins de temps au contact des pepsines, et que leur hydrolyse débute donc réellement avec les protéases pancréatiques [177]. Les protéines solubles seraient donc absorbées plus distalement que les caséines puisque leur digestion commencerait uniquement au niveau intestinal. En revanche, comme la caséine coagulée est exposée plus longtemps à l'hydrolyse gastrique, et qu'elle se vide lentement depuis l'estomac sous forme de produits dégradés, celle-ci serait absorbée préférentiellement dans la partie supérieure de l'intestin [177]. Ainsi, chez l'Homme, les cinétiques d'apparition de l'azote alimentaire dans les effluents jéjunaux étaient très différentes après consommation d'un repas composé de caséines ou de protéines solubles [174]. En effet, dans le cas des protéines solubles, l'apparition de l'azote alimentaire était très importante dans l'heure suivant le repas et s'achevait au bout de 3 h, tandis que l'azote alimentaire issu de la caséine était progressivement évacué de l'estomac pendant 6 h suivant le repas (**Figure 20**).

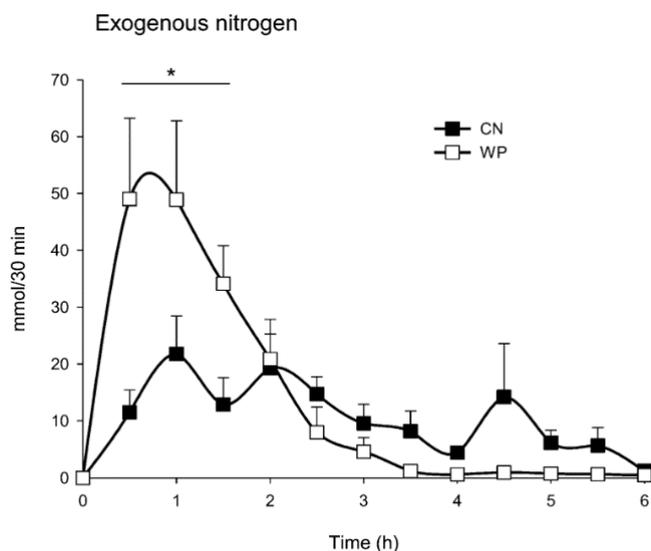


Figure 20. Flux d'azote exogène dans le jéjunum après ingestion de caséines natives ou de protéines solubles. CN : caséines natives ; WP : protéines solubles. Le symbole * indique une différence significative à un temps donné. D'après [174].

Ces différences cinétiques sont par ailleurs répercutées au niveau de l'utilisation postprandiale de l'azote. En effet, il a été observé une apparition plus lente des acides aminés alimentaires dans le plasma, plus faible, mais prolongée après un repas de caséines par rapport aux protéines solubles. La réponse métabolique de l'ingestion de caséines était ainsi marquée par une augmentation légère de la synthèse protéique, une oxydation des protéines modérément stimulée, et une dégradation des protéines nettement inhibées. Dans le cas des protéines solubles, l'apparition des acides aminés alimentaires dans le plasma était rapide, élevée, transitoire, et associée à une augmentation de la synthèse protéique, de l'oxydation des protéines, mais aucune modification au niveau de la dégradation des protéines. Ces cinétiques de vidange gastrique différentes et d'apparition de l'azote alimentaire dans l'intestin ont par ailleurs des répercussions au niveau de l'utilisation postprandiale de l'azote et des acides aminés. En effet, comme montré sur la **Figure 19**, il a été observé une apparition des acides aminés alimentaires dans le plasma plus lente, plus faible mais prolongée après un repas de caséines par rapport aux protéines solubles [176]. La réponse métabolique à l'ingestion de caséines était également marquée par une plus faible augmentation de la synthèse protéique, une oxydation des protéines modérément stimulée, et une dégradation des protéines nettement inhibée. Dans le cas des protéines solubles, l'apparition des acides

aminés alimentaires dans le plasma était rapide, élevée et transitoire, et était associée à une augmentation de la synthèse protéique et de l'oxydation des protéines plus importante, mais à aucune modification au niveau de la dégradation des protéines.

De plus, après consommation des protéines solubles, l'incorporation de l'azote alimentaire dans l'urée était deux fois plus élevée qu'après la consommation de caséines ou de protéines totales de lait, ce qui a été attribué à l'hyperaminoacidémie plasmatique induite par les protéines solubles [178]. Ce résultat est expliqué par la rapidité de l'apparition des acides aminés dans le plasma après ingestion de protéines solubles qui ne permettrait pas de maintenir les besoins anaboliques pendant la période postprandiale, alors que la digestion plus lente des caséines induirait une meilleure utilisation de l'azote. Cependant, dans cette même étude, l'utilisation de l'azote alimentaire était meilleure ou identique après l'ingestion de protéines totales de lait, c'est-à-dire contenant les deux protéines, par rapport à l'ingestion de caséines ou protéines sérique séparément. Cela laisserait supposer un effet synergique entre les caséines et les protéines. Chez le rat [179], un taux maximum similaire de synthèse protéique musculaire a été mis en évidence après l'ingestion de caséinates, de protéines solubles, ou de protéines totales de lait, mais les cinétiques étaient différentes en fonction de la protéine.

3.3. Impact des procédés de transformation du lait sur la digestion

Les protéines sont couramment soumises à des procédés de transformation variés tels que le traitement thermique, l'addition d'agents oxydants, ou encore l'ajout de solvants. Ces procédés sont généralement appliqués pour stériliser ou pasteuriser, améliorer la saveur, la texture et autres propriétés fonctionnelles des protéines, mais aussi pour désactiver certains facteurs antinutritionnels ou fabriquer des concentrés protéiques. Néanmoins, ces traitements peuvent induire des réactions indésirables telles que les réactions de Maillard avec la lysine, l'oxydation des acides aminés soufrés, la racémisation d'acides aminés (-L en -D), et la formation de chaînes peptidiques réticulées. Toutes ces réactions peuvent diminuer la valeur nutritionnelle de la protéine en la rendant moins digestible et en réduisant par conséquent la biodisponibilité de ses acides aminés [180]. Il a en effet été mis en évidence

que les procédés de transformation influençaient le métabolisme protéique et la rétention postprandiale de l'azote et des acides aminés.

La formation de complexes entre la caséine- κ et la β -lactoglobuline est la modification principale attribuable au chauffage du lait. En effet, pendant le chauffage, la β -lactoglobuline dénaturée se lie avec la caséine- κ déjà partiellement agrégée pour former un grand complexe. Néanmoins, ces complexes sont limités dans leur taille et dépendent de la quantité de caséine- κ déjà présente [181]. La deuxième réaction principale due au traitement thermique est la réaction de Maillard, entre un sucre réducteur et les groupes aminés d'une protéine ($-\text{NH}_2$). Dans le lait, celle-ci s'effectue entre le lactose et la lysine qui est abondante dans toutes les protéines laitières. Cette réaction se déroule en plusieurs étapes et génère des produits spécifiques en début et fin de réaction. Outre la modification chimique des résidus de lysine, la réaction de Maillard peut également conduire à une agrégation de protéines [182].

Il a été montré que la consommation d'un régime riche en produits dérivés de la réaction de Maillard entraînait une excrétion fécale de l'azote supérieure de 47 %, une absorption apparente de l'azote inférieure de 12 % et une digestibilité de l'azote inférieure de 6 % par rapport à un régime pauvre en ces dérivés [183]. Concernant le lait, une modification de l'apparition des acides aminés dans la veine portale a été observée pour la lysine (-60 %), l'alanine (-17 %) et la cystine (+37 %) chez des porcs nourris avec du lait écrémé en poudre traité thermiquement afin d'obtenir une réaction de Maillard intense, par rapport à du lait lyophilisé [184]. La formation des acides aminés-D et de lysinoalanine (un dérivé d'acide aminé non présent naturellement et formé lorsque les protéines sont soumises à un traitement alcalin) et leur influence sur la digestibilité des protéines ont également été étudiées chez le mini-porc [185]. Trois sources de protéines (caséines, β -Lactoglobuline et protéine de blé) ont ainsi été soumises à des traitements thermiques et alcalins et les digestibilités iléales réelles de la caséine, de la β -lactoglobuline et des protéines de blé traitées ont diminué de 13, 14 et 17 %, respectivement. Ainsi, il apparaît que de petites quantités d'acides aminés-D et de lysinoalanine dans une protéine peuvent altérer sa digestibilité de manière significative.

La comparaison de différentes matrices laitières ayant subi différents traitements thermiques sur la digestion et le métabolisme de l'azote a été réalisée dans des études animales. Chez le mini-porc canulé, six matrices laitières ont été élaborées à partir d'une poudre de lait écrémé

« *ultra low heat* » (chauffée à basse température): du lait cru et traité thermiquement, des gels acides brassés et non brassés, des gels présures faits à base de lait cru ou de lait chauffé [6]. La structure des protéines conditionnait les cinétiques de digestion, avec une sensibilité augmentée à l'hydrolyse de la β -lactoglobuline dans les matrices qui avaient été traitées thermiquement. En effet, la β -lactoglobuline était d'avantage résistante à la protéolyse pendant les 200 min suivant l'ingestion lorsque celle-ci n'avait pas reçu de traitement thermique. De plus, les caséines et la β -lactoglobuline s'avéraient avoir des cinétiques de digestion similaires lorsque les matrices étaient traitées thermiquement puisque les protéines solubles (et plus précisément la β -lactoglobuline) réagissaient avec les micelles de caséines via des interactions hydrophobes et des liaisons covalentes. De manière plus globale, il a été montré que les cinétiques de digestion étaient directement dépendantes du temps qu'elles passaient dans l'estomac, et celui-ci était lui-même influencé par la structure de la matrice. Ainsi, les matrices liquides sortaient rapidement de l'estomac induisant un pic précoce plasmatique d'acides aminés indispensables [6].

Chez le rat, l'impact de procédés industriels sur la qualité protéique des matrices laitières a également été évalué [186]. Les différentes matrices comprenaient des protéines purifiées (caséines micellaires ou isolat de protéines solubles), du lait microfiltré et du lait ayant subi deux barèmes de pasteurisation (élevés et bas), ou encore du lait séché par atomisation. La digestibilité oro-caecale de l'azote variait de 94 à 98 % selon les matrices. Le séchage par atomisation du lait était le seul traitement à avoir entraîné une modification significative du métabolisme postprandial de l'azote, avec une augmentation de l'extraction splanchnique de l'azote pour cette matrice. Les fractions protéiques purifiées semblaient également présenter une désamination postprandiale de l'azote plus importante par rapport aux protéines de lait totales [186].

En digestion *in vitro*, la déminéralisation des caséines micellaires a provoqué une diminution de leur coagulation en phase gastrique, les rendant alors plus sensible à l'action de la pepsine [187]. Dans une autre étude simulant la digestion *in vitro* de formules de lait infantile variant en termes de profil protéique et de traitement thermique, les caséines avaient une hydrolyse gastrique et intestinale accrue lorsqu'elles étaient traitées thermiquement car celles-ci s'associaient avec les protéines solubles dénaturées [188].

L'ensemble de ces données montrent que la matrice protéique influence de manière significative l'utilisation des protéines dans l'organisme, tant au niveau de la digestion que du métabolisme postprandial. En effet, selon leur composition en protéines et le traitement qu'elles subissent, les matrices protéiques laitières peuvent présenter des valeurs nutritionnelles variables.

3.4. Impact des facteurs physiologiques sur la digestion

Au-delà des propriétés intrinsèques aux matrices protéiques, les caractéristiques physiologiques des individus consommant ces protéines peuvent également impacter leur devenir digestif et métabolique.

3.4.1. Les effets de l'âge

Un grand nombre d'études ont été menées chez l'Homme afin d'établir si le vieillissement provoquait des changements significatifs au niveau du tractus gastro-intestinal pour impacter la biodisponibilité des nutriments [189]. Les études restent contradictoires, mais l'âge provoquerait des modifications au niveau de l'action mécanique de désintégration des aliments, de la fonction motrice gastro-intestinale, du transit alimentaire, de la digestion chimique des aliments et de la fonctionnalité de la paroi intestinale [190].

Ainsi, il a été montré que chez l'Homme, après ingestion d'un repas liquide ou solide, les personnes âgées avaient une vitesse de vidange gastrique plus lente par rapport à leurs homologues plus jeunes [191,192]. Chez des modèles de rats d'âges différents (jeunes, adultes et âgés), un retard de la vitesse de vidange gastrique lié à l'âge a également été mis en évidence avec une apparition d'un ralentissement de la vidange gastrique dès l'âge adulte qui augmentait progressivement avec l'âge [193,194]. Ces différences observées en termes de vitesse de vidange gastrique sembleraient avoir des répercussions sur les cinétiques d'acides aminés plasmatiques, puisqu'il a été mis en évidence que suite à un repas riche en protéines, les pics d'apparition des AACR et des acides aminés indispensables dans le plasma se produisaient au bout d'une heure chez les jeunes adultes, et au bout de trois heures chez l'homme âgé [195].

De plus, chez le rongeur âgé, un manque d'adaptabilité de la digestion des protéines aux stress nutritionnels, tels que la restriction alimentaire [196] ou la présence de facteurs antinutritionnels dans le régime alimentaire a été démontré [197]. Dans l'étude de Sarwar Gilani *et al.*, différentes sources protéiques végétales et animales ont été données à des rats âgés de 20 mois et de jeunes rats de 5 semaines [198]. Il s'est avéré que les valeurs de digestibilité chez les rats âgés étaient significativement inférieures à celles des jeunes rats pour la plupart des protéines testées (**Tableau 4**). Ces différences étaient faibles, de l'ordre de 1 à 3 %, pour la plupart des protéines animales et végétales très digestibles (digestibilité > 90 %) et plus importantes, entre 5 et 17 %, pour les sources de protéines les moins digestibles, soit parce qu'elles contenaient des facteurs antinutritionnels, soit parce que leur digestibilité était réduite suite à des traitements thermiques. Il n'existe cependant pas de données de digestibilité mesurées directement chez l'homme âgé en raison de la difficulté technique des méthodes [190], comme nous le verrons à la **section 4.4.1**.

Tableau 4. Valeurs de digestibilité de l'azote de différentes sources de protéines évaluées par la méthode du bilan azoté chez le jeune rat âgé de 5 semaines et le rat âgé de 20 mois. D'après [197].

Sources de protéines	Digestibilité de l'azote (%)		Différence de digestibilité
	Rats jeunes (5 semaines)	Rats âgés (20 mois)	
Caséine	99	96	3
Concentrat de protéines de lactosérum	100	97	3
Hydrolysats de protéines de lactosérum	99	98	1
Lactalbumine	98	96	2
Lactalbumine, traitement thermiquement/basique	71	64	8
Poudre de lait écrémé	93	92	1
Poudre de lait écrémé traité thermiquement	79	70	9
Isolat de protéines de soja	95	93	2
Isolat de protéines de soja, traitement thermiquement/basique	66	49	17
Soja, autoclavé	81	78	3
Soja, cru	80	72	8
Haricots noirs, autoclavés	83	78	5
Haricots noirs, crus	71	60	11
Fèves, autoclavés	82	77	5

Il est maintenant admis que la séquestration splanchnique est augmentée avec l'âge [112]. En effet, l'utilisation de leucine marquée au ^{13}C a permis de déterminer que l'extraction des acides aminés par l'intestin et le foie serait jusqu'à deux fois plus élevée chez l'homme âgé par rapport au jeune adulte [193]. Par conséquent, les acides aminés seraient moins disponibles pour les organes périphériques et cette séquestration splanchnique augmentée pourrait participer à la sarcopénie musculaire souvent observée chez les personnes âgées [199]. Une séquestration splanchnique plus élevée a aussi été démontrée dans plusieurs études réalisées chez le rat âgé [200–202], les mécanismes de cette augmentation restent

pour le moment inconnus. Dans leur étude, Jourdan *et al.*, excluent l'augmentation de l'uréogénèse ou de la synthèse protéique dans l'intestin et le foie comme étant des causes de séquestration splanchnique liées à l'âge [201]. Ils concluent que la séquestration splanchnique a probablement un impact majeur sur le métabolisme protéique car elle participe à la diminution de la synthèse protéique nette du corps entier et de la masse maigre chez les rats âgés. De plus, la séquestration splanchnique des acides aminés alimentaires concernerait particulièrement la leucine qui est un substrat anabolique clé de la synthèse protéique musculaire [202]. En regardant plus particulièrement l'utilisation de la leucine pour la synthèse protéique musculaire, la sensibilité de la synthèse protéique musculaire à la leucine était en effet plus faible chez les rats âgés que chez les rats adultes [151]. De ce fait, il a été montré qu'une supplémentation en leucine permettait de contrer la séquestration splanchnique et stimuler la synthèse protéique chez les rats âgés [203]. La comparaison de rats d'âges différents (1,5, 12 et 24 mois) a montré une atrophie musculaire liée à l'âge et une modulation de la synthèse protéique musculaire [144]. Il semblerait ainsi que de très légères différences au niveau du turnover protéique, en termes de quantité de protéines dégradées et synthétisées chaque jour pourraient expliquer la perte protéique observée chez les rats de 24 mois [144].

L'effet de différentes sources protéiques végétales [204] et laitières sur l'anabolisme musculaire a également été étudié chez des rats âgés qui ont consommé soit des pâtes de blé enrichies en protéines de légumineuses, soit à base de protéines de lait (caséines ou protéines solubles). L'utilisation nette protéique et le taux de synthèse protéique musculaire étaient équivalents chez les rats nourris avec des pâtes enrichies en légumineuses et des caséines, mais ces taux étaient inférieurs à ceux des rats nourris de protéines solubles. Ainsi, ce résultat met à nouveau en avant l'effet de la cinétique de digestion de différentes matrices protéiques sur l'anabolisme protéique musculaire, dont les conséquences peuvent être particulièrement importantes chez le sujet âgé.

3.4.2. Les effets de l'adiposité

Les études évaluant l'impact de l'obésité ou d'une adiposité élevée sur la digestibilité et le métabolisme des protéines sont rares et très majoritairement chez l'animal.

Chez l'Homme, des études ont mis en évidence que l'obésité était associée à une altération de la motilité gastro-intestinale avec une vitesse de vidange gastrique accélérée [205,206]. La motilité gastro-intestinale joue un rôle important dans la vitesse de digestion et d'absorption des nutriments. Ainsi, une altération de cette motilité pourrait impacter la manière dont les nutriments seraient digérés et absorbés [207]. Il semblerait également que la perméabilité de l'intestin soit augmentée en cas d'obésité [208].

Dans une étude conduite chez des souris rendues obèses avec un régime hyperlipidique, une perturbation de l'homéostasie de l'azote au niveau intestinal a été démontrée [209]. En effet, les souris obèses ont présenté une concentration plus élevée d'acides aminés libres dans la veine porte (60 %) ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de deux transporteurs d'acides aminés : Slc6a20a (transporteur de proline et d'hydroxyproline), et Slc36a1 (transporteur d'acides aminés zwitterioniques). Ces résultats indiquent une absorption spécifique et adaptative de certains acides aminés chez ces souris obèses. Un temps de transit retardé (40 %) et une perméabilité intestinale accrue (80 %) ont également été mis en évidence et pourraient participer à l'augmentation de l'absorption de l'azote constatée.

En termes de modulation du métabolisme protéique en situation d'obésité, une augmentation de la synthèse protéique a été mise en évidence chez le rat dans de nombreux tissus comme le foie, les reins, le cœur, le muscle tibial et l'intestin grêle [210]. L'augmentation de la synthèse protéique dans le foie et l'intestin grêle des rats obèses était associée à un nombre de ribosomes par cellule (capacité ribosomique) nettement plus élevé que dans le groupe contrôle. Dans les reins, le cœur et les muscles des rats obèses, l'augmentation était associée à un taux de synthèse protéique par unité d'ARN (activité ribosomique) plus élevé [210]. En revanche, la stimulation de l'anabolisme musculaire semblerait varier en fonction du stade d'obésité atteint par le rat [211]. Ainsi, à un stade intermédiaire, une augmentation de la synthèse protéique musculaire a de nouveau été constatée, alors qu'à un stade plus avancé, la synthèse protéique musculaire avait diminué. Cela pourrait s'expliquer par une infiltration de lipides dans les muscles en cas d'obésité prolongée, entravant l'incorporation des acides aminés dans les protéines musculaires, et diminuant indirectement la synthèse protéique [211].

De plus, il est important de noter que l'obésité est parfois associée à des états d'hyperinsulinémie ou de résistance à l'insuline [212]. Il a été montré que chez des sujets obèses, malgré la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'hyperaminoacidémie stimulaient la synthèse protéique de manière comparable aux sujets minces [213]. Chez le rat obèse, il a été montré que l'augmentation de la synthèse protéique musculaire en cas d'obésité pourrait aussi provenir d'une augmentation des taux circulants d'AACR, et plus particulièrement de la leucine [214]. En effet, une augmentation des taux circulant d'AACR serait caractéristique des individus obèses [215], et l'hyperaminoacidémie, en particulier l'élévation du taux de leucine dans le plasma, serait impliquée dans l'activation de la synthèse des protéines via l'augmentation de l'activité de la voie de signalisation mTOR (**voir 2.2.4**). En revanche, un état de résistance à l'insuline associée à l'obésité pourrait compromettre l'anabolisme musculaire [216] tel qu'il a déjà été démontré chez des sujets diabétiques qui avaient une sarcopénie accélérée par rapport à des sujets non diabétiques [79,217].

Comme il a été discuté dans cette partie, un certain nombre de facteurs liés à la matrice alimentaire, la source protéique, et l'état physiologique sont capables de moduler la digestion. Ainsi, afin de mieux évaluer l'impact de ces facteurs, de nombreux modèles de digestion *in vitro* et *in vivo* ont été développés.

4. Modèles de digestion

Les essais cliniques chez l'Homme sont l'approche de référence pour évaluer la digestion des protéines. Ils consistent à collecter les effluents au niveau de l'iléon terminal suite à l'ingestion d'un repas contenant la protéine à évaluer. Cela se fait généralement grâce à la pose d'une sonde naso-iléale. Ces essais cliniques sont néanmoins très coûteux, très invasifs, et ne peuvent pas être réalisés sur un très grand nombre de participants. Les alternatives sont alors les modèles animaux ou les modèles *in vitro* de simulation de la digestion. *In vivo*, les modèles animaux les plus fréquemment utilisés sont le rat et le porc.

4.1. Modèles de digestion *in vitro*

Une large gamme de modèles *in vitro* a été développée dans les dernières décennies : les modèles de digestion statiques, simulant un nombre limité de paramètres, et les modèles de digestion dynamiques, se rapprochant des conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal grâce à la simulation des contraintes mécaniques [218].

Modèles de digestion statique

Les modèles de digestion statiques sont les systèmes de simulation les plus simples, visant à reproduire les phases de la digestion gastro-intestinale. En résumé, la digestion statique se déroule dans un seul ou une série de réacteurs, le plus souvent en agitation constante grâce à un barreau aimanté. L'aliment est mis au contact d'enzymes digestives et de solutions électrolytiques (salivaire, gastrique, intestinale) pendant un temps donné, et le pH est ajusté en fonction des phases simulées. Les enzymes introduites dépendent de la matrice alimentaire étudiée, mais les plus couramment utilisées sont la pepsine, la chymotrypsine, la trypsine, la lipase, et l'amylase. Des sels biliaires peuvent aussi être ajoutés en présence d'une matrice alimentaire lipidique [219].

Malgré la simplicité des modèles statiques, une forte hétérogénéité des protocoles, propres aux différents laboratoires a été mise en évidence dans une revue publiée par Hur *et al.*, en 2011 [220]. Cette revue analysant plus de quatre-vingt études a ainsi révélé une forte variation des paramètres de digestion en fonction du type d'aliment étudié, de sa matrice, et de la sophistication du modèle utilisé. Les variations les plus courantes étaient liées au nombre, à la longueur et au type d'étapes simulées, à la composition des fluides digestifs et au type de contraintes mécaniques appliquées. Ces nombreux modèles, avec des paramétrages propres aux différentes questions de recherche posées, rendaient la comparaison des résultats inter-laboratoires compliquée [220].

En effet, une des sources majeures de divergence de résultats entre les laboratoires, même en appliquant le même protocole, était due aux différences d'activité des enzymes digestives utilisées pour les digestions *in vitro*. Dans la plupart des cas, les enzymes digestives étaient ajoutées sur la base du poids ou d'unités d'activité non normalisées [221]. De plus, la

provenance des enzymes (origine animale, végétale, ou humaine), ainsi que la variation des paramètres choisis tels que le pH et la composition des fluides digestifs affectaient aussi directement la spécificité et l'activité des enzymes. Cette variabilité impactait les résultats obtenus dans les études, et pour ces raisons, il était donc nécessaire d'arriver à un consensus général et de développer un protocole standardisé.

Le protocole harmonisé Infogest

Ainsi, une action COST (COST pour « European Collaboration in Science and Technology » en anglais) nommée « Infogest », regroupant un comité d'experts à l'échelle internationale a été mise en place afin de générer une quantité de données suffisante sur la digestion des aliments, dans l'objectif d'établir une harmonisation des protocoles de digestion *in vitro* [222].

Le protocole Infogest est présenté précisément dans l'**Article 1** de cette thèse, mais les étapes clés afin de le reproduire au mieux sont les suivantes : la détermination appropriée de la composition des fluides, le maintien des rapports constants entre le bol alimentaire et les fluides digestifs, le respect du temps de résidence du bol alimentaire à chaque étape de la digestion, la régulation et le maintien du pH à chaque phase de la digestion, et la détermination de la quantité d'enzymes en fonction de leurs natures et activités par unité de substrat [222].

Les auteurs de cette publication se sont efforcés de décrire un ensemble de conditions proches de la situation physiologique, qui soit pratique et qui puisse être considéré comme une suggestion de base pour répondre à diverses questions de recherche. D'autres modifications de ces conditions peuvent être nécessaires, par exemple pour simuler la digestion spécifique des nourrissons ou des personnes âgées, et peuvent différer considérablement en terme de concentration d'enzymes [222]. Ce protocole Infogest a notamment été utilisé et adapté à la digestion de matrices protéiques simples dans le cadre de cette thèse.

Afin de mieux valider ce protocole, des essais ont été menés au sein du réseau Infogest [223]. Ainsi, trois séries d'études inter-laboratoires ont été réalisées en appliquant la digestion *in vitro* statique au lait écrémé en poudre. Pour la première étude, les participants ont digéré le

lait en poudre avec leurs protocoles internes de digestion *in vitro*, et les deux études suivantes ont été réalisées avec la méthode harmonisée. Les analyses ont confirmé que la méthode harmonisée améliorait la comparabilité des données sur les digestions *in vitro*, et confirme les avantages de cette méthodologie en tant qu'outil robuste et simple pour étudier le devenir de l'aliment ingéré [223].

Depuis sa publication en 2014, le protocole Infogest a reçu plus de 1700 citations et a été largement utilisé dans le monde entier. Le protocole a même récemment été mis à jour par le réseau afin de clarifier les différentes étapes, et mettre en avant des suggestions d'amélioration en fonction des nutriments étudiés [224].

Bien que les modèles de digestion statiques présentent des faiblesses évidentes, ils apportent de nombreux avantages par rapport à des méthodes plus complexes. Les principaux atouts de ces modèles sont leur bonne reproductibilité intra- et inter-laboratoire, leur robustesse, leur simplicité, leur coût relativement faible, et l'évaluation facile de chaque phase de la digestion. Les points cités ci-dessus les rendent donc tout à fait adaptés aux études mécanistiques et à la construction d'hypothèses [224]. De manière générale, les systèmes de digestion statiques sont aussi très utiles en étape de pré-screening où des analyses avec un grand nombre d'échantillons doivent être exécutées. Leur simplicité de mise en œuvre fait qu'ils peuvent être appliqués en amont de méthodes plus complexes telles que les digestions dynamiques ou les essais *in vivo* [218]. En revanche, les méthodes de digestion statique ont des limites connues et ne peuvent pas être considérées comme des imitations de la dynamique complexe du processus de digestion ou des interactions physiologiques avec l'hôte [224]. De plus, ces modèles ne sont pas tout à fait adaptés aux études de biodisponibilité même si des travaux couplant ce type de modèles statiques à des membranes semi-perméables [225] ou à des modèles de culture cellulaires ont déjà été mis en œuvre [99,226–229]. Les études de digestion *in vitro* évaluant la digestibilité sont discutées dans la **section 4.3** de cette introduction.

En plus des avantages énumérés ci-dessus, le choix du modèle de digestion peut être fait pour répondre à des questions spécifiques. Par exemple, des modèles statiques de digestion peuvent être utilisés pour déterminer les points finaux de la digestion, ou la cinétique d'étapes très spécifiques telles que l'hydrolyse dans l'intestin grêle. Ainsi, la digestion des aliments peut être évaluée relativement simplement, et des modèles plus complexes peuvent être choisis si

la question porte davantage sur le taux d'apparition de nutriments ou de bioactifs spécifiques dans le sang [230].

Modèles de digestion dynamiques

Les modèles de digestion dynamiques ont été développés afin de reproduire au mieux les contraintes mécaniques et les cinétiques de changements des conditions physico-chimiques observées *in vivo*. Ce sont des systèmes informatisés composés de compartiments représentant les différents organes impliqués dans la digestion, et paramétrés pour simuler cinétiquement les sécrétions digestives, la concentration des enzymes, les fluctuations de pH, l'absorption et la simulation du transit grâce à un péristaltisme mécanique.

Une multitude de modèles de digestion dynamiques ont été conçus : des modèles composés d'un seul compartiment mimant une étape de la digestion, et d'autres modèles multi-compartimentés mimant plusieurs étapes [218].

Certains modèles mono-compartimentés simulent la phase orale à l'aide de masticateurs [231], l'intestin grêle [232] ou encore le duodénum [233], mais la plupart ont été développés pour mimer l'estomac et représenter au mieux l'acidification progressive des contenus gastriques par l'addition d'acide chlorhydrique, le flux de sécrétion de la pepsine, ainsi que le débit de vidange gastrique [218]. Les systèmes multi-compartimentés considèrent les phases gastriques et intestinales, et le modèle le plus exhaustif à ce jour est le TNO gastro-intestinal model 1 (TIM-1) élaboré par Minekus *et al.*, (**Figure 21**) qui simule l'estomac, le duodénum, le jéjunum, l'iléon, et l'absorption des nutriments également.

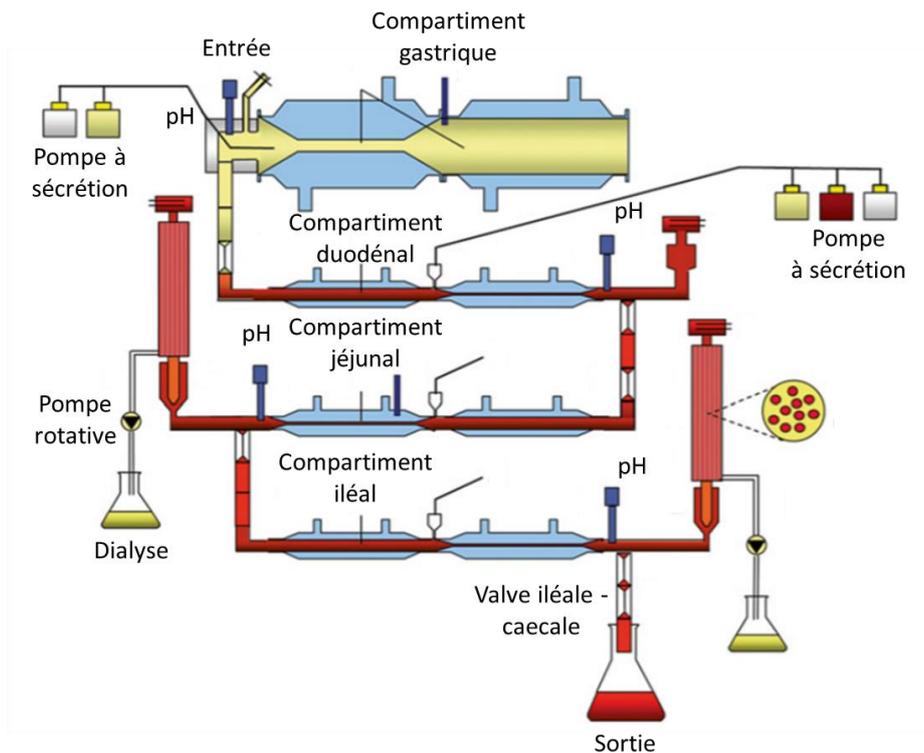


Figure 21. Schéma simplifié du modèle de digestion *in vitro* dynamique de l'estomac et de l'intestin grêle (TIM-1). D'après [60].

Les paramètres des systèmes dynamiques peuvent être modulés afin de répondre plus précisément à la question de recherche posée et de mieux cibler l'aliment ou la population (personnes âgées, nourrissons...) d'intérêt. En raison de ces caractéristiques, ces systèmes peuvent donc fournir une compréhension mécanistique significative de la digestion des aliments [230] et peuvent être très utiles avant de mettre en place des études *in vivo* chez l'Homme ou l'animal.

En revanche, bien que ces modèles soient très sophistiqués, ils ne reflètent pas totalement les conditions physiologiques digestives de l'Homme puisque les mécanismes de rétropulsion, les contrôles nerveux et les hormones sécrétées liées à la digestion ne peuvent pas être simulés [219]. De plus, la plupart des systèmes dynamiques ne simulent pas l'absorption.

Enfin, il est important de noter qu'à ce jour, il n'existe pas de consensus concernant la mise en place et le paramétrage des systèmes de digestion dynamiques, et ces méthodes sont plus coûteuses que les digestions statiques et souvent commercialement indisponibles [230].

Modèles de digestion semi-dynamiques

Comme les systèmes dynamiques sont souvent trop compliqués et difficile d'accès, des systèmes semi-dynamiques ont été développés dans le but de trouver une technique intermédiaire, facile à mettre en place, mais plus développée que les systèmes statiques simples [230]. Ainsi, les digestions semi-dynamiques sont généralement réalisées dans un seul réacteur avec un appareil de mesure de pH pour simuler les fluctuations de pH gastrique [234,235], mais certains protocoles simulent également la sécrétion progressive des enzymes gastriques [236,237]. Il existe aussi des modèles semi-dynamiques réalisant la digestion dans deux réacteurs afin de mimer les dynamiques gastriques et duodénales [238,239].

Récemment, le réseau Infogest s'est réuni afin de développer un protocole semi-dynamique s'appuyant sur le modèle statique harmonisé [222] tout en veillant à imiter la nature transitoire des sécrétions et de la vidange gastrique [240]. Leur objectif est resté le même, développer un modèle facilement accessible à tous les laboratoires et adapté à une large gamme de matrices alimentaires. Ainsi, les phases salivaires et intestinales sont restées identiques au protocole de digestion statique classique initial, avec le maintien des rapports constants entre le bol alimentaire et les fluides digestifs à chaque phase de la digestion. L'innovation majeure a donc été effectuée au niveau gastrique avec la reproduction des aspects cinétiques cruciaux tels que l'acidification progressive, la sécrétion de fluides et d'enzymes ainsi que la vidange gastrique.

Pour simuler les cinétiques gastriques en fonction du protocole Infogest, des paramètres clés doivent être respectés. Les fluides gastriques contenant les solutions électrolytiques gastriques et les enzymes, doivent être délivrés progressivement afin de simuler la phase de jeûne avant l'arrivée de l'aliment dans l'estomac. Le pH est abaissé graduellement, et une agitation limitée est conseillée, afin de mimer les conditions *in vivo* où seul l'antré subit un cisaillement important. La vidange gastrique s'effectue par étapes en prélevant manuellement des aliquots à différents moments, à un taux constant, basé sur la teneur calorique des aliments à digérer ($2\text{kcal}\cdot\text{min}^{-1}$). La phase intestinale n'est pas réellement dynamique, mais l'aspect cinétique peut être éventuellement simulé par des phases intestinales séparées et effectuées en parallèle pour chaque aliquot de vidange gastrique.

4.2. Modèles de digestion *in vivo*

Modèle de digestion chez l'Homme

L'Homme reste le modèle idéal pour l'évaluation de la digestion des protéines malgré les contraintes que cela peut impliquer. Dans le cadre des études de digestibilité, il est nécessaire d'évaluer les pertes d'azote et d'acides aminés alimentaires au niveau iléal, immédiatement après la zone d'absorption des acides aminés. La collecte des digestats iléaux peut se faire grâce à la mise en place d'une sonde naso-intestinale qui va migrer par elle-même jusqu'à l'iléon terminal grâce au péristaltisme. L'insertion de la sonde permet alors de récupérer les contenus digestifs en continu par aspiration du chyme. Cette méthode est déjà mise en application depuis de nombreuses années [175,241–243] mais reste cependant très invasive et le taux d'échec de pose de la sonde est relativement élevé (30 à 50 %). Les mesures de digestibilité au niveau de l'iléon peuvent également être réalisées chez des patients iléostomisés, c'est-à-dire ayant subi une intervention chirurgicale dérivant les effluents intestinaux vers une poche externe [244,245]. En revanche, il est important de prendre en compte le fait que les patients iléostomisés souffrent ou ont souffert de pathologies digestives inflammatoires telles que la maladie de Crohn ou le cancer du côlon [246]. Il a été démontré que la quantité d'azote retrouvée à la fin du tractus gastrointestinal était augmentée chez les patients iléostomisés comparée aux sujets sains [247] mais aussi que l'enrichissement en ¹⁵N des acides aminés dans le plasma était plus faible chez les patients iléostomisés par rapport aux volontaires sains [244]. Les altérations morphologiques au niveau de l'iléon terminal et des modifications du microbiote [248] suite à l'iléostomie pourraient expliquer ces différences. Ainsi, la question de validité se pose concernant la transposabilité des valeurs de digestibilité obtenues chez le sujet iléostomisé puisqu'elles pourraient ne pas être représentatives du sujet sain.

Une méthode récente, connue sous le nom de méthode « double traceur » a été développée pour évaluer la digestibilité des acides aminés [159], et depuis, des études ont été réalisées sur différentes sources protéiques [249–251]. Cette méthode est moins invasive puisqu'elle se base uniquement sur des prélèvements sanguins et ne nécessite pas la mise en place d'une sonde. Le principe repose sur l'utilisation de plusieurs protéines marquées avec différents isotopes stables. Ainsi, une protéine de référence très digestible dont la valeur est

préalablement connue est marquée au carbone ^{13}C et la protéine étudiée est marquée au deutérium ^2H . La digestibilité de la protéine de référence étant déjà connue, il est alors possible de déterminer la digestibilité de chaque acide aminé de la protéine d'intérêt à l'aide du ratio des deux isotopes retrouvés dans le plasma et dans le repas donné aux volontaires.

Modèles animaux : le rat et le porc

Les modèles animaux les plus couramment utilisés pour les études de digestion sont le rat et le porc. Le rat est un animal omnivore avec un tube digestif relativement comparable à celui de l'Homme. En effet, chez le rat, l'intestin grêle représente 83 % de la surface intestinale totale avec 90 % de la surface attribuée au jéjunum, tandis que chez l'Homme ces valeurs s'élèvent à 81 et 38 % respectivement [252]. D'un point de vue anatomique, bien que le rat et l'Homme soient tous deux monogastriques, l'estomac du rat se divise en deux régions très distinctes. La première partie comprend l'entrée depuis l'œsophage et sert plutôt d'espace de stockage et de digestion bactérienne, alors que la deuxième partie est glandulaire et responsable des sécrétions acides et enzymatiques [253]. L'estomac de l'Homme en revanche a une fonction sécrétoire au niveau de toutes ses régions. De plus, le caecum du rat est plus volumineux que celui de l'Homme et ne possède pas d'appendice iléo-caecal, qui est une petite excroissance se prolongeant depuis le caecum [252].

Le modèle rat à l'avantage d'être peu coûteux, et son euthanasie permet de récupérer de nombreux organes et d'effectuer des prélèvements d'effluents dans toutes les parties du tube digestif. En revanche, l'impossibilité de poser une canule digestive chez le rat ne permet pas l'établissement des cinétiques de digestion, qui ne sont possibles que par le sacrifice d'un grand nombre d'animaux [219]. De plus, les quantités d'effluents récupérées sont faibles et la digestibilité chez le rat peut être mesurée au niveau fécal ou caecal, mais elle est plus compliquée à évaluer au niveau iléal. Pour mesurer la digestibilité iléale, il est en effet nécessaire d'administrer au rat des repas à intervalles réguliers pendant plusieurs heures, puis de collecter les effluents dans la partie terminale de l'iléon [254]. L'ajout d'un marqueur non-absorbable aux repas est également nécessaire pour permettre de corriger la quantité de digestat collectée par la représentativité du repas. L'utilisation d'un marqueur non-absorbable dont les taux de récupération peuvent être variable [255,256], ainsi que la faible quantité de

digestat collectée dans l'iléon sont les limites principales de cette méthode. Pour s'affranchir de cela, il est également possible d'évaluer la digestibilité au niveau caecal comme approximation de la digestibilité iléale chez le rat [111]. En effet, le caecum du rat a la capacité de stocker un grand volume de digestat, et peut donc être considéré comme un lieu de stockage des pertes iléales. Cette méthode repose alors sur l'administration d'un repas unique et sur le recueil des digestats à un temps bien défini, au bout duquel la majorité des pertes azotées se trouvent dans le caecum et une fraction mineure dans le colon. Le temps approprié est généralement estimé à 5 ou 6 heures après l'ingestion du repas [257,258] et cette méthode permet de s'affranchir de l'utilisation d'un marqueur non absorbable grâce à la récupération intégrale des digestats dans le tube digestif qui permet d'établir un bilan de matière. En revanche, la fermentation des acides aminés par le microbiote dans le caecum est présente [252], et les pertes digestives retrouvées dans l'intestin grêle et le colon ne peuvent pas être prises en compte dans les calculs car leur devenir (absorption ou perte) est incertain.

Le porc est un modèle comparable à l'Homme grâce à son système digestif semblable en termes de transit et d'efficacité digestive [259]. Contrairement au rat, la pose de canules digestives et cathéters est possible chez le porc et celle-ci est souvent réalisée à différents endroits du tube digestif pour effectuer des prélèvements sanguins et d'effluents. Chez le porc canulé, il est alors possible d'évaluer la digestion à différents temps postprandiaux [260,261], et cela permet d'obtenir des informations sur les cinétiques d'hydrolyse des aliments. La mise en place de canules et cathéters de manière définitive chez le porc donne aussi la possibilité de conduire plusieurs études sur un même animal. De plus, effectuer les études de digestion chez le porc permet d'obtenir une plus grande quantité d'effluents, et facilite donc les mesures de digestibilité au niveau iléal [262].

Evaluation des pertes endogènes dans les modèles de digestion in vivo

Indépendamment du choix de la méthode de prélèvement des effluents, la méthode adoptée pour l'évaluation des pertes endogènes impacte aussi les résultats obtenus. Il existe différentes méthodes pour distinguer les pertes endogènes des pertes alimentaires. La méthode la plus simple à mettre en place est celle d'un repas sans protéines dit « *protein free* », en se basant sur le principe que les protéines récupérées après l'ingestion de ce repas

proviendraient uniquement des pertes endogènes. Cette méthode a été appliquée chez l'Homme [109,245,263], le porc [264] et le rat [197]. Néanmoins, la méthode d'un repas « *protein free* » peut conduire à une sous-estimation des pertes endogènes car l'absence de protéines dans le régime peut conduire à une diminution des sécrétions d'enzymes digestives et réduire le taux de synthèse protéique dans l'intestin [265]. Cette sous-estimation peut alors donner des valeurs de digestibilité imprécises, voire dépassant parfois les 100 % [266].

Une autre méthode d'évaluation des pertes endogènes est celle de la mesure des flux d'acides aminés endogènes après la prise d'un repas contenant une protéine hydrolysée au préalable par des enzymes. Après ingestion de la protéine hydrolysée, il s'agit alors de recueillir les effluents au niveau de l'iléon, de les filtrer, et d'éliminer les poids moléculaires inférieurs à 10 kDa en considérant qu'ils représentent les peptides alimentaires non digérés et les acides aminés libres. L'hypothèse soumise est alors que le rétentat (la fraction supérieure à 10 kDa) contiendrait les protéines endogènes [267].

Néanmoins, la méthode la plus fiable pour différencier les pertes endogènes des pertes alimentaires reste celle du marquage intrinsèque des protéines alimentaires avec un isotope stable. Le principe du marquage repose sur l'enrichissement d'une protéine et donc de ses acides aminés avec des isotopes stables non radioactifs. Ces isotopes sont naturellement présents en quantités très faibles dans les protéines mais leur enrichissement au-delà des enrichissements naturels permet de distinguer, dans les effluents collectés, les protéines apportées par l'alimentation des protéines endogènes, par dilution isotopique. L'isotope stable le plus couramment utilisé est l'azote 15 (^{15}N) dont l'abondance naturelle est équivalente à 0,364 %. Il est possible d'effectuer le marquage au ^{15}N dans les protéines végétales ainsi que dans les protéines animales, et notamment chez le ruminant. Dans le cas des plantes, l'enrichissement se fait à partir d'engrais tels que le nitrate d'ammonium enrichi en ^{15}N ($^{15}\text{NH}_3$ $^{15}\text{NO}_3$) [164,242,258]. Dans le cas des ruminants, le métabolisme des bactéries du rumen permet la conversion de l'azote inorganique en protéines et peptides assimilables par l'animal. Ainsi chez la vache, un apport de sulfate d'ammonium ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) par voie orale ou via le rumen permet d'obtenir de la viande ou du lait marqué au ^{15}N [241,243].

4.3. Comparaison des modèles de digestion appliqués aux protéines

Le choix des méthodes d'évaluation de la digestion dépend fortement de la question de recherche posée. Il est important de connaître les atouts et limites de chaque modèle de digestion, ainsi que leurs fiabilités. Ainsi, des études ont été réalisées afin de comparer les données animales avec celles de l'Homme, mais aussi les modèles *in vitro* avec les modèles *in vivo*, souvent dans le but de valider les modèles *in vitro*.

Deux études réalisées par la même équipe ont comparé les données obtenues chez le porc avec celles retrouvées au cours de la digestion *in vitro* statique Infogest [221] et d'un système de digestion dynamique stomacal [268]. Dans la première étude, les séquences peptidiques identifiées à la fin de la phase gastrique de la digestion *in vitro* statique corrélaient bien avec les peptides obtenus en phase gastrique chez le porc (coefficient de Spearman $r=0,8$). Au niveau intestinal, les séquences peptidiques identifiées à la fin de la phase intestinale de la digestion *in vitro* statique correspondaient mieux aux échantillons *in vivo* prélevés au niveau du jéjunum médial du porc (coefficient de Spearman $r=0,57$). Les acides aminés libres étaient principalement libérés pendant la phase intestinale chez le porc ainsi qu'en digestion *in vitro* statique.

Dans la deuxième étude [268], la cinétique de l'hydrolyse des protéines, et particulièrement la libération des acides aminés libres, a montré que la digestion *in vitro* dynamique était plus proche de la situation *in vivo*. En phase gastrique, les résultats ont montré une forte corrélation entre les peptides obtenus dans les deux modèles de digestion *in vitro* et les résultats *in vivo* (coefficient de Spearman $r=0,8$). En phase intestinale, le coefficient de corrélation sur l'ensemble des peptides obtenus était de 0,73 pour les modèles de digestion *in vitro* statiques et dynamiques, et autour de 0,5 quand les deux types de modèles de digestion *in vitro* étaient comparés aux données chez le porc. Cependant, il est important de noter que la corrélation moins forte entre les modèles au niveau intestinal pouvait aussi s'expliquer par l'absorption des nutriments qui se produit *in vivo* et qui n'était simulée dans aucun des modèles *in vitro* de l'étude.

Il existe peu d'études comparant précisément la digestibilité des protéines obtenue *in vitro* et *in vivo*. Une corrélation de 0,88 a été retrouvée entre la digestibilité fécale de différentes sources protéiques végétales chez le rat et celle déterminée *in vitro* à partir d'un système de

dialyse [269]. Dans une autre étude, la digestibilité d'un régime à base de maïs et soja était surestimée de 6,6 % en digestion *in vitro* statique par rapport à celle retrouvée chez le porc. En ce qui concerne la digestibilité des acides aminés, des corrélations élevées ont été observées pour l'isoleucine, la thréonine et la glycine ($r=0,85$, $0,83$ et $0,89$, respectivement) mais une corrélation plus faible pour les autres acides aminés indispensables a été observée [270].

Finalement, la comparaison de la digestion entre les différents modèles *in vivo* a aussi été réalisée, mais les résultats obtenus sont souvent variables en fonction des études et des méthodes de mesures de digestibilité utilisée. Dans une étude comparant la digestibilité d'un régime varié (à base de viande, légumes, céréales, et lait) chez des porcs et chez des volontaires iléostomisés, aucune différence significative n'a été observée pour la digestibilité iléale vraie des acides aminés sauf pour la thréonine, la phénylalanine, la cystéine et la méthionine. En termes de digestibilité fécale de l'azote, aucune différence significative n'a été établie [263]. Chez des volontaires sains munis d'une sonde naso-iléale, les digestibilités de la caséine, de la caséine hydrolysée et du colza ont été comparées à celles du porc en croissance [271]. La digestibilité iléale réelle de l'azote était légèrement plus faible (3-5 %) chez les sujets humains que chez les porcs pour les trois protéines et la plupart des digestibilités iléales réelles des acides aminés étaient similaires entre les espèces. Dans l'ensemble, cette étude soutenait l'utilisation du porc comme modèle de l'Homme [271]. Dans une revue rédigée par Deglaire et Moughan, les différents modèles *in vivo* (rat, porc, Homme) ont été comparés [262]. Ainsi, les coefficients de digestibilité apparente de l'azote fécal chez le rat ont surestimé en moyenne de 13 % les valeurs obtenues chez l'Homme et les valeurs de digestibilité chez le rat n'étaient pas significativement corrélées avec les coefficients humains. En revanche, lorsque la digestibilité fécale réelle de l'azote a été déterminée, une corrélation significative entre le rat et l'Homme a été constatée. Les valeurs chez le rat étaient en moyenne 3 % supérieures à celles de l'Homme mais la plupart des différences étaient statistiquement non significatives. L'amélioration de la corrélation entre les espèces pour la digestibilité réelle était due à la correction des pertes endogènes d'azote, qui semble contribuer aux pertes totales d'azote fécal de manière plus importante chez l'homme que chez le rat [262].

Ainsi, ces données démontrent que tout modèle de digestion présente ses avantages et désavantages et le choix de la méthode d'évaluation de la digestion dépend de la question de recherche posée et des moyens disponibles

Chapitre II

Travail personnel

Objectifs des travaux de thèse

L'objectif principal de cette thèse était de mieux établir les relations entre les nouvelles structures induites par les procédés technologiques appliqués aux protéines de lait et leur comportement (dégradation, assimilation, utilisation) au cours de la digestion grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*. En effet, certaines protéines auraient la même composition en acides aminés mais ne présenteraient pas les mêmes structures car les procédés d'extraction utilisés pour les obtenir sont différents. Il existe actuellement peu de données reliant la structure des protéines à la façon dont elles sont dégradées au cours de la digestion et à leur devenir après assimilation. Ainsi, des matrices protéiques laitières obtenues à partir de différents procédés physiques, chimiques, et enzymatiques ont été étudiées au cours de cette thèse.

Dans un premier temps, une étape de screening de six matrices protéiques laitières obtenues à partir de différents procédés a été réalisée en digestion *in vitro* statique. Cette étape a permis d'identifier les matrices d'intérêt en fonction des profils peptidiques générés au cours de la digestion, dans le but d'étudier par la suite leur digestion *in vivo* chez le rat. L'étape d'évaluation de la digestion *in vivo* était elle-même composée de deux parties. Comme il a été discuté dans la première partie de ce manuscrit, l'âge et l'adiposité auraient le potentiel d'impacter la digestion et l'utilisation postprandiale des protéines. Dans ce contexte, quatre groupes de rats avec des niveaux d'adiposité variables et des âges différents ont été constitués pour la première étude *in vivo* : 2 mois avec une adiposité normale, 2 mois avec une adiposité élevée, 11 mois avec une adiposité normale, et 11 mois avec adiposité élevée. Les résultats de cette étude ont alors permis de sélectionner le groupe de rat âgé de 2 mois avec une adiposité normale en tant que modèle présentant la plus faible efficacité digestive, avec cependant de très faibles écarts entre les groupes. Ce modèle étant considéré comme le modèle le plus discriminant en matière de perte de biodisponibilité des protéines a alors été sélectionné afin de déterminer l'effet de la matrice protéique laitière dans la deuxième étude *in vivo*. Cette troisième étude a alors eu pour but d'étudier directement l'effet matrice sur la digestibilité et l'utilisation postprandiale des protéines. Un récapitulatif des différents objectifs de la thèse se trouvent dans la **Figure 22**.

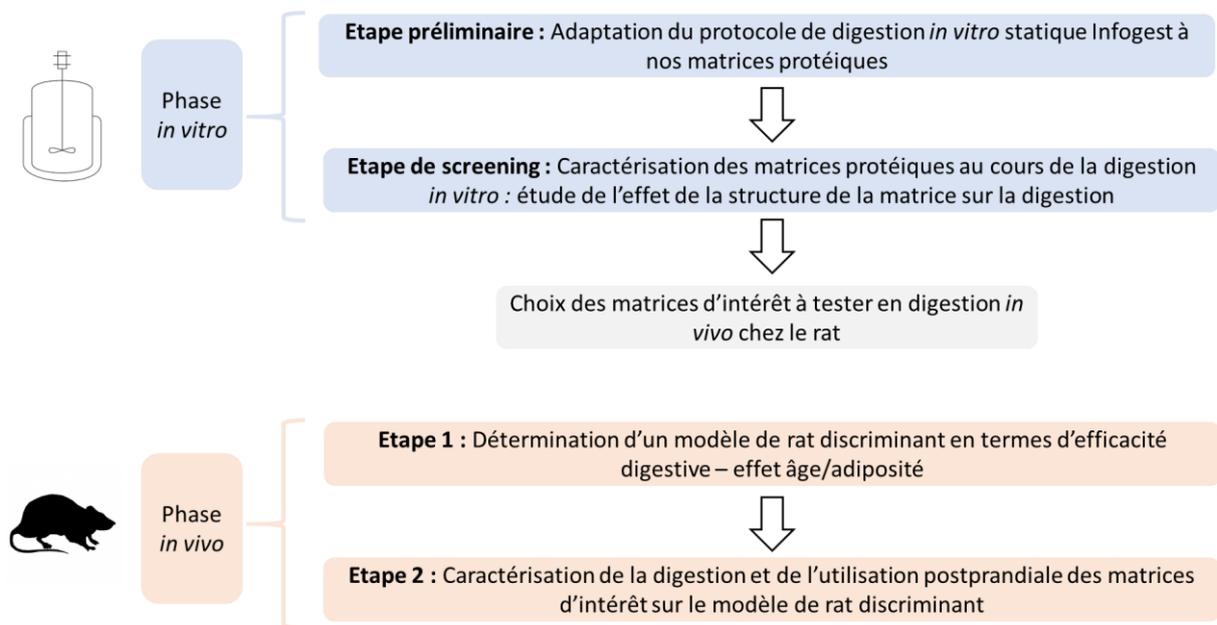


Figure 22. Récapitulatif des objectifs des travaux de thèse.

Seul le principe des méthodes les plus originales de cette thèse ainsi que la justification de leur utilisation sont discutés dans cette section du manuscrit. Les protocoles détaillés des méthodes et analyses sont expliquées dans les **Articles 1, 2 et 3**.

1. Obtention des matrices protéiques laitières

La digestion de sept matrices de protéines laitières a été étudiée au cours de cette thèse. Après pasteurisation et écrémage du lait, des étapes de filtration ont été appliquées afin d'extraire les caséines natives et protéines solubles. Cette étape d'extraction a ensuite été suivie de l'application de différents procédés physiques (ajout de protéines solubles), chimiques (déméralisation via l'ajout d'un acide) ou enzymatique (réticulation par transglutaminase) afin de modifier la structure des matrices protéiques. Finalement, les matrices ont été séchées par atomisation. Un schéma récapitulatif des différentes étapes d'obtention des matrices sont présentées dans la **Figure 23**.

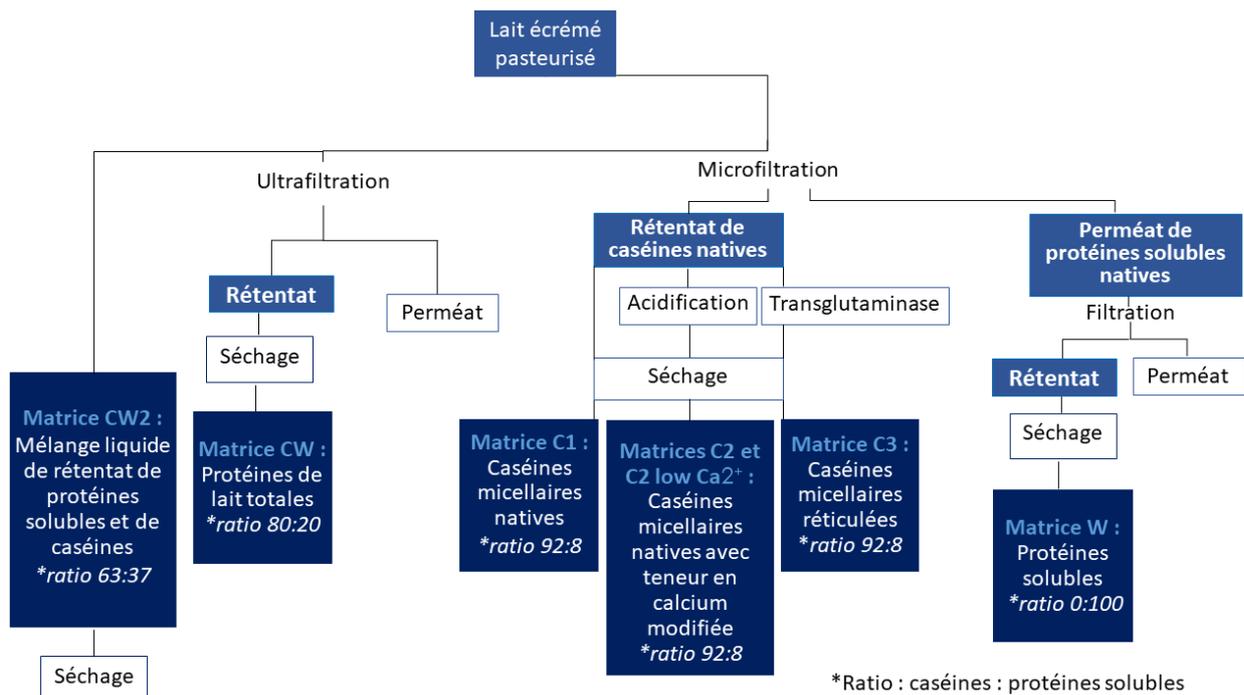


Figure 23. Procédés d'obtention des matrices laitières.

Les matrices obtenues peuvent donc être réparties en différentes catégories :

- Les matrices concentrées en caséines micellaires natives, ayant une teneur en calcium d'origine (C1) ou réduite (C2 et C2 low Ca²⁺).
- Une matrice de caséine micellaire réticulée par transglutamination (C3).
- Une matrice contenant les protéines totales de lait (CW).
- Une matrice avec une répartition de caséines et protéines solubles modifiée (CW2).
- Une matrice contenant uniquement des protéines solubles (W).

Le tableau suivant présente la composition en protéines et en calcium des matrices laitières étudiées au cours de ce travail :

Tableau 5. Composition des matrices étudiées.

	Caséines micellaires natives (%)	Protéines solubles (%)	Calcium (%)	Matière azotée totale (%)
C1	92	8	2,6	83
C2	92	8	2,1	82,3
C2 low Ca²⁺	92	8	1,6	85,1
C3	92	8	2,6	80,1
CW	80	20	2,2	81
CW2	63	37	1,8	81
W	0	100	0,3	81,5

C pour caséines, W pour protéines solubles (W pour « whey proteins » en anglais), CW pour caséines et protéines solubles.

2. Digestion *in vitro* : optimisation du protocole et techniques

analytiques

2.1. Optimisation du protocole de digestion statique *in vitro* Infogest

Comme discuté dans l'introduction bibliographique, le protocole harmonisé Infogest de digestion statique a été optimisé afin de développer un protocole standardisé facilitant la comparaison des données obtenues dans les différents laboratoires. Ce protocole rassemble des conditions proches de la situation physiologique et faciles à appliquer. De plus, ces conditions sont considérées comme des suggestions de base et peuvent être adaptés en fonction de la question de recherche posée [272].

Ainsi, avant de procéder à la caractérisation nutritionnelle des différentes matrices protéiques au cours de la digestion *in vitro*, une étude préliminaire a été effectuée afin d'adapter le protocole Infogest aux matrices protéiques étudiées (**Figure 24**).

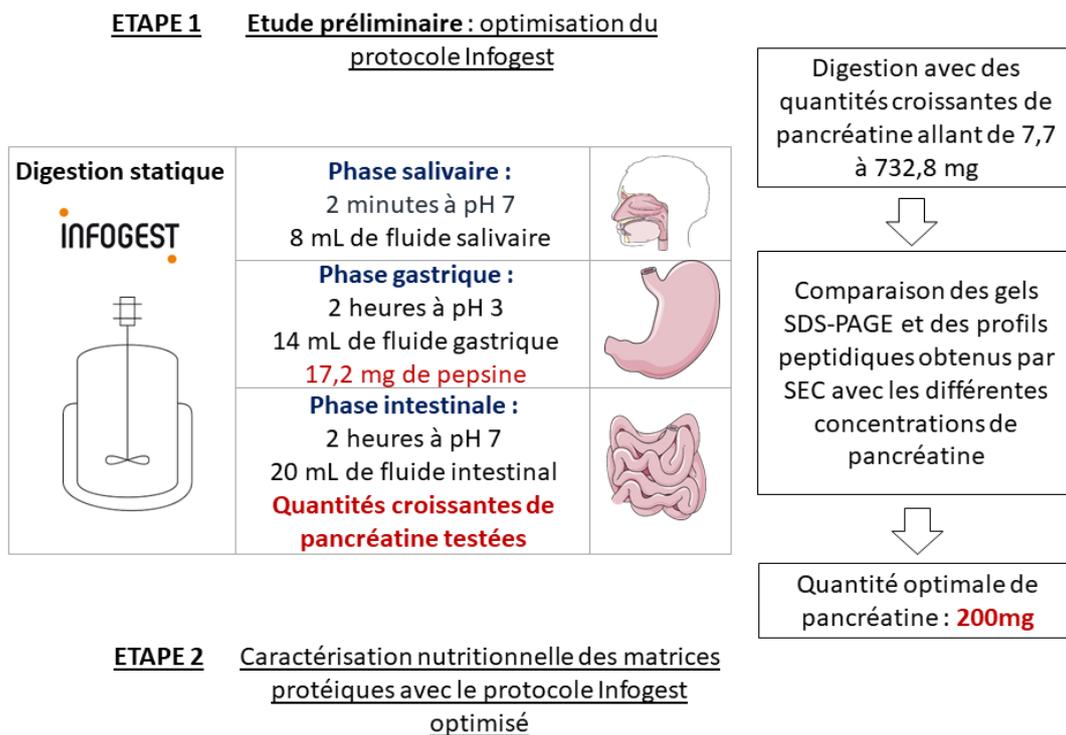


Figure 24. Schéma explicatif du déroulement de l'optimisation du protocole de digestion in vitro statique Infogest pour les matrices protéiques. SDS-PAGE pour « sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis » en anglais et SEC pour « Size Exclusion Chromatography » en anglais

En effet, les matrices analysées dans cette thèse sont relativement simples en matière de composition puisqu'elles sont constituées majoritairement de protéines de lait purifiées. Le protocole Infogest, initialement développé pour digérer une large gamme de matrices alimentaires, ne semblait donc pas réellement adapté à la problématique de ce travail.

L'adaptation du protocole a donc été principalement réalisée au niveau de la quantité de pancréatine à ajouter en phase intestinale car en suivant les indications du protocole d'origine, une concentration de 100 U.mL⁻¹ de pancréatine était nécessaire pour digérer les matrices protéiques (sur la base de l'activité trypsique). Cela aurait été équivalent à 732,8 mg de pancréatine (ou 18,32 mg.mL⁻¹ de fluide digestif intestinal) donnant ainsi un rapport enzyme/substrat (*m/m*) proche de 1 (732,8 mg de pancréatine pour 800 mg de protéines). Tout en étant plus rentable, l'avantage d'une diminution de la quantité de pancréatine permet une identification plus aisée par spectrométrie de masse des peptides obtenus au cours de la

digestion, la proportion de peptides issus de l'autolyse des enzymes intestinales étant ainsi diminuée.

Dans cette étude préliminaire, des quantités croissantes de pancréatine ont été testées afin de retrouver une population peptidique, issue de la matrice protéique, similaire à celle obtenue avec la quantité de pancréatine recommandée. Sur la base de cette étude préliminaire, une quantité de 200 mg de pancréatine a été choisie pour l'étape de caractérisation des matrices protéiques au cours de la digestion *in vitro*. Le déroulement de l'optimisation du protocole Infogest pour la quantité de pancréatine utilisée en phase intestinale sont détaillés dans l'**Article 1** de cette thèse.

2.2. Principe des techniques analytiques

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Le principe de la SEC (pour « Size Exclusion Chromatography » en anglais) repose sur la séparation des molécules en fonction de leur taille. La phase stationnaire est formée d'un gel constitué de billes poreuses ayant une distribution de taille spécifique, et la phase mobile est hydrophile ou hydrophobe en fonction de la phase stationnaire [273].

Les petites molécules diffusent dans les pores, et leur passage à travers la colonne est retardé en fonction de leur taille, tandis que les plus grosses molécules ne peuvent pas pénétrer dans les pores et sont donc éluées dans le volume mort de la colonne. Ainsi, les molécules sont séparées par ordre de poids moléculaire décroissant. La mise en place d'une courbe d'étalonnage basée sur l'élution d'un ensemble d'analytes de poids moléculaires connus peut alors être utilisée pour estimer le poids moléculaire d'analytes inconnus [273]. La courbe d'étalonnage permet d'établir une relation linéaire entre le poids moléculaire de l'analyte connu et le coefficient de partage K_d ou d'avancement K_{av} de l'analyte inconnu avec la formule suivante :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0 t_0}$$

Où K_{av} représente le coefficient d'avancement de l'analyte inconnu ; V_e le volume d'élution de l'analyte inconnu ; V_0 le volume mort ; et V_t le volume total de la colonne.

Le volume mort représente le volume dans lequel les molécules ayant une taille plus importante que la taille du plus grand des pores sont éluées. Ainsi, à partir de l'étalonnage, une relation linéaire peut être établie en corrélant le volume d'élution (K_{av}) avec le logarithme de la masse moléculaire (Da) et énoncée de la manière suivante :

$$K_{av} = a \times \log (MM) + b$$

Avec K_{av} étant le coefficient d'avancement, MM la masse moléculaire en Daltons, a représentant la pente, et b l'ordonnée à l'origine.

Dans ce manuscrit, l'utilisation de cette droite de calibration a permis de déterminer la masse moléculaire apparente des peptides obtenus au cours de la digestion. De plus, dans le cadre de cette thèse, un détecteur de type UV branché en sortie de colonne et réglé à une longueur d'onde de 215 nm a été utilisé afin de mesurer l'absorbance des liaisons peptidiques.

La spectrométrie de masse : LC-MS/MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique analytique puissante combinant le pouvoir séparateur de la chromatographie liquide avec la capacité d'analyse très sensible de la spectrométrie de masse. Le spectromètre de masse a la capacité de fournir des informations sur la nature, la composition, la structure et l'abondance des espèces analysées. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse qui diffèrent en termes de source d'ionisation, d'analyseur, ou de détecteur, et qui peuvent être couplés ou non à de la chromatographie. Cette section se focalisera uniquement sur le fonctionnement d'un système LC-MS/MS utilisé dans cette thèse (**Figure 25**).

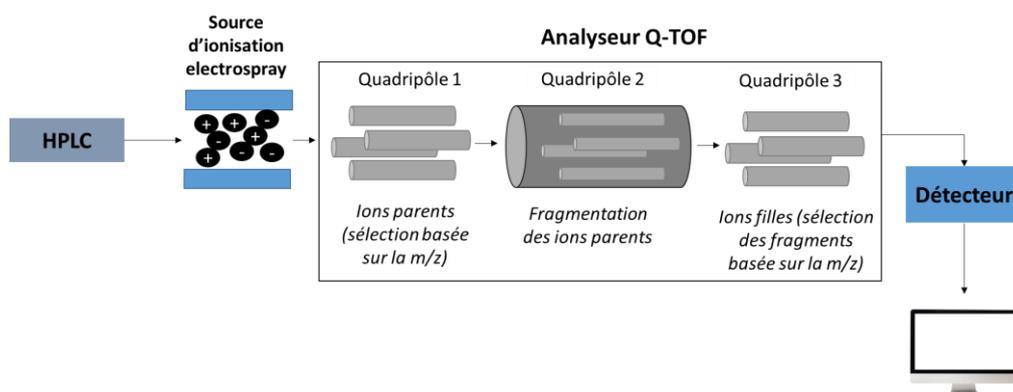


Figure 25. Principe simplifié de la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem.

Dans une première étape, les peptides résultant de l'hydrolyse des protéines au cours de la digestion sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse en fonction de leur hydrophobie et rejoignent la source d'ionisation du spectromètre de masse où ils sont ionisés et simultanément transférés en phase gazeuse. Dans le cas du LC-MS/MS utilisé dans le cadre de cette thèse, l'ionisation se produit grâce à un électrospray (ESI pour « Electro Spray Ionization » en anglais) directement en sortie de colonne. Les ions de peptides sont alors accélérés par une différence de potentiel en direction d'une série d'analyseurs de masse (quadripolaires (Q) et temps de vol (TOF) dans ce contexte). Les ions sont alors triés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) et seront quantifiés par le détecteur.

Afin d'identifier les peptides par l'intermédiaire de la détermination de leur séquence en acide aminé, les ions de peptides (ou ion parent) de m/z spécifique sont sélectionnés, en excluant tous les autres ions, au niveau du premier quadripôle. Ces ions de peptides sont alors fragmentés, par dissociation induite par collision (CID pour « collision-induced dissociation » en anglais), au sein de la cellule de collision (quadripôle suivant) en ions produits (ou ions filles). Ces ions de peptides fragmentés sont quant-à-eux triés par l'analyseur à temps de vol et seront comme précédemment, quantifiés au niveau du détecteur. Les données d'analyse LC-MS/MS sont en définitive stockées de manière informatique et sont retraitées par un ou plusieurs logiciels dédiés, couplés aux bases de données de protéines permettant d'obtenir la séquence en acides aminés des peptides et donc leur identité.

2.3. Analyse des Composantes Communes et Poids Spécifique

(ACCPS)

Les digestats des matrices protéiques laitières prélevés au cours de la digestion statique ont fait l'objet de nombreuses analyses chimiques et de spectrométrie de masse afin de les caractériser au mieux. Les analyses de spectrométrie de masse nous ont permis d'identifier les séquences peptidiques générées, et les dosages chimiques de déterminer la concentration de peptides, d'acides aminés, de calcium et la taille des poids moléculaires générés au cours de la digestion. Pour analyser les caractéristiques des matrices protéiques dans leur ensemble, différents tableaux de données ont été constitués. Dans le cas des données de spectrométrie de masse, un tableau par protéine de lait a été constitué, et la fréquence d'apparition d'un acide aminé appartenant aux chaînes peptidiques identifiées correspondait à une seule variable. Pour les analyses chimiques, un tableau regroupant les résultats des différents dosages a été conçu, et les différents dosages réalisés constituaient les différentes variables. La présence d'un nombre de variables très différent entre les données générées par spectrométrie de masse, et les analyses chimiques rendait l'analyse simultanée des données compliquée à exécuter à partir de méthodes statistiques classiques. Nous recherchions une méthode statistique nous permettant d'analyser les données caractérisant les matrices protéiques dans leur ensemble. Ainsi, une Analyse des Composantes Communes et Poids Spécifiques (ACCPS) a été mise en œuvre [274,275]. Cette méthode statistique a pour objectif d'analyser simultanément plusieurs tableaux de données contenant différentes variables décrivant les mêmes échantillons (les échantillons représentés par nos différentes matrices protéiques en l'occurrence).

L'algorithme au cœur de cette méthode est basé sur celui de l'Analyse en Composantes Principales (ACP), et permet de calculer un espace commun à tous les tableaux, basé sur des variables latentes appelées des composantes communes (CC). Ainsi, après normalisation des tableaux, pour prendre en compte les différents ordres de grandeurs des intensités dans les différents tableaux, un processus itératif est utilisé pour estimer chaque composante commune ainsi que la contribution (appelée « poids spécifique », ou « salience » en anglais) de chaque tableau dans la construction de cette composante commune. Les composantes communes décrivent la dispersion des données commune aux différents tableaux. Les

différences dans les valeurs des saliences reflètent le fait que les tableaux de données n'ont pas contribué de manière égale à la construction de la composante commune en question.

Les résultats obtenus avec la méthode d'ACCPS se trouvent dans l'Article 1.

3. Digestion *in vivo*

3.1. Marquage des protéines de lait au ^{15}N

Dans les études *in vivo* effectuées dans cette thèse, les protéines de lait ingérées par le rat le jour de l'euthanasie étaient intrinsèquement marquées au ^{15}N . Lors de la première étude, les rats ont consommé le même repas de caséines micellaires natives marquées au ^{15}N , étant donné que le but était de regarder l'effet de facteurs physiologiques. Pendant la deuxième étude, les rats ont consommé des repas isoprotéiques contenant les différentes matrices laitières étudiées.

Le marquage des protéines a été réalisé sur deux vaches avec du lait collecté par la coopérative Prospérité Fermière (Arras, France). Les vaches ont reçu oralement 100 g/jour de sulfate d'ammonium marqué au ^{15}N ($(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 99 %) matin et soir durant 9 jours consécutifs. Le lait a été collecté à partir du 4^{ème} jour durant 6 jours (Figure 26).

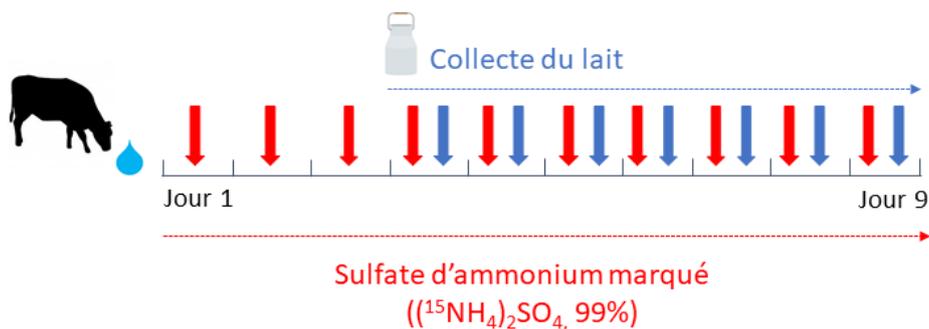


Figure 26. Protocole de marquage du lait au ^{15}N .

Les bactéries présentes dans le rumen bovin hydrolysent le sulfate d'ammonium, libérant de l'ammoniac, utilisé par la suite pour la synthèse des protéines et acides aminés microbiens. Ces derniers sont alors marqués au ^{15}N , et digérés puis absorbés par l'intestin grêle de la vache, pour être incorporés dans l'ensemble des protéines synthétisées par l'animal. Ce processus assure un marquage uniforme, et les acides aminés absorbés sont prélevés par la glande mammaire et utilisés pour la synthèse protéique du lait. L'enrichissement en ^{15}N d'un échantillon est évalué en atome pourcent (AT%), qui représente le pourcentage de l'isotope stable sur l'ensemble des atomes (**formule détaillée dans section 3.1.5 de ce chapitre**). Ainsi, l'enrichissement en ^{15}N du lait récupéré lors de la traite aux jours 4 à 9 était équivalent à 1,5 AT%, correspondant à plus de 4 fois l'enrichissement naturel de 0,36 AT%.

Les protéines de lait marquées au ^{15}N ont ensuite été extraites suivant la procédure indiquée dans la **section 1 de ce chapitre**.

3.2. Evaluation de la digestibilité des protéines et des acides aminés chez le rat

Les protocoles détaillés des différentes études animales se trouvent dans les **Articles 2 et 3**. Dans les deux études, les rats ont suivi une période d'habituatation à l'ingestion d'un petit repas en un temps court, afin de garantir la consommation du repas contenant les protéines d'intérêt marquées le jour de l'euthanasie (**Figure 27**). Cette période d'habituatation a duré une semaine et a consisté à mettre les rats à jeun la veille à partir de 17h30 afin de leur administrer un repas test contenant les protéines d'intérêt non marquées le lendemain à 9h00. Le repas était retiré au bout de 30 min et les rats n'avaient plus accès à de la nourriture pendant 1 h avant de recevoir un régime standard *ad libitum* pendant 7 h.

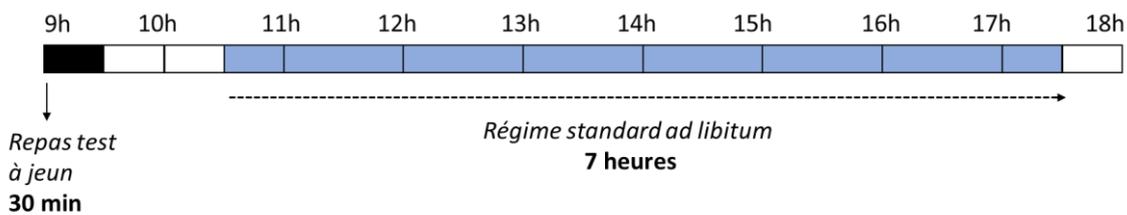


Figure 27. Protocole d'habituation çà la consommation d'un repas test.

Le jour de l'euthanasie, 6 h après l'ingestion du repas contenant les protéines d'intérêt marquées, les rats ont été euthanasiés et les contenus digestifs ont été récupérés. Les contenus de l'estomac, de l'intestin grêle, de l'iléon terminal, du caecum, du colon, et les fèces produites dans les 6 h après l'ingestion du repas, ont été collectés. Chez le rat, l'iléon terminal est considéré comme les dix derniers centimètres de l'intestin grêle [276].

Afin d'évaluer la digestibilité des protéines, les contenus digestifs ont été analysés dans chaque compartiment pour mesurer le pourcentage d'azote et l'enrichissement en ^{15}N par analyseur élémentaire couplé un spectromètre de masse à ratio isotopique (EA-IRMS). De plus, en connaissant la quantité d'azote ingéré et retrouvé dans chaque compartiment luminal, il a été possible d'estimer la quantité de protéine alimentaire non absorbée et donc de déduire la digestibilité de la protéine au niveau caecal et fécal. Sur le même principe, la digestibilité individuelle de chaque acide aminé a été estimée au niveau caecal. Pour ce faire, la quantité d'acide aminé retrouvée dans le caecum a été quantifiée par chromatographie liquide (UHPLC) et l'enrichissement en ^{15}N dans chaque acide aminé a été évalué par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse de rapport isotopique (GC-C-IRMS). Le fonctionnement des différents appareils est détaillé dans la **section 3.5** de ce chapitre.

Dans les deux études animales, la digestibilité a été estimée au niveau fécal ainsi qu'au niveau caecal.

3.3. Evaluation du devenir métabolique de l'azote

Après ingestion du repas, le suivi de l'incorporation de l'azote alimentaire dans les pools de rétention azoté (acides aminés libres et protéines plasmatiques issus des protéines alimentaires) et de désamination (urée plasmatique, urée et ammoniac urinaire issus de la dégradation des protéines alimentaires) a été réalisé. Pour ce faire, du sang a été recueilli 6 h après le repas et les urines ont été collectées pendant toute la période suivant l'ingestion. L'enrichissement en ^{15}N par EA-IRMS dans les différents pools a été déterminé permettant d'évaluer l'utilisation post-prandiale de l'azote.

3.4. Evaluation du taux de synthèse protéique dans les différents tissus

Dans la première étude réalisée chez le rat, le rôle de l'âge et de l'adiposité sur le taux de synthèse protéique dans le muscle, le foie, les reins et la peau a été évalué. Dans la deuxième étude, c'est l'effet matrice qui a été évalué sur la synthèse protéique musculaire et hépatique.

Le principe de la méthode repose sur un modèle simplifié du métabolisme protéique. Ce modèle est composé de deux compartiments : un compartiment d'acides aminés libres représentant le pool précurseur de la synthèse protéique, et un compartiment constitué des protéines tissulaires (**Figure 28**).

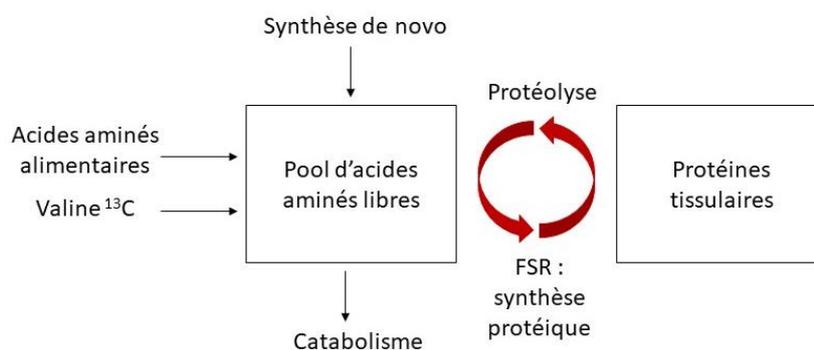


Figure 28. Schéma du modèle simplifié du métabolisme protéique.

Ainsi, pour évaluer le taux de synthèse protéique dans les tissus, les rats reçoivent une dose en surcharge de valine marquée au ^{13}C (isotope stable du carbone), qui est un traceur, via une injection dans la veine latérale de la queue. La valine étant injectée en surcharge, cela provoque une inondation du pool précurseur, et permet d'atteindre rapidement un niveau de marquage uniforme et détectable dans les pools d'acides aminés libres (pools extracellulaires, intracellulaires et interstitiels d'aminoacyl-ARNt) de l'organisme [277]. Dans nos études, l'injection a été réalisée 30 min avant l'euthanasie. La surcharge du pool d'acides aminés libres a donc permis de mesurer le taux d'incorporation de la valine ^{13}C dans les protéines tissulaires sur une période définie de 30 min.

Le taux de synthèse protéique fractionnaire (FSR de « *Fractional synthetic rate* » en anglais) a pu être calculé pour chaque organe ou tissu à partir du rapport d'enrichissement en valine ^{13}C dans les pools précurseurs et les protéines tissulaires. Le FSR représente la fraction du pool protéique qui est renouvelé par unité de temps. Cela donne une mesure de la vitesse à laquelle la traduction se produit dans les cellules, et est indépendante de la masse totale des protéines.

3.5. Méthodes analytiques

Différentes méthodes analytiques ont été utilisées pour évaluer les enrichissements isotopiques dans cette thèse.

Analyses élémentaires et isotopique : EA-IRMS

Une des principales techniques analytiques à avoir été utilisée pour l'analyse de l'enrichissement en ^{15}N dans les échantillons est celle de l'analyseur élémentaire couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (EA-IRMS pour « *Elemental analyser – isotope ratio mass spectrometry* » en anglais) (**Figure 29**). Cette combinaison d'appareils permet d'obtenir d'une part le pourcentage d'azote grâce à l'EA, et d'autre part l'enrichissement en ^{15}N grâce à l'IRMS. Cette technique a été utilisée pour analyser les recueils digestifs, l'incorporation du ^{15}N dans certains organes, les fractions plasmatiques (urée, acides aminés libres, culots protéiques) et les urines.

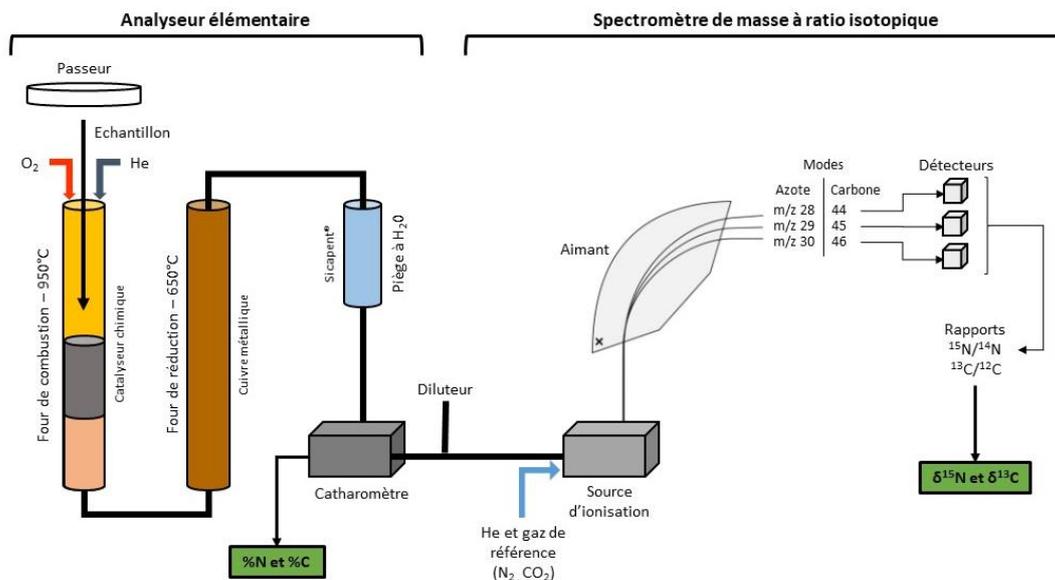


Figure 29. Schéma du fonctionnement de l'EA-IRMS. D'après [278].

Les échantillons, solides ou liquides, sont placés dans des capsules en étain. Dans le cas des échantillons solides, une pesée précise de la capsule sur une balance de précision doit être réalisée. Les échantillons sont injectés par un système de passeur automatique et subissent une première étape de combustion rapide à 1050 °C en présence d'oxygène. La présence de catalyseurs dans une colonne appelée four de combustion, remplie d'agents oxydants (oxyde de cuivre), facilite cette combustion et génère différents gaz : des oxydes d'azote (NO, NO₂, NO₃) du CO₂, de l'O₂ et du H₂O. D'autres composés halogénés et soufrés sont générés mais se fixent directement au four de combustion. Une deuxième colonne de réduction chauffée à 650 °C et remplie de cuivre métallique réduit les oxydes d'azote en azote élémentaire (N₂) et retient l'excès d'O₂. Un piège contenant à la fois du Sicapent (un composé déshydratant) et de l'ascarite (du NaOH recouvert de silices) retient l'eau et le CO₂ respectivement. Finalement, les gaz sont séparés sur une colonne chromatographique maintenue à 65 °C, et le N₂ est quantifié dans un détecteur de conductibilité thermique en le comparant au gaz de référence pur (N₂). L'appareil génère ensuite les données de pourcentage d'azote de l'échantillon à partir de l'atropine, qui est un standard externe dont le pourcentage d'azote est déjà connu.

Afin d'obtenir les ratios isotopiques, le N₂ est acheminé vers l'IRMS où il est ionisé par impact électronique grâce à une source d'ionisation composée d'un filament émetteur d'électrons. Des ions de masses 28, 29 et 30 sont alors formés et subissent une accélération, puis une séparation grâce à un champ magnétique. Les ions sont séparés en fonction de leur m/z et des détecteurs (cage de Faraday) collectent les ions de masse différentes. Quand les ions atteignent les détecteurs, cela crée des courants électriques ayant des intensités proportionnelles au nombre d'ions venant frapper les détecteurs. Ces intensités sont amplifiées et traduites en tensions électriques afin d'être mesurées. L'intensité des signaux générés correspond au nombre d'ions ayant atteint les différents détecteurs, et les rapports ¹⁵N/¹⁴N sont alors calculés à partir des rapports d'intensité. Ainsi, ce rapport est exprimé en delta pour mille (δ) calculé à l'aide du gaz de référence qui est le N₂ atmosphérique. La formule du delta pour mille est la suivante :

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{\frac{15\text{N}}{14\text{N}} \text{échantillon} - \frac{15\text{N}}{14\text{N}} \text{gaz de référence}}{\frac{15\text{N}}{14\text{N}} \text{gaz de référence}}$$

Finalement, les données peuvent ensuite être corrigées par rapport aux valeurs de l'acide glutamique, un standard isotopique externe pour être exprimées en AT% de la manière suivante :

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

Avec δ référence, représenté par le rapport ¹⁵N/¹⁴N dans l'atmosphère.

Analyses isotopiques : GC-C-IRMS et GC-MS

GC-C-IRMS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à ratio isotopique et à une interface de combustion (GC-C-IRMS pour « *Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry* » en anglais) a été utilisée pour déterminer le rapport des isotopes stables du carbone (¹³C/¹²C) et de l'azote (¹⁵N/¹⁴N) (**Figure 30**).

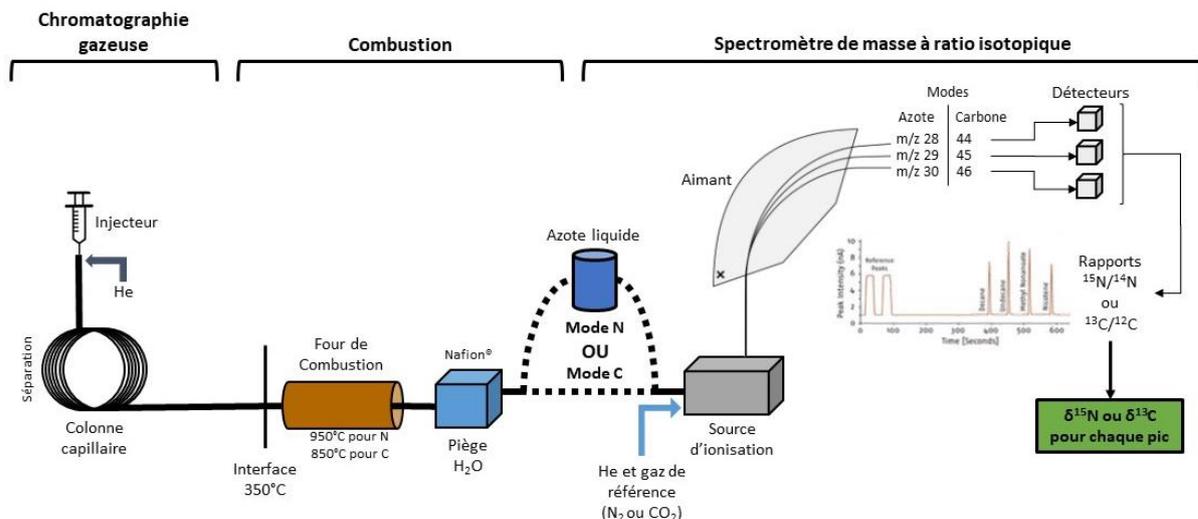


Figure 30. Schéma du fonctionnement du GC-C-IRMS. D'après [278].

Ainsi, cet appareil a été utilisé pour déterminer l'enrichissement en ^{15}N des acides aminés individuels dans les effluents et déterminer la digestibilité des acides aminés, mais aussi pour mesurer le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la valine dans la fraction protéique tissulaire et déterminer le FSR. Dans les deux types d'analyse, les échantillons ont subi une hydrolyse acide en amont afin de séparer les acides aminés des protéines. Ensuite les acides aminés ont été extraits sur résine avant d'être dérivés pour être rendus volatils. Après dérivation, les échantillons ont été introduits dans l'appareil : en mode azote pour les effluents, et en mode carbone pour évaluer le taux de synthèse protéique dans les tissus.

Une fois injecté, l'échantillon est séparé sur une colonne capillaire soumise à un programme de température spécifique : initialement, la température de la colonne est à $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ et atteint $270\text{ }^{\circ}\text{C}$ afin d'y être maintenue pendant 10 min. Ceci va permettre aux acides aminés d'être séparés en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire, avant d'être acheminés vers le four de combustion qui va les transformer en gaz analysables par l'IRMS. Le four de combustion est chauffé à $950\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les analyses d'azote, et à $850\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour les analyses de carbone. Ainsi, le four de combustion transforme les composants en CO_2 , en oxydes d'azote et en H_2O et les réduit par la suite. L'eau passe par une membrane qui l'élimine (Nafion), et quand l'analyse s'effectue en mode azote, un piège cryogénique (azote liquide) élimine les

polluants résiduels. Les composants réduits passent ensuite par l'IRMS qui détermine les ratios isotopiques. L'analyse des échantillons se fait ensuite grâce à un chromatogramme du courant ionique dans lequel se trouve un pic pour chaque acide aminé individuellement. Les acides aminés ont été injectés individuellement afin d'enregistrer leur temps de rétention, déduire les pics leur correspondant, et les identifier ainsi.

GC-MS

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS pour « *gas chromatography – mass spectrometry* » en anglais) a été utilisée pour déterminer l'incorporation de valine ^{13}C dans la fraction d'acides aminés libres des différents organes et tissus (**Figure 31**) pour l'analyse de FSR. Pour ce faire, les échantillons ont été extraits sur résine puis dérivés avant d'être analysés avec le GC-MS.

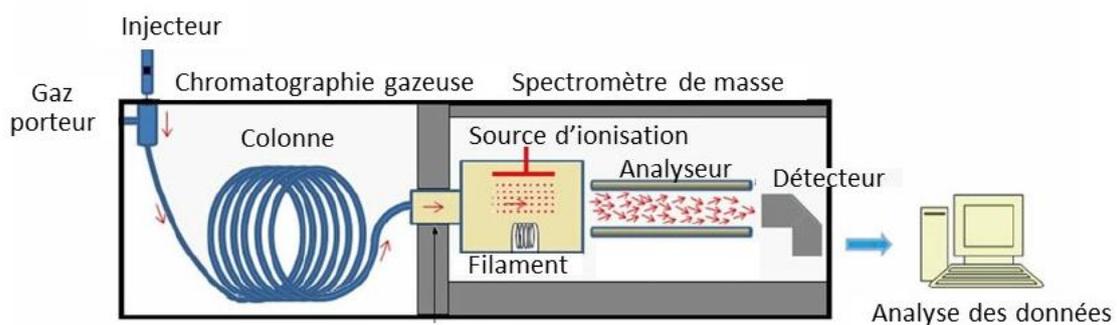


Figure 31. Schéma du fonctionnement du GC-MS. D'après [279].

L'analyse commence avec l'injection de l'échantillon dans le chromatographe, où il est vaporisé et séparé en ses différents acides aminés à l'aide d'une colonne capillaire recouverte d'une phase stationnaire de polarité moyenne. Les acides aminés sont alors propulsés par un gaz porteur inerte. Au fur et à mesure de la séparation des acides, ils sont élués de la colonne à des temps de rétention différents en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire. Une fois que les acides aminés quittent la colonne, ils sont ionisés et fragmentés en ions fils par le spectromètre de masse via une source à impact électronique. L'acquisition des données par GC-MS est alors effectuée en mode « *Single Ion Monitoring* » (SIM), pour recueillir des données uniquement pour des masses spécifiques d'intérêt. Comme nous avons utilisé la ^{13}C -

valine en traceur, le fragment nous intéressant est celui comportant le carbone potentiellement enrichi en ^{13}C . Ainsi, le fragment recherché a une masse de 288 ou 289 avec une charge de 1, selon qu'il provienne d'une molécule de valine marquée au ^{13}C ou non marquée (^{12}C -valine). Les molécules et fragments ionisés sont accélérés par l'analyseur, qui est un simple quadripôle, et les ions sont séparés sur la base de leurs différents rapports m/z. Arrivés dans le détecteur, les ions sont identifiés proportionnellement à leur nombre. Un spectre de masse est alors obtenu, permettant de déterminer l'abondance des fragments 288 et 289 et d'établir le rapport ^{12}C -valine/ ^{13}C -valine.

Analyse quantitative : UHPLC

Afin de quantifier les acides aminés présents dans les effluents et le plasma, l'UHPLC (pour « *ultra-high pressure liquid chromatography* » en anglais) a été utilisée (**Figure 32**). L'UHPLC est une méthode chromatographique spécialisée qui fonctionne plus rapidement, a une meilleure résolution, et utilise moins de solvant que la HPLC classique. L'UHPLC utilise donc une colonne plus petite composée de particules plus petites (généralement moins de 2 μm de diamètre).

Les échantillons plasmatiques ont été précipités et dérivés directement. En revanche, les contenus digestifs ont préalablement été hydrolysés. La norvaline a servi de standard interne pour les analyses. De plus, une gamme standard composée d'un mélange d'acides aminés d'une concentration connue a été utilisée.

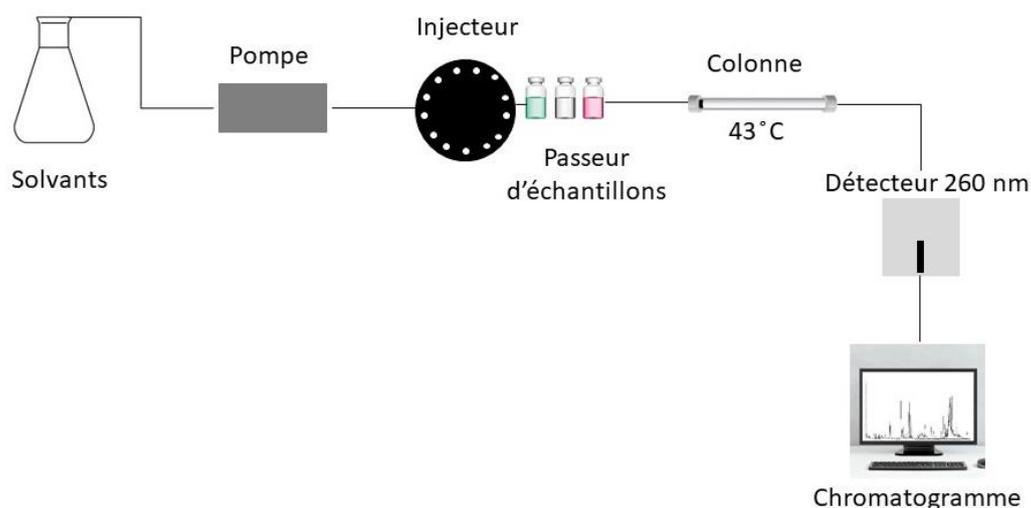


Figure 32. Représentation schématique simplifiée du fonctionnement de l'UHPLC pour le dosage des acides aminés

L'UHPLC est composé de quatre compartiments. Le premier appelé "*flow through needle*" (FTN) comporte le passeur d'échantillons et l'aiguille d'injection qui sont maintenus à une température de 20 °C. Le compartiment « *Quaternary Solvent Manager* » (QSM) est composé de pompes contrôlant la pression dans la colonne et les gradients de solvants. Le troisième compartiment contient la colonne (AcQ-Tag amino acid C18 column, Waters) qui est soumise à une température de 43 °C, et le quatrième comprend un détecteur à barrette de diodes (PDA pour « *photodiode array detector* » en anglais) qui détecte les acides aminés. Le gradient se fait à partir de trois différentes solutions : un éluant provenant de Waters (éluant A), un mélange composé d'acétonitrile (98 %) et d'acide formique (2 %), et de l'eau ultrapure. Après injection, les échantillons vont passer par la colonne et les acides aminés vont être séparés en fonction de leur affinité à la phase stationnaire. Ensuite les échantillons traversent un détecteur PDA où ils vont être détectés à une longueur d'onde de 260 nm. Un chromatogramme est généré par la suite, et la quantité de chaque acide aminé est obtenue à partir des aires sous la courbe des différents pics et de la gamme standard, en corrigeant par la norvaline.

L'utilisation des différents appareils pour les analyses réalisées sur les échantillons récupérés pendant les études *in vivo* sont résumés dans la **Figure 33**.

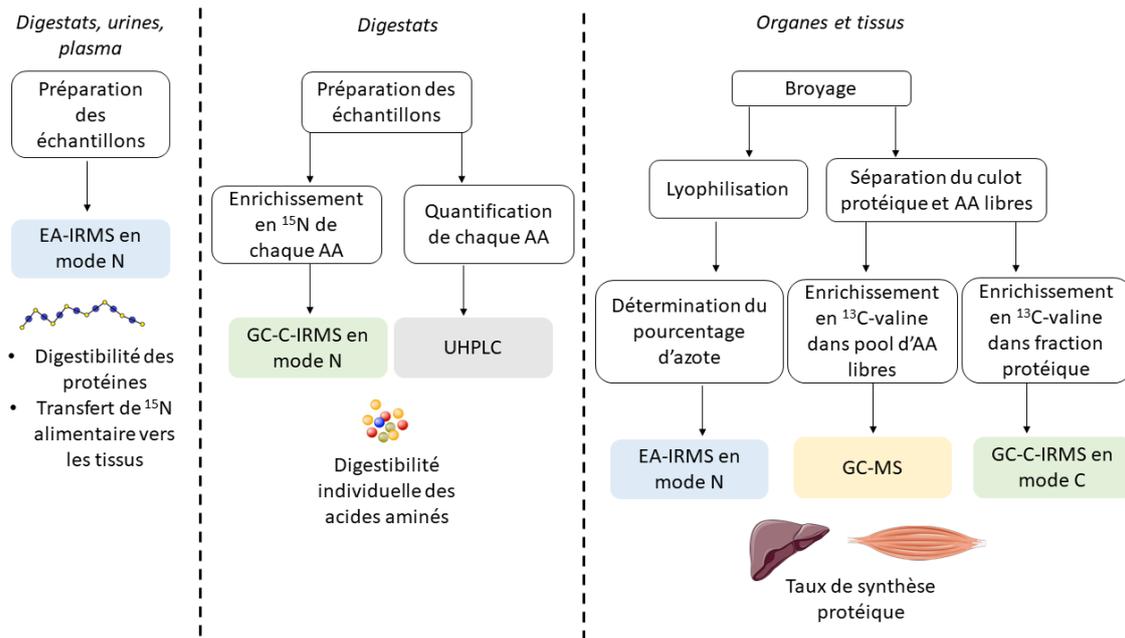


Figure 33. Schéma récapitulatif de l'utilisation des appareils pour les principales analyses effectuées lors des études *in vivo*.

4. Résultats

4.1. Évaluation *in vitro* de l'impact des procédés industriels sur la digestion gastro-intestinale des matrices protéiques du avec le protocole Infogest (Article 1).

Article publié dans « Foods », octobre 2020 [280].

Résumé

Objectif

L'objectif de cette étude était de déterminer l'impact des procédés industriels sur la digestion de six matrices protéiques laitières en utilisant le protocole de digestion *in vitro* statique harmonisé Infogest.

Méthodes

Une étape préliminaire a consisté à optimiser le protocole Infogest afin de mieux l'adapter à des matrices protéiques simples en comparant les gels SDS-PAGE et les profils peptidiques obtenus par SEC avec des quantités croissantes de pancréatine en phase intestinale. Ensuite, les profils de poids moléculaire, l'hétérogénéité des peptides identifiés obtenus à partir des données LC-MS/MS, les concentrations de calcium, d'acides aminés libres et de peptides ont été déterminés pour les six matrices protéiques en phases gastrique et intestinale.

Résultats

En digérant nos matrices protéiques avec une quantité de pancréatine réduite (activité trypsique de 27,3 U. mL⁻¹ au lieu de 100 U. mL⁻¹), des résultats similaires ont été observés en termes de profils peptidiques et électrophorétiques. En termes de comparaison des matrices protéiques, les protéines solubles étaient résistantes à la digestion gastrique mais ont ensuite été très hydrolysées en phase intestinale. De plus, des différences sont apparues entre les matrices à base de caséines, en particulier au niveau des populations peptidiques générées au

cours de la digestion pour les matrices de caséines réticulées et déminéralisées, par rapport à la caséine micellaire native.

Conclusion

Ces résultats ont montré que le procédé industriel modifiait non seulement la distribution protéique des matrices mais aussi très probablement la structure au vu du comportement des matrices au cours de la digestion.

In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol

Nathalie Atallah ^{1,2,3}, Barbara Deracinois ¹, Audrey Boulier ², Alain Baniel ², Delphine Jouan–Rimbaud Bouveresse ³, Rozenn Ravallec ¹, Christophe Flahaut ^{1,†} and Benoit Cudennec ^{1,*,†}

¹ UMR Transfrontalière BioEcoAgro N° 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d’Opale, ICV – Institut Charles Viollette, F–59000 Lille, France; nathalie.atallah@agroparistech.fr (N.A.); barbara.deracinois@univ-lille.fr (B.D.); rozenn.ravallec@univ-lille.fr (R.R.); christophe.flahaut@univ-artois.fr (C.F.)

² Ingredia S.A. 51 Av. Lobbedez – CS 60946, 62033 Arras Cedex, France; a.boulier@ingredia.com (A.B.); a.baniel@ingredia.com (A.B.)

³ Université Paris–Saclay, AgroParisTech, INRAE, UMR PNCA, 75005 Paris, France; delphine.bouveresse@agroparistech.fr (D.J.-R.B.)

* Correspondence: benoit.cudennec@univ-lille.fr; Tel.: +33-(0)3-62-26-85-90

† contributed equally.

Received: 26 August 2020; Accepted: 22 October 2020; Published: 30 October 2020

Abstract: The goal of this study was to determine the impact of industrial processes on the digestion of six milk protein matrices using the harmonized INFOGEST in vitro static digestion protocol. First, this method was optimized to simple protein matrices using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and size exclusion chromatography (SEC) to compare the intestinal protein hydrolysis obtained with increasing quantities of pancreatin. Similar results were achieved with the originally required pancreatin amount (trypsin activity of 100 U.mL⁻¹) and with a quantity of pancreatin equivalent to a trypsin activity of 27.3 U.mL⁻¹, which was thus used to perform the in vitro digestion of the milk matrices. Molecular weight profiles, peptide heterogeneity from LC–MS/MS data, calcium, free amino acid, and peptide concentrations were determined in the gastric and intestinal phases to compare the milk protein digests. Results showed that the industrial process affected not only the protein distribution of the matrices but also most likely the protein structures. Indeed, differences arose in terms of peptide populations generated when the caseins were reticulated or when their calcium concentrations were reduced.

Keywords: in vitro digestion; milk proteins; industrial processes; protocol optimization; peptidomics

1. Introduction

Milk proteins have been widely used in the food industry for the past 50 years due to the wide array of functions that they exhibit as food ingredients. Indeed, milk proteins are known not only for their nutritional value but also for their physicochemical and physiological properties [1]. Bovine milk proteins can be differentiated into two categories: micellar caseins and native whey proteins. Caseins are flexible phosphorylated proteins that are distinguished into four classes known as α -s₁, α -s₂, β -, and κ -caseins, which interact together to form a micelle. The structure of the casein micelle has been a subject of debates for years, and while no consensus has been agreed upon, two models are currently widespread: the submicellar and the nanocluster models [2]. The submicellar hypothesis formulates that the proteins in sodium caseinates, which characterize the protein extracts after removal of the calcium phosphate, form small aggregates through noncovalent interactions. These small aggregates, called submicelles, are linked together through small domains of calcium phosphate to form the casein micelles [2]. The nanocluster model suggests that the phosphopeptides present in β -caseins bind to and stabilize the calcium phosphate present in solutions in order to form nanoclusters. These calcium phosphate nanoclusters then interact with the more highly phosphorylated caseins (α -s₁ and α -s₂) to form the micellar particles. Both models agree that the κ -caseins are found on the surface of the micelles in a hairy layer, providing stability and limiting the growth of the micelle [2]. Whey proteins are globular proteins and are constituted of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, serum albumin, immunoglobulins, lactoferrin, and other minor fractions [3].

It has already been shown in human trials that micellar caseins have a slow gastric emptying rate and are digested in up to six hours, whereas whey proteins have a fast gastric emptying rate and are digested in two hours [4,5]. This difference is explained by physicochemical properties specific to micellar casein and whey proteins. Indeed, caseins can form curds in the stomach, which delay gastric emptying, whereas whey proteins remain soluble in acidic conditions and are emptied rapidly from the stomach [5]. However, it is important to note that differences in digestion cannot only be due to the nature of a protein. Indeed, a given protein can be digested differently if it has been subjected to modifications during industrial processing [6].

Processes such as heating, for example, are known to denature whey proteins, making them more digestible [6]. In the case of caseins, acidification processes are known to affect their conformation, turning them into what are known as sodium caseinates, whereas other processes such as membrane filtration are known to keep them intact. The structural differences between the two processes can be seen by scanning electron microscopy (SEM), where sodium caseinates are shown to have irregular shapes and a porous structure [7]. On the contrary, SEM shows that, when processes such as membrane filtration are applied, the integrity of the casein micelle is preserved [8].

To date, there is little evidence linking a protein conformation to the way that it is digested. In a study conducted using a dynamic human gastric simulator, numerous milk matrices consisting of whey and caseins were tested [9]. The authors reported that milk protein concentrate and skim milk powder, which both contained casein micelles, formed curds early in digestion and at a pH > 6. However, calcium depleted milk protein concentrates, sodium caseinates formed curds 40 min into digestion at a pH < 5, and the structure of the curds were looser and lighter in weight. When they compared heated and nonheated whey protein isolates, they noticed that β -lactoglobulin was not hydrolyzed in the nonheated whey protein isolate, whereas it was hydrolyzed quickly in the heated isolate [9]. This study thus shows the impact of a protein's structure, notably that of micellar caseins, and the influence of its processing on the way that it is digested.

As static digestion methods are less costly, less labor-intensive, faster than dynamic ones, and more ethical friendly than in vivo studies, it is often the method of choice for screening purposes. Moreover, since a harmonized protocol was developed by Minekus et al. in 2014 to improve the comparability of results between laboratories [10], static digestion methods have been further validated when compared to in vivo trials [11–13]. In this context of protein digestion understanding, this study aimed to compare the gastric and intestinal peptidomes of six milk matrices with varying ratios of protein categories and obtained with different industrial processes using the consensual INFOGEST static in vitro model simulating the gastrointestinal digestion and coming from the COST Action FA1005 INFOGEST (<https://www.cost-infogest.eu/>) [10]. The comparisons were made using size-exclusion chromatography (SEC) and mass spectrometry data (LC–MS/MS) among other analytical tools. However, in order to better compare our milk matrices, a preliminary aim of this work was to optimize the concentration of pancreatin in the INFOGEST protocol to adapt it to our simple milk matrices made up mostly of proteins.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The milk matrices were provided in powder form by Ingredia, Arras, France. Porcine pepsin (EC 3.4.23.1, from porcine gastric mucosa, 250 units.mg⁻¹ solid), pancreatin from porcine pancreas (EC number 232–468–9), and all other reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.1.1. Characteristics of the Milk Matrices

A total of 6 milk protein matrices (where C and W signify casein and whey, respectively) obtained by filtration and with different characteristics were digested in this study. Briefly, four of these matrices had the same concentration of caseins, three

of which differed in calcium concentration levels (C1, C2, and C2_{lowCa2+}) and one of which contained caseins that were reticulated by an enzymatic process (C3). One matrix (W) was constituted of whey proteins, and the other contained the same casein-to-whey ratio as that present in bovine milk (CW). The differences and similarities between the matrices are expressed in % in more details in Table 1. All of the matrices were rehydrated in water at 10% total nitrogen content before digestion. All of the matrices were provided by Ingredia.

Table 1. Characteristics of the milk matrices.

	Native Micellar Casein (%)	Whey Proteins (%)	Calcium (%)	Total Nitrogen Content (%)
C1	92	8	2.6	83
C2	92	8	2.1	82.3
C2 low Ca²⁺	92	8	1.6	85.1
C3	92	8	2.6	80.1
CW	80	20	2.2	81
W	0	100	0.3	81.5

C: casein; W: whey. Matrices were color coded: C1; purple, C2; dark orange, C2 low Ca²⁺; light orange, C3; light blue, CW; dark blue, and W; green. This color code was adopted for the entire study. The matrices C1, C2, and C3 were all built up native micellar caseins. C1 and C2 differed only in their calcium concentrations. C3 had the same calcium concentration as C1 but was obtained by an enzymatic process which reticulated the caseins.

2.1.2. Estimation of Free Calcium Concentrations

The milk matrices were rehydrated in 100 mL of water (100 g.L⁻¹) and then filtered in a mineral cartridge filter (Macrosep 10 K, Pall Biotech, Saint-Germain-en-Laye, France). After filtration, the suspension was centrifuged at a temperature of -20 °C and at 5000 × g for 90 min in order to collect at least 5 g of filtrate. Calcium concentration levels were then estimated by atomic absorption spectrophotometry. Briefly, a solution of lanthanum (25 g.L⁻¹); HCl (1% in H₂O); and standard solutions of calcium, sodium, potassium, and magnesium; and the milk matrices were injected into a dual sample introduction pump system (SIPS 20, Agilent Technologies, Les Ulis, France). After setting up the spectrophotometer (VARIAN AA 240FS, Agilent Technologies), the emission intensity was measured for all the standards and samples with the software spectra 5.1 PRO. The calcium concentrations in the samples were determined according to a calibration curve reflecting absorbance vs. calcium, magnesium, and

potassium concentrations. Calcium concentration levels were then evaluated in the oral, gastric, and intestinal phases according to dilution factors.

2.2. Static in Vitro Gastrointestinal Digestion of the Milk Matrices

The milk matrices were digested according to the INFOGEST harmonized static digestion protocol setup by Minekus et al. [10] but with some modifications in the concentration of pancreatin to better adapt it to the studied matrices (refer to Section 3.1.). Briefly, the milk matrices were digested in a single reactor at 37 °C under agitation. The first three steps of the adult gastrointestinal digestion were simulated: the oral phase, the gastric phase, and the intestinal phase. After rehydration in water at 10% total nitrogen content for all matrices, 8 mL of the matrix (or 8 mL of water for blank digestions) was mixed with an equivalent volume of simulated salivary fluid (SSF) for 2 min without amylase. Then, the mixture was diluted by half by the addition of a solution of simulated gastric fluid (SGF) and pepsin was added (2000 U.mL⁻¹). The mixture was incubated for 120 min. Digestion samples of 2 mL were collected at different time points (30, 60, 90, and 120 min). The pH of the collected samples was raised to 7, and the samples were then heated at 90 °C for 10 min. After 2 h of gastric digestion, the pH was adjusted to 7 and the intestinal phase was carried out by adding the same volume (20 mL) of simulated intestinal fluid (SIF) to the gastric phase. Porcine pancreatin (trypsin activity of 27.3 U.mL⁻¹) was added at the beginning of the intestinal phase. Pepsin and trypsin activities were measured using the methods described in the INFOGEST protocol. No bile was added due to the absence of lipids in the matrices. As in the gastric phase, samples of intestinal digests were collected at different time points (30, 60, 90, and 120 min) and heated at 90 °C for 10 min. Each matrix was digested 3 times to obtain biological replicates. The samples were all diluted to obtain a uniform concentration of 9.375 mg.mL⁻¹ in the gastric and intestinal phases for analytical comparisons.

2.3. Biochemical Characterization

2.3.1. Peptide Concentration Determination

The peptides present in the sample were quantified using the Folin–Ciocalteu (FC) reagent (ref F9252, Sigma–Aldrich). Briefly, 200 µL of extracted peptides were added to 500 µL of sodium carbonate solution (500 mM) and to 100 µL of FC reagent. After incubation of the samples at a temperature of 37 °C for 30 min in the dark, the peptide amount was determined by measuring the optical density at 750 nm (OD₇₅₀). A peptide digest standard (Peptide digest assay standard, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) was used to set up the standard curve.

2.3.2. Quantification of Free Amino Acids

The free amino acids were quantified for all replicates at the end of the gastric and intestinal phases. After precipitation of the samples in sulfosalicylic acid, the pH was decreased to 2.2. The amino acids were then separated by ion exchange chromatography and assayed using the ninhydrin method published by Bidlingmeyer et al. [14]. The detection of free amino acids was performed at 570 nm.

2.4. Peptide Molecular Weight Profiles

The molecular weight profiles of the matrices were obtained by size exclusion chromatography (SEC) based on fast protein liquid chromatography (FPLC) using a Superdex Peptide 10/300 GL column (10 × 300 – 310 mm, 13 μm, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) coupled to an AKTA Purifier Protein Purification System (GE Healthcare). Twenty-five μL of the sample were injected under isocratic elution conditions with a 30% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solvent at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹ for 60 min. Absorbance was monitored at 214 nm. The column was calibrated using internal standard peptides (cytochrome C, 12,400 Da; aprotinin, 6500 Da; vitamin B12, 1355 Da; and glutathione 307.3 Da) and albumin to determine the column dead volume. The peptide molecular weight distribution was obtained using the relationship between Log of molecular weight of standard peptides and the elution volume. Six molecular weight (Da) ranges were determined, two corresponding to high molecular weight peptides/proteins (30,000 < molecular weight (MW) < 10,000 and 10,000 < MW < 4000), two corresponding to intermediary molecular weight peptides (4000 < MW < 2000 and 2000 < MW < 700), and two corresponding to low molecular weight peptides (700 < MW < 300 and 300 < MW < 30). Peptide content estimation was then expressed as a percentage of the total profile area and referred to as area under the curve (AUC).

2.5. Gel Electrophoresis

Protein hydrolysis with different quantities of pancreatin was analyzed in the intestinal phase by SDS-PAGE following the Laemmli method [15]. Briefly, a 12.5% polyacrylamide resolving gel and a 4% stacking gel were used. The phase samples were diluted (1:2) in Laemmli buffer containing β-mercaptoethanol and sodium dodecyl sulfate (SDS) and then heated at 95 °C for 10 min. Fifteen μL of the samples as well as 10 μL of a solution of molecular weight markers (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were deposited on the gel. The migration of peptides and proteins was performed for one hour in a base buffer containing Tris (30.3 g.L⁻¹), glycine (144 g.L⁻¹), and SDS (10 g.L⁻¹), pH 8.3. A voltage of 100 V was applied during the first 10 min and then raised to 200 V until the end of migration. Thereafter, the gels were stained with colloidal Coomassie Blue.

2.6. Peptide Identification by HPLC-ESI-qTOF-MS/MS and Database Search

Digestion samples collected at the end of the gastric and intestinal phases were first purified in order to remove remaining salts and sugars by adding 2 mL of the samples to a C₁₈ solid phase extraction (SPE) with Bond Elut C₁₈ 1000 mg minicolumns (Agilent Technologies). The C₁₈-retained peptides were then eluted with 3 mL of 80% (v/v) acetonitrile (ACN), 20% (v/v) water, and 0.1% (v/v) TFA. The C₁₈-retained peptide fractions were dried by centrifugal evaporation (miVac Centrifugal Vacuum Concentrators, Gene Vac, Ipswich, UK) for 3 h at 40 °C and stored in the dark at room temperature until further analysis.

The dried peptides were dissolved in 100 µL H₂O and 0.1% TFA, submitted to 3 vortex/sonication cycles (20 s/20 s), and centrifuged for 10 min at 9300 × g. Ten µL of supernatants were collected for separation and identification of peptides by peptidomics approach. Two distinct quality control (QC) samples corresponding to equivolume mixtures of the matrix triplicates at the end of the gastric and intestinal phases were also injected at the beginning, the middle, and the end of the HPLC–MS/MS analysis session (one HPLC–MS/MS session for 18 gastric samples + 3 gastric QCs and one for the 18 intestinal samples + 3 intestinal QCs). All HPLC–MS/MS analyses were performed in triplicate. Peptides of supernatants and QCs were separated by chromatography on an ACQUITY HPLC system (Waters, Manchester, UK) using a C₁₈ Kinetex column (150 × 4.6 mm, 2.6 µm, 100 Å, Phenomenex, Le Pecq, France) by running a discontinuous linear gradient of ACN containing 0.1% formic acid (FA) (5–15% ACN over 30 min, 15–30% ACN over 60 min, 30–50% ACN over 10 min, and 50–95% ACN over 10 min) at a flow rate of 500 µL·min⁻¹. The HPLC eluent was then directly electrosprayed at the end of the column at a voltage of 3 kV, using a desolvation gas (N₂) at a flow of 600 L·h⁻¹, a nebulizer gas flow of 2.5 bar, and a temperature of 300 °C. The HPLC was coupled to a SYNAPT–G2–Si mass spectrometer (Waters) previously calibrated using a sodium formate solution. Mass spectrometry measurements were made in sensitivity- and positive-mode using the proprietary MassLynx software (version 4.1, Waters). MS and MS/MS analyses were performed in a data-dependent analysis (DDA) mode, and mass data were collected in the measurement range of 50 to 1700 m/z using lock mass correction with 556.632 m/z, corresponding to simply charged leucine enkephalin. A maximum of 10 precursor ions with an intensity threshold of 10,000 counts was selected to be fragmented by collision-induced dissociation (CID) at an energy collision of 8 V to 9 V for low molecular weight ions and at a range of 40 V to 90 V for high molecular weight ions.

Database searches were performed on PEAKS studio v8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) using the UniProt database restricted to the *Bos taurus* organism (downloaded on the 10th of September, 2018—6002 entries). A mass tolerance of 35 ppm, 3 missing cleavage sites, no specific enzyme, and an MS/MS tolerance of 0.2 Da were allowed. Variable methionine oxidation was also considered. The relevance of peptide identities was considered according to the identification generated by PEAKS studio 8.5 ($p < 0.05$) and a false discovery rate (FDR) strictly inferior to 1%. No minimum length of amino acid sequence for peptide identification was set, and the peptides identified by de novo approach were not considered.

2.7. Bioinformatics Retreatment of Chromatographic and Mass Spectrometry Data

Raw data of all HPLC–MS/MS runs were imported to Progenesis QI for proteomics 4.1 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) using the following parameters: (i) data alignment was automatically managed by Progenesis software using one of all QC runs as reference; (ii) a slight manual alignment was performed to optimize the HPLC–MS/MS run alignment; and (iii) all runs were used for peak picking with a peak picking low limit of 5000, a maximum charge of +5, and retention times defined between 5 to 50 min (iv) when chromatographic peak width was not limited and (v) when data normalization was automatically performed for the statistical analysis in main components (principal component analysis (PCA)). Relative quantification of proteins was based on the 3 most abundant N-peptides of a given protein. Mass data were exported from Progenesis 4.1 to PEAKS Studio 8.5 for peptide identifications (performed as aforementioned), and these latter were reimported to Progenesis 4.1. The criteria selection for statistical comparison of mass signals of HPLC–MS/MS runs were set as follow: (i) intensity threshold = minimum of 1^{E5} and (ii) an ANOVA p -value < 0.005 .

2.8. Amino Acid Occurrence

In order to envision peptide abundance, the data were exported from PEAKS Studio 8.5 to a home-built Microsoft Excel heat map giving the amino acid occurrences in each major protein at the end of the gastric and intestinal phases. These were then exported to GraphPad Prism 8.2.1. The results were generated for the most abundant proteins in the casein and whey fractions of milk: alpha-S1 casein and beta-lactoglobulin [16].

2.9. Multi Block-Based Statistical Analysis

Grouped data analyses were performed with in-house routines and the SAISIR© Toolbox [17] using MatLab 7.6.0 (The MathWorks, Natick, USA). As the chemical and mass spectrometry data were sorted into tables with a different number of variables, a multi-block analysis known as common components and specific weight analysis (CCSWA) developed by Qannari et al. was implemented [18]. This method calculates a space that is common to all the tables referred to as common components (CC) space. After normalization of the tables, an iterative process is used to estimate the contribution (called salience) of each table in the construction of each common component. Significant differences in the values of saliences reflect that tables did not contribute equally to the construction of the common component in question.

3. Results

3.1. Optimization of the INFOGEST Digestion Protocol for Dairy Protein Matrices

The optimization of the static in vitro digestion for dairy protein was performed with the whey protein isolate (W matrix) as whey proteins are more resistant to gastrointestinal enzymes [18]. Peptide molecular weight profiles and distributions of intestinal samples of the W matrix digested with increasing quantities of pancreatin are presented in Figure 1. According to the INFOGEST protocol, a concentration of 100 U.mL⁻¹ of pancreatin was required (based on trypsin activity) to digest the matrices. This would have been equal to 732.8 mg of pancreatin (or 18.32 mg.mL⁻¹ of digest), giving us an enzyme/substrate (w/w) ratio close to 1 (732.8 mg of pancreatin for 800 mg of protein). The molecular weight profiles showed that, for quantities of 7.7 mg and 20 mg of pancreatin, the shape of the profile differed greatly compared to quantities of 200 mg and above. Indeed, when smaller quantities of pancreatin were used, the extent of the curve was wider as a great proportion of intermediary and high molecular weight peptides was generated, whereas a majority of smaller peptides between 30 and 3000 Da was generated for quantities of 200 mg and above (Figure 1A). In accordance with the molecular weight profiles, quantities of 7.7 mg and 20 mg of pancreatin generated half of the peptide population comprised between 2 kDa and 10 kDa, whereas the other half was made up of low molecular weights between 2 and 0.3 kDa. With the addition of 40 mg of pancreatin, the proportions were similar to those of 7.7 and 20 mg of pancreatin but with a slightly higher proportion of lower molecular weights. From 80 to 200 mg of pancreatin, the proportion of molecular weights were comparable, as molecular weights between 0.3 and 2 kDa made up the majority of the peptide population. Starting from 300 mg of pancreatin and despite the majority of the peptide population being constituted of low molecular weights, an increase in the proportion of molecular weights between 2 and 4 kDa was observed. This increase was presumably due to the contribution of pancreatin peptides generated by autolysis (Figure 1B). These results are in accordance with the SDS-PAGE profiles obtained during intestinal digestion of the W matrix and intestinal blank digestion at different concentrations of pancreatin. A band most likely representing β -lactoglobulin was present at the end of the intestinal phase when small quantities of pancreatin were used (Figure 2). This band was still present at the end of 2-h digestion when quantities of 7.7, 20, and 40 mg were used. However, when a quantity of 80 mg of pancreatin was used, this protein band disappeared at the end of the intestinal phase and only completely disappear after 120 min of the intestinal digestion when a quantity of 200 mg of pancreatin was used. When higher amounts going from 300 mg to 732.8 mg were tested, the same result was observed: the band disappearing 120 min into intestinal digestion. Moreover, a band at 25 kDa, presumably representing residual β -casein, was still present at the end of the intestinal phase when quantities inferior to 200 mg of pancreatin were added. The assumption that this band represented β -casein not only was based on the protein size but also was later confirmed with the protein

identification results obtained by LC–MS/MS (Supplementary Table S1). It can thus be argued that, despite the extraction process used to obtain the W matrix, residues of casein were still present. Thus, the residual casein bands started to disappear at the end of the intestinal phase when amounts equal or superior to 200 mg were added. The blank digestions further prove that the identified protein at 15 kDa is β -lactoglobulin as the band corresponding to its size is no longer present in the absence of the W matrix. Finally, the blank digestions lead to the conclusion that the bands observed around 50 kDa correspond to enzymes present in pancreatin. Moreover, the intensity of the bands inferior to 15 kDa increases starting from 400 mg of pancreatin, which can be attributed to its autolysis. Taken all together, the results described above and discussed later led us to perform the digestion of the dairy protein matrices with 200 mg of pancreatin, which equals to a trypsin activity of 23.7 U.mL⁻¹ of intestinal digest.

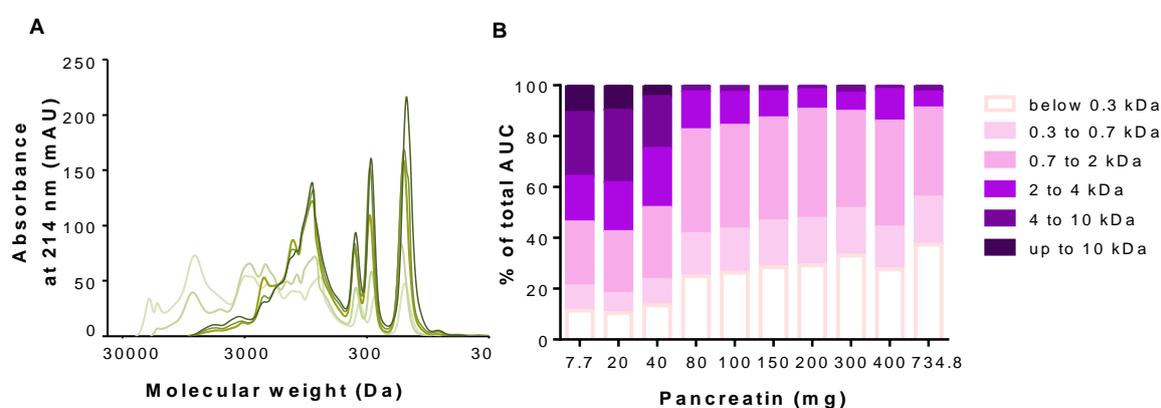


Figure 1. Molecular weight profiles and distributions of W intestinal digests: optimization of the static gastrointestinal digestion (SGID). (A) Peptide profiles were obtained by size exclusion chromatography–fast protein liquid chromatography (SEC–FPLC): 7.7, 20, 200, 400, and 734.8 mg of pancreatin (light to dark green curves). (B) The apparent molecular weight distribution of peptides, expressed in percentage of total area under the curve (AUC), was calculated from the linear regression relationship, which correlates the Log of known molecular weight standard peptides and the elution volume.

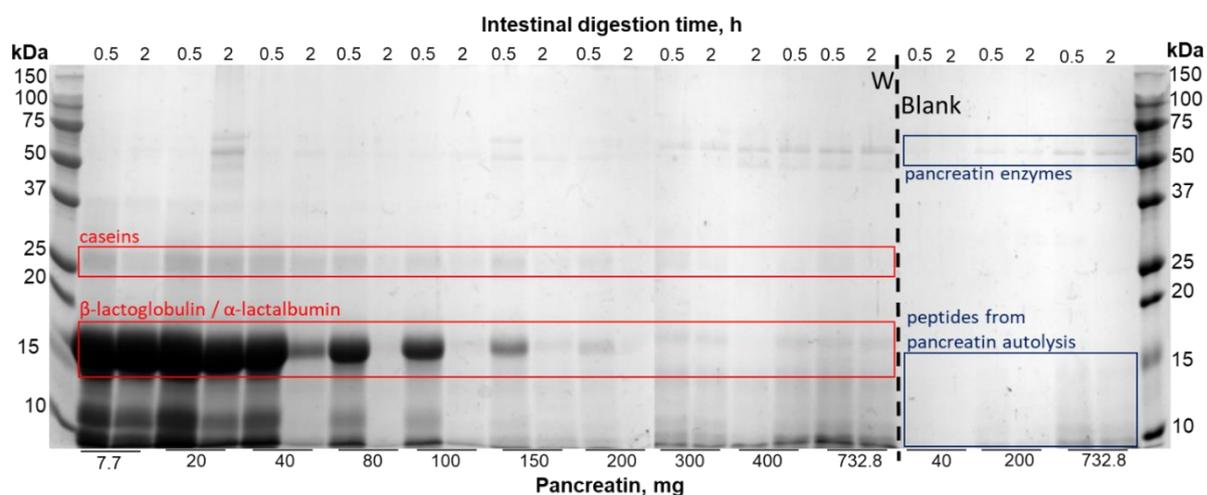


Figure 2. SDS-PAGE profiles of the native whey matrix (W) and of blank digestion (Blank) intestinal digests at the beginning (0.5 h) and end of the intestinal phase (2 h).

3.2. Comparison of the Gastric and Intestinal Digests of the Dairy Matrices with Size Exclusion Chromatography

Figure 3 presents the results obtained by the size-exclusion chromatography of the different final gastric and intestinal digests. The molecular profiles clearly show the impact of the composition of the matrices on hydrolysis. Indeed, in the gastric phase, the curve shape varied significantly between C1, CW, and W. The shape of W was flatter than that of CW and C1 and exhibited mainly low peaks, the highest one being for high molecular weights. C1 generated lower molecular weights than W, and CW exhibited the highest peaks and stretched from high to low molecular weights. At the end of the intestinal phase, some differences between all matrices persisted, but all the curves displayed a shift towards lower molecular weights due to hydrolysis (Figure 3A). The molecular profiles of all gastric and intestinal digests are presented in Figure S1 (Supplementary Figure S1). At the end of the gastric phase, the molecular weight distribution for all size categories was shown to be very similar for the matrices C2, C2_{low Ca²⁺}, and C3 which are all concentrated in caseins. Indeed, they all exhibited a majority of peptides comprised between 4 to 10 kDa. C1 and CW differed from the other casein matrices as they had a significantly higher percentage of molecular weights comprised between 0.3 to 0.7 kDa. W stood out from the other matrices since the distribution of its molecular weights was more homogeneous in terms of size categories. Indeed, it had a significantly higher proportion of peptides weighing above 10 kDa and a significantly lower proportion of intermediate molecular weights. By the end of the intestinal phase, the repartition of molecular weights was still very similar for C2, C2_{low Ca²⁺}, and C3 as they were significantly different in most size categories compared to C1, CW, and W. W was very different particularly for the size categories below 0.3 kDa, 0.3 to 0.7 kDa, and 0.7 to 2 kDa which represented a higher percentage

of the AUC compared to all the casein matrices (C1, C2, C2_{low Ca2+}, and C3). As for CW, the distribution of the molecular weights was again intermediary between that of the casein-enriched matrices and the W matrix. (Figure 3B).

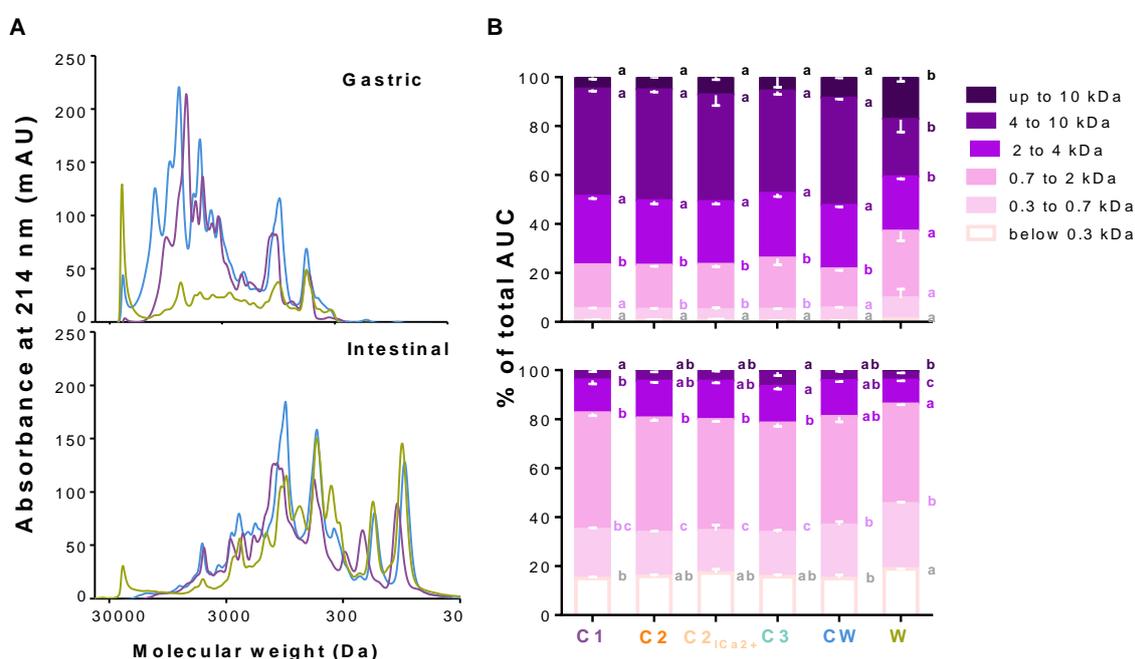


Figure 3. Molecular weight profiles and distributions of the gastric and intestinal digests of the different matrices: **(A)** peptide profiles were obtained by size-exclusion chromatography–fast protein liquid chromatography (SEC–FPLC): W (green curve), CW (dark blue curve), C1 (purple curve), 2-h gastric digests (top), and 2-h intestinal digests (bottom). **(B)** The mean (\pm SD) molecular weight distribution of peptides in the different compartment of the SGID, expressed in percentage of total area under the curve (AUC), was calculated from the linear regression relationship which correlates the Log of known molecular weight standard peptides and the elution volume. In a same molecular weight range, bars with different lowercase letters are significantly different ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

3.3. HPLC–MS/MS Analysis of the Gastric and Intestinal Peptidomes of the Dairy Matrices

Triplicates of concentrated and desalted peptide samples of each 2-h gastric and 2-h intestinal digest and the associated QCs were subjected to an HPLC–MS/MS analysis (see the Materials and Methods section). The average numbers of MS scans and MS/MS scans were 4272 ± 684 and $12,479 \pm 1216$ for the 2-h gastric digestion HPLC–MS/MS runs, respectively, while the average number of MS scans and MS/MS scans were 3638 ± 1121 and $13,713 \pm 2253$ for the gastric–QC HPLC–MS/MS runs, respectively. In the same manner, the average number of MS scans and MS/MS scans were 5821 ± 491 and 9831 ± 872 for the 2-h intestinal digestion HPLC–MS/MS runs, respectively, while the average number of MS scans and MS/MS scans were 5964 ± 953 and 9567 ± 1686 for the

intestinal–QC HPLC–MS/MS runs, respectively. The statistical values related to MS and MS/MS scan numbers demonstrated that no significant differences existed among the mass spectrometry data collected for all the matrix replicates after the gastric phase ($p = 0.53$, one-way ANOVA) and after the intestinal phase ($p = 0.82$, one-way ANOVA). HPLC–MS/MS raw data were imported in PEAKS Studio 8.5 software for peptide identifications using *Bos taurus*-restricted UniProt database. From each triplicate of HPLC–MS/MS runs, around 815 ± 109 peptides were identified (FDR < 1%) from all 2-h gastric digests. The average number of identified peptides from the triplicate of gastric–QC HPLC–MS/MS runs was 900 ± 140 . Concomitantly, from each triplicate of HPLC–MS/MS runs, around 211 ± 46 peptides were identified (FDR < 1%) from all 2-h intestinal digests except for the C2 and C2 low Ca^{2+} , where the number of identified peptides were close to 328 ± 68 . The average number of identified peptides from the triplicate of intestinal–QC HPLC–MS/MS runs was 287 ± 3 . It should be noted that the peptides composed of 2 to 5 amino acids were not considered due to the lack of certainty in their identifications.

From all identified peptides, the amino acid occurrences were calculated as described in the Materials and Methods section (Figure 4A,B), where the y-axis represents the amino acid occurrence and the x-axis represents the amino acid sequence of the protein. Figure 4A,B illustrates the amino acid occurrence obtained, following the different phases of digestion, for alpha–S1 casein and beta–lactoglobulin. Briefly, high amino acid occurrence at a given location on the protein backbone signifies that a substantial number of peptides of suitable size have been identified with certainty following the bioinformatics retreatment of HPLC–MS/MS raw data by PEAKS Studio 8.5. The substantial numbers of peptides identified at a same location of the protein backbone result in a high amino acid occurrence. In other words, high amino acid occurrence signifies that the concerned protein regions are resistant to enzyme action during the digestion phase. Whatever the digestion phase, the amino acid occurrence patterns of alpha–S1 casein (Figure 4A) were similar for all milk matrices with the same resistance regions but with different amino acid occurrences. Indeed, the matrix W is shown to have the lowest number of occurrences as it contains trace amounts of alpha S1 casein. When it comes to beta–lactoglobulin (Figure 4B), the same regions of sensitivity or resistance to the static gastrointestinal digestion (SGID) are again observed between all matrices, with the W matrix having the highest occurrence as it has the highest levels of beta–lactoglobulin.

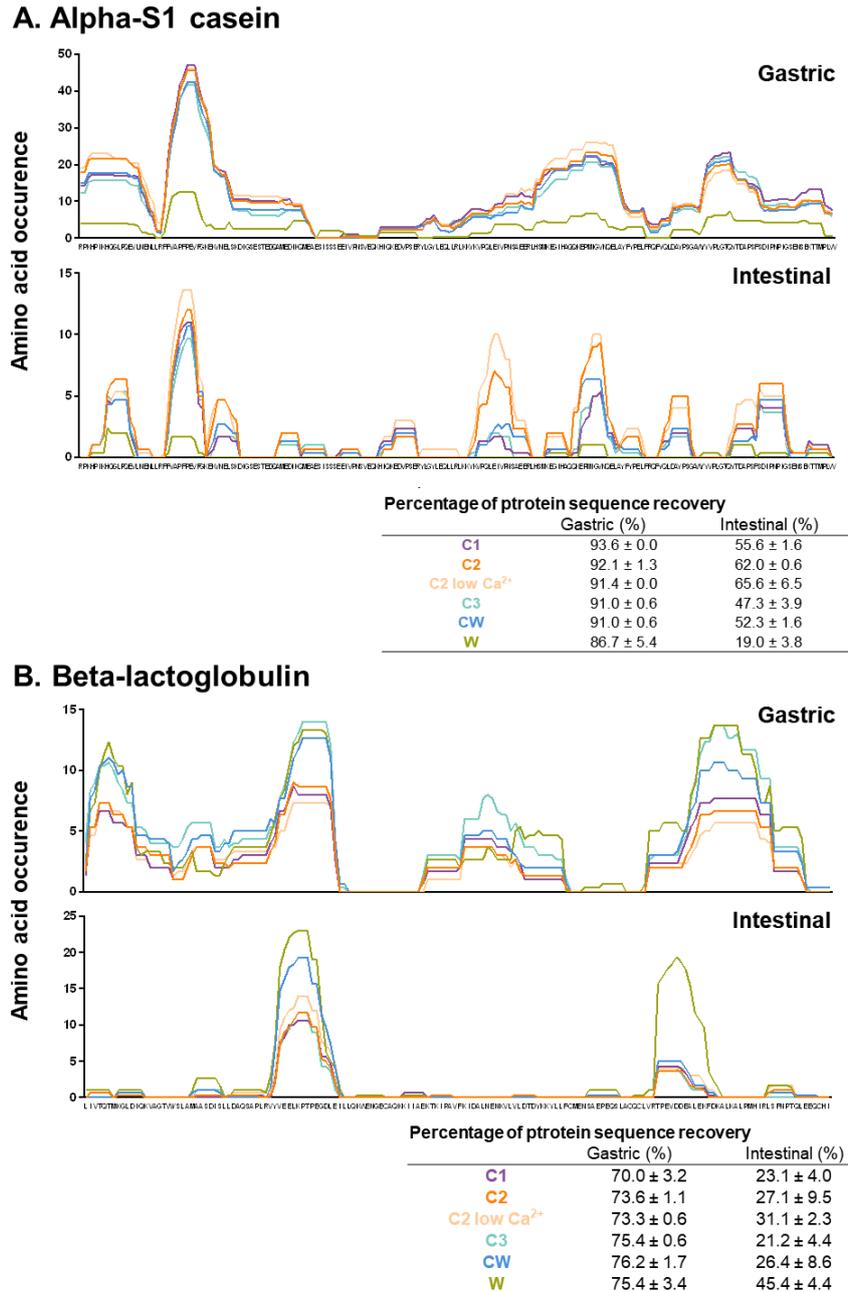


Figure 4. Peptide patterns of the different matrices at the end of the gastric and intestinal phases of the SGID: (A) alpha-S1 casein and (B) beta-lactoglobulin, with the x-axis representing the amino acid sequence of the different proteins and the y-axis representing amino acid occurrence.

HPLC-MS/MS raw data were also imported in Progenesis QI for proteomics (V4.1) software. HPLC-MS/MS run data were automatically and manually aligned, peak picking of mass signals was constrained (see the Materials and Methods section), data normalization was automatically performed, and the statistical comparison of mass signals was conducted using the filtering criteria described in the Materials and Methods section. Subsequently, PEAKS Studio-based peptide identities were reimported in Progenesis QI.

Among the 2366 peak picked mass signals detected in all mingled dairy protein gastric digests which have an intensity threshold $> 1^E5$, 482 peptide ions displayed a quantitative difference with an ANOVA p -value inferior to 0.005, and finally, 47 identified peptide ions had both thresholds and displayed a positive false discovery rate (q-value) between $3.63 \times 10^{-11} < \text{q-value} < 0.0033$ and a power value between 0.964 and 0.9995 (Figure 5A). In the same manner, among the 13,919 peak picked mass signals detected in all mingled dairy protein intestinal digests, 579 peptide ions had an intensity threshold $> 1^E5$, 120 peptide ions displayed an ANOVA p -value inferior to 0.005, and finally, 63 identified peptide ions had both thresholds and displayed a positive false discovery rate (q-value) between $3.92 \times 10^{-12} < \text{q-value} < 0.00142$ and a power value between 0.950 and 0.9995 (Figure 5B). These latter values demonstrate that only the most instance and different peptide ions (#47 and #63) were selected for PCA. The first five dimensions of the PCA (Figure 5A,B) explain 93.49% and 95.40% of previously filtered mass signal variances of 2-h gastric and 2-h intestinal digests, respectively. Figure 5A displays the PCA generated using the first two dimensions (PC1 = 76.06% and PC2 = 10.05%) of filtered peptides identified at the end of the gastric phase where 3 distinct clusters appear. The more distant the groups, the more different they are in terms of peptide population. Color circles were hand-marked for clarity and have no statistical relevance. The central cluster gathered the 2-h gastric digests of all matrices (CW, C1, C2, and C2 low Ca^{2+}) except for matrix C3, which formed the bottom cluster, and matrix W, on the right-hand side, which was largely distant from the two other clusters. All grey and red numbers depicted correspond to the identified peptides displaying a mass signal intensity $> 1^E5$ and an ANOVA p -value < 0.005 . Figure 5B represents the PCA generated using the first two dimensions (PC1 = 77.37% and PC2 = 10.17%) at the end of the intestinal phase where 4 clusters appear. A central cluster composed of matrices CW, C1, and C2 was close but distinguishable to the cluster formed by matrix C3 on PC2. The third cluster corresponded to the matrix C2 low Ca^{2+} (top right region of the PCA), while the fourth cluster corresponded to matrix W and, again, was largely distant from all other clusters.

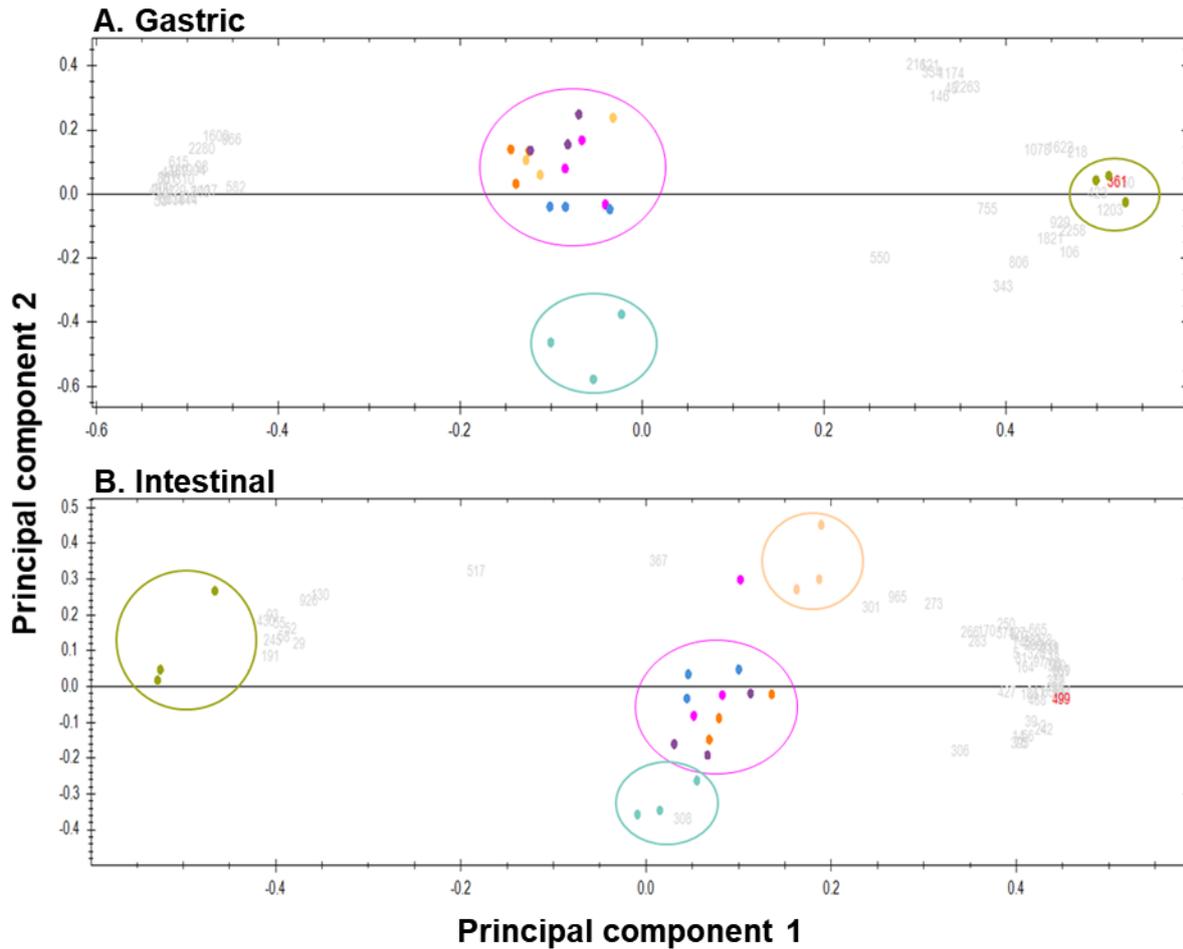


Figure 5. Principal component analysis of the most relevant identified peptides detected at the end of the gastric (A) and intestinal (B) phases of the SGID: grey and red numbers correspond to the identified peptide displaying a mass signal intensity $> 10^5$ and an ANOVA p -value < 0.005 . Color circles are hand-marked to facilitate understanding and have no statistical significance. C1, purple; C2, dark orange; C2 low Ca^{2+} , light orange; C3, light blue; CW, dark blue; W, green; and QC, pink.

Among the 63 identified peptides of interest in intestinal digests, 12 amino acid sequences were redundant. Table S1 gathers the 51 unique peptide sequences which are statistically distinguishable by their abundance among the 6 milk matrices. A unique peptide is defined as a peptide, irrespective of its length, that exists only in one protein of a proteome of interest despite the fact that this peptide may appear more than once in the same protein [19]. Table S1 is ordered according to (i) the matrix nature, (ii) the milk main proteins, (iii) the ANOVA p -value, and (iv) the maximum fold changed measured.

The C2 matrix contained, in highest mean normalized abundance, only 2 peptides from α -S1 casein and β -casein, which corresponded to the α -S1 phosphorylated

peptide EIVPNpSAEE and a sodium adduct of the Cas- β peptide VYPPFGPIPn (not considered), while the C3 matrix contained, in highest mean normalized abundance, 4 peptides from the same proteins but without posttranslational modifications. The CW matrix contained 6 peptides, in highest mean normalized abundance, from α -lactalbumin, α -S1 casein, β -casein, and β -lactoglobulin (one of them was a sodium adduct peptide (β -casein: VVPPFLQPEV (E+21.98))). The W matrix contained 10 highest mean normalized abundance peptides mainly, as expected, from β -lactoglobulin and α -lactalbumin but 2 peptides from β -casein. Only one β -lactoglobulin peptide displayed a mass increment, suggesting that Gly is replaced by Val. Interestingly, the C2 low Ca²⁺ matrix contained, in highest mean normalized abundance, 29 peptides which came only from the 4 casein proteins (α -S1, α -S2, β -, and κ -casein). Among these 29 highest mean normalized abundance peptides, 4 were posttranslationally modified, 3 of which were serine-phosphorylated peptides (NMAINPpSKEN, KTVDMEpSTEV, and LNVPGEIVEpSL).

3.4. Statistical Comparisons of the Gastric and the Intestinal Digests of the Dairy Matrices

To compare the milk matrices from every analytical standpoint, a multi-block analysis was applied (see the Materials and Methods section). Figure 6 represents the common components analysis between the matrices at the end of the gastric phase after incorporation of all the chemical data (AUC of SEC, peptide concentration, free amino acid concentration, and calcium concentrations) in one table (Table 2) and the amino acid occurrences for each main protein in respective tables.

Table 2. Chemical data of the different matrices at the end of the gastric phase and at the end of the intestinal phase.

Milk matrices	Phase	MW > 10 kDa	4 < MW < 10 kDa	2 < MW < 4 kDa	0.7 < MW < 2 kDa	0.3 < MW < 0.7 kDa	MW < 3 kDa	Peptide concentration (mg.ml ⁻¹)	Calcium concentration (mg.ml ⁻¹)	Total free AA concentration (mg/100g of product)
C1	Gastric	4.9 ± 0.7	43.9 ± 0.7	27.9 ± 0.8	18.0 ± 0.0	4.7 ± 0.4	0.6 ± 0.2	0.24	0.7	<LD
C2		5.7 ± 0.5	45.4 ± 0.7	26.3 ± 1.1	18.0 ± 0.3	4.3 ± 0.6	0.7 ± 0.2	0.33 ± 0.04	0.6	<LD
C2 low Ca ²⁺		7.6 ± 1.3	43.6 ± 4.2	25.6 ± 0.9	18.5 ± 0.9	4.3 ± 1.0	0.6 ± 0.5	0.16	0.4	<LD
C3		5.8 ± 4.1	41.9 ± 1.3	26.4 ± 1.1	20.9 ± 2.7	4.5 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.26	0.8	<LD
CW		8.8 ± 0.4	43.9 ± 0.3	25.9 ± 0.4	16.0 ± 0.5	5.1 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.28 ± 0.01	0.5	<LD
W		17.9 ± 2.2	23.5 ± 5.1	22.1 ± 0.6	27.3 ± 3.8	8.5 ± 3.6	1.2 ± 0.0	0.16	0.1	<LD
C1	Intestinal	0.6 ± 0.1	4.0 ± 0.5	13.4 ± 1.5	47.5 ± 1.1	20.0 ± 0.8	14.9 ± 0.6	0.33	0.5	171.2 ± 32.7
C2		0.7 ± 0.1	4.3 ± 0.3	15.0 ± 0.3	46.7 ± 1.0	17.8 ± 0.6	15.9 ± 0.6	0.41 ± 0.02	0.4	189.0 ± 55.3
C2 low Ca ²⁺		0.7 ± 0.1	4.5 ± 0.3	15.6 ± 0.6	45.4 ± 0.7	17.2 ± 2.4	17.2 ± 1.5	0.36	0.3	233.3 ± 4.5
C3		0.9 ± 0.2	6.0 ± 1.4	14.9 ± 0.9	44.6 ± 1.2	18.0 ± 0.9	15.7 ± 0.8	0.32	0.5	148.0 ± 27.5
CW		0.7 ± 0.3	4.2 ± 0.2	14.6 ± 0.3	44.3 ± 2.1	21.7 ± 1.5	15.0 ± 1.5	0.34 ± 0.01	0.3	253.3 ± 15.0
W		1.1 ± 0.1	3.3 ± 0.2	9.7 ± 0.2	40.6 ± 0.1	26.6 ± 0.7	18.8 ± 0.0	0.36	0.1	277.3 ± 4.6

Results are presented as mean ± SD when samples were analyzed as triplicates and as a single value when only one replicate was used for analysis. MW: molecular weight; LD: Limit of detection, AA: amino acid.

The score plots in Figure 6A show that the W matrix can be distinguished from the others on the CC1 axis, as it is situated far away from the other matrices. This is linked to the results in Figure 4, where the W matrix is shown to have the lowest occurrences in amino acids obtained from α -s₁ casein. The saliences (Figure 6B) show that CC1 was built based on information present in all the data tables, with the chemical data table contributing the most while β -lactoglobulin contributed the least. On the CC2 axis, most of the matrices seem to be grouped, except for the C3 and CW matrices, which are separated from the rest of the samples. The saliences show that CC2 was built exclusively based on information present in the β -lactoglobulin table.

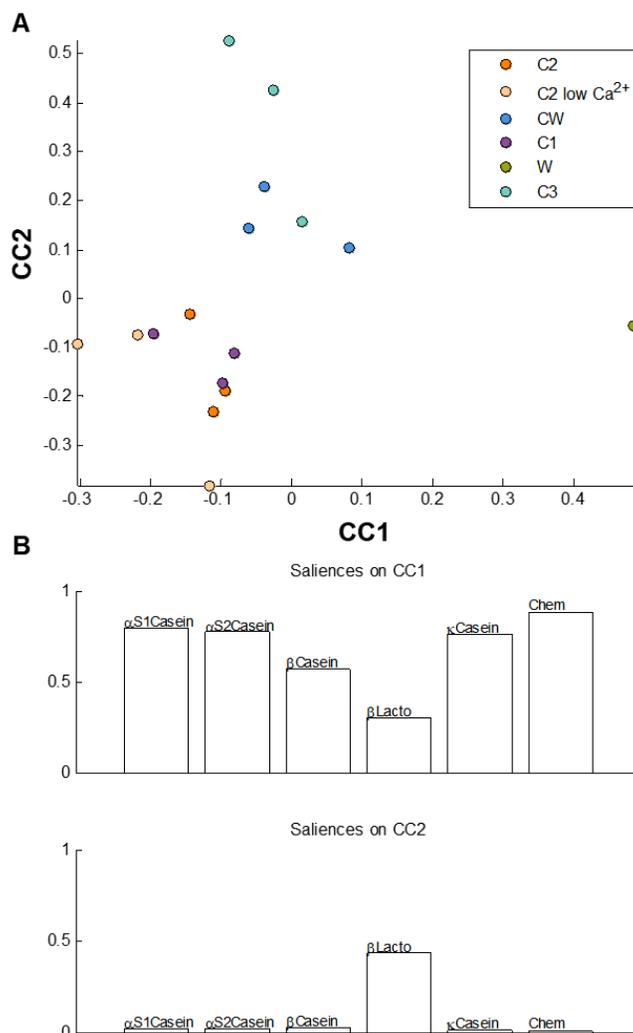


Figure 6. Common component and specific weight analysis (CCSWA) of the different matrices at the end of the gastric phase for all three replicates of the matrices: (A) CC1 vs. CC2 score plot and (B) saliences on CC1 and CC2.

Figure 7 represents the common components analysis between the matrices at the end of the intestinal phase after incorporation of all the chemical data (AUC of SEC, peptide concentration, free amino acid concentration, and calcium concentrations) in Table 2 and the amino acid occurrences for each main protein in respective tables.

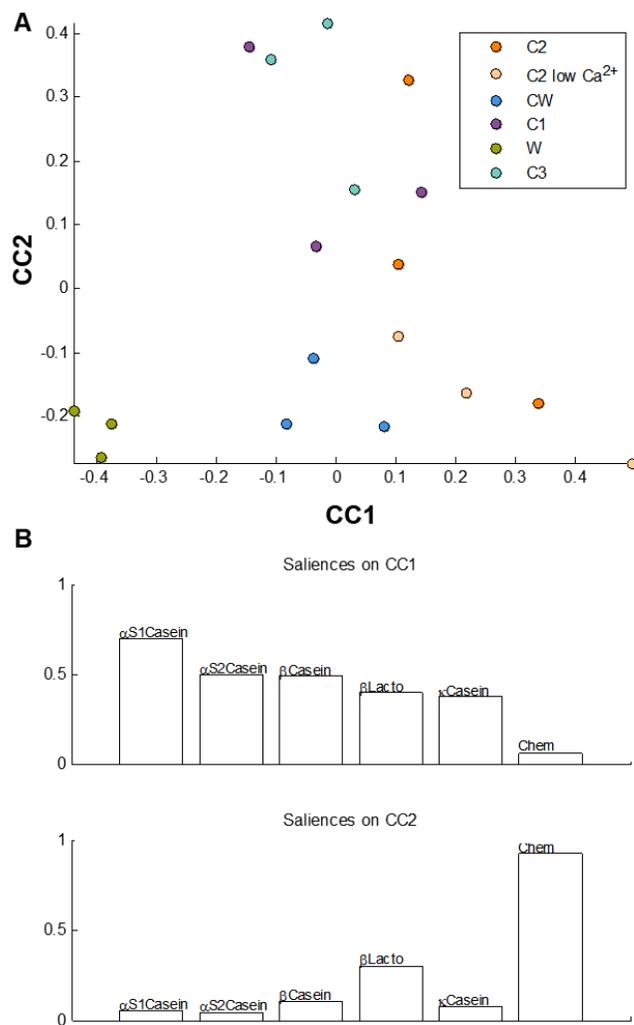


Figure 7. CCSWA of the different matrices at the end of the intestinal phase for all three replicates of the matrices: **(A)** CC1 vs. CC2 scores plot and **(B)** saliences on CC1 and CC2.

Figure 7A shows that the W matrix can be distinguished from the other matrices on the CC1 axis. The saliences show that information from each protein table was used to construct CC1; hence, it can be concluded that the W matrix was different from the other matrices because of variables present in all of the protein data tables. On the CC2 axis, the

replicates are more scattered. Indeed, CC2 shows regrouping of the C1, C2, and C3 replicates on one hand and another regrouping of the CW, W, and C2 low Ca²⁺ replicates on the other hand. The salience graph (Figure 7B) shows that CC2 was built based on information present in the chemical data table.

4. Discussion

4.1. Optimization of the Harmonized Protocol

According to the protocol by Minekus et al. [10], a quantity of 732.8 mg of pancreatin (trypsin activity of 100 U.mL⁻¹) was required to digest our liquid protein matrices. The protocol by Minekus et al. was developed as a general standardized practical static digestion method to improve comparability between different laboratories but can be modified to better suit certain research questions when necessary [10]. Since the protocol established by Minekus et al. targets a wide range of food matrices and since the matrices in our study were simple and only contained proteins, the quantity of pancreatin was optimized. To the best of our knowledge, no comparability study of the digestion profiles obtained with different concentrations of pancreatin was conducted. Despite being more cost effective, decreasing the quantity of pancreatin needed would allow for a clearer identification of peptidomes in mass spectrometry, which is a common analytical tool used for in vitro digestion studies. The matrix W was chosen to optimize the gastric in vitro digestion protocol because whey proteins are known to be resistant to gastric digestion, whereas caseins are sensitive to hydrolysis. Indeed, this is due to the globular tertiary structure of whey proteins, which makes them partly resistant to hydrolysis by pepsin, whereas caseins are easily hydrolyzed thanks to their flexible conformation [20] due to the low presence of secondary and tertiary structures. Taken collectively, the results obtained in the optimization protocol (Figures 1 and 2) show that protein hydrolysis varies with increasing quantities of pancreatin until it reaches a point where it stabilizes at 200 mg (trypsin activity of 27.3 U.mL⁻¹). Differences rise again, notably starting from 400 mg, and this seems to be due to pancreatin autolysis. Indeed, it has already been shown in previous studies [19,20] that autolysis of proteases present in pancreatin occurred and varied according to in vitro digestion conditions. This is especially true at high concentrations of pancreatin where the activity of certain proteases such as trypsin is lost more quickly than at lower concentrations in the presence of substrate [21]. This autolysis mechanism thus explains the increase in the proportion of peptides harboring apparent molecular weights comprised between 4 and 10 kDa (Figure 1) and the increase in band intensities for molecular weights inferior to 15 kDa (Figure 2) for quantities of pancreatin superior to 400 mg. Since the peptide profile (Figure 1A) of the W matrix was very similar to that obtained with the INFOGEST protocol's initial concentration of 732.8 mg of pancreatin and as the SDS-PAGE profile showed complete

hydrolysis of the matrix at the end of the intestinal phase, a quantity of 200 mg of pancreatin was chosen to conduct the rest of our experiments.

4.2. Comparisons of the Molecular Weights and Resistance Zones Between the Milk Matrices

All of the casein matrices were very similar in terms of peptide molecular weight profile and distribution of gastric and intestinal digests despite the different industrial processes applied to the matrices and the variability of calcium concentrations (Figure 3; data not shown for all casein matrices). Hydrolysis for all matrices (C1, C2, C2 low Ca²⁺, and C3) starts at the gastric phase, and the increase in lower molecular weights occurs at the end of the intestinal phase. Indeed, at this scale, the only visible differences are shown when the casein matrices were compared to the W and CW matrices. The W matrix behaved in a very distinctive way during gastric digestion due to its overall composition in whey proteins. As previously mentioned, whey proteins are resistant to gastric digestion, and our results go hand in hand with those of previous studies [11–13]. In these two studies, skim milk powder was digested according to the INFOGEST harmonized gastric digestion protocol. In both studies, the protein β -lactoglobulin was resistant to gastric digestion by pepsin and was still intact at the end of the gastric phase. The hydrolysis of α -lactalbumin and the caseins had however started during the gastric phase, and the generation of molecular weights of the W matrix at this stage can therefore be attributed to that. The CW matrix displayed a curve between that of the casein matrices and the W matrix. This outcome was expected as CW contained both whey proteins and caseins. By the end of the intestinal phase, the differences observed at the gastric level were strongly attenuated as all proteins were completely hydrolyzed. These results are again in accordance with those obtained in the studies by Egger et al.

The peptide patterns of the matrices illustrated in Figure 4A show that protein hydrolysis of α -S1-casein starts at the gastric phase and that a lot of large peptides are generated starting from the 16th amino acid of the protein sequence. At the end of the intestinal phase, a variety of smaller-sized peptides are generated, showing that α -S1 casein exhibits a multitude of small resistant zones. When looking at β -lactoglobulin (Figure 4B), the peptide pattern obtained during digestion is different. Indeed, the protein is very lightly hydrolyzed by the end of the gastric phase. However, by the end of the intestinal phase, the protein seems to be more hydrolyzed than α -s1-casein as it exhibits fewer resistant zones, and β -lactoglobulin seems to majorly exhibit peptides made up of 16 amino acids. All matrices seem to follow the same pattern, and the differences observed in amino acid occurrences is due to the distribution of each protein in every matrix. In a study where human volunteers ingested whey proteins and caseins, whey generated a majority of 9–15 amino acid residue peptides while caseins generated mainly 6–9 amino acid residue peptides [22]. This is similar to what is observed in our study as α -s1-casein generates smaller amino acid residue peptides than β -lactoglobulin. An important

limitation to note in this study is that only peptides that were between 500 to 2500 Da were identified in this context. Indeed, one of the limits of LC–MS/MS when studying digestive peptidomes is that small-sized and large-sized peptides often go undetected [23]. Therefore, some existing differences in peptide patterns regarding very small and large peptides might not be perceived in this study.

4.3. Peptide Identification During Digestion of the Matrices

Using a more resolutive and sensitive analytical method (HPLC–MS/MS and bioinformatics), more differences are observed between the matrices in terms of peptides detected. Indeed, at the end of the gastric phase (Figure 5A), three distinct clusters are distinguished: one consisting of the W matrix replicates, one formed of the C3 replicates, and a third one regrouping the rest of the matrices. As previously explained above, the W matrix is different from the other matrices as it is constituted mainly of native whey proteins. Thus, the generated peptides are vastly different from those obtained after hydrolysis of casein matrices. However, two unique peptides generated from beta–casein were identified. This shows that trace amounts of caseins are still present in the W matrix, even after the filtration process. The CW matrix appears in the same cluster as the casein matrices as it contains a higher proportion of caseins than whey proteins and thus generated more casein-based peptides. Moreover, a result that is observed here and that was not highlighted before is that the C3 matrix stands out. This means that the peptides generated at the gastric phase are different due to the enzymatic process that was applied in order to reticulate the caseins present in the C3 matrix. Reticulated casein micelles have a different structure than native casein micelles as they are smaller in size and have a smoother surface [24]. Moreover, it could be hypothesized that the cross-linkage induced between the caseins may either prevent the enzymes from accessing the same sites as the ones of the native casein micelles due to steric hindrance or that the enzymatic process restricted the cleavage reactional mechanism. At the end of the intestinal phase, besides the W and C3 matrices which were already distinguished from the other matrices, the C2 low Ca²⁺ replicates also form a cluster of their own. This matrix has the lowest concentration in calcium, and as previously mentioned, caseins interact together to form micelles. These interactions are allowed through the action of calcium ions that form linkages between the casein molecules either as colloidal calcium phosphate by binding directly to caseins [2,25,26]. It has already been established that removing colloidal calcium phosphate by processes such as acidification or a calcium chelator could disintegrate the micelle into smaller particles [27]. Disintegration of the casein micelle could thus play a role in generating peptides different from those of the other casein matrices. Moreover, the C2 low Ca²⁺ matrix generated the greatest number of highest mean normalized abundance peptide sequences from all four casein types, whereas C2 and C3 only generated two and three highest mean normalized abundance peptides

respectively. The β -casein was the biggest precursor of peptides, generating a total of 23 highest mean normalized abundance peptides. These results are in accordance with those performed in the human trial by Boutrou et al., where β -casein was the largest precursor of peptides [28].

When all the chemical data were compiled with the amino acid occurrences for each protein matrix at the end of each phase (Figures 6 and 7), the same global tendencies were observed, with some slight differences. At the end of the gastric phase (Figure 6A), the W and C3 matrices were different from the other matrices, a trend which was already noted in the mass spectrometry data in Figure 5. This again can be explained by the fact that the W matrix contained a different category of proteins (native whey proteins) and that the C3 matrix was modified enzymatically. However, the CCSWA analysis further showed a distinction of the CW matrix which was not observed in the mass spectrometry data (Figure 5). At the end of the intestinal phase (Figure 7A), the W matrix was clearly distinct from the other matrices on the CC1 axis. However, the replicates of all the other matrices were very dispersed on the CC2 axis. As the chemical data were used to construct the CC2 axis, it can be said that differences at the levels of the molecular weights generated, peptide concentrations, calcium concentrations, and total free amino acid concentrations were noted between all the matrices. It can thus be hypothesized that the industrial process has an effect not only on protein distribution but also on the protein conformation, which leads to differences during *in vitro* digestion. Moreover, the additional differences that arose between the matrices with the CCSWA analysis highlight the utility of this method, which can serve as a complementary analysis that allows for the comparison of data with different number of variables.

5. Conclusions

This study first demonstrated that, although the INFOGEST protocol is the method of choice when simulating static *in vitro* digestion, some adjustments can still be necessary when trying to resolve certain research questions, in this case, the quantity of pancreatin needed to be optimized in order to better adapt it to our simple milk protein matrices. By digesting our milk matrices with pancreatin harboring a trypsin activity of 27.3 U.mL^{-1} instead of 100 U.mL^{-1} , similar results were observed in terms of peptide molecular weight and electrophoretic profiles. These profiles also showed the importance of pancreatin autolysis when large amounts of pancreatin were used. This study is also further proof that whey proteins are resistant to gastric digestion but are then very hydrolyzed by the end of the intestinal phase. The industrial process affected not only the protein distribution of the matrices but also most likely the protein structure. Indeed, this study showed that, by reticulating the caseins or by reducing their calcium concentrations, statistical qualitative and quantitative differences arose in terms of peptides generated in

the gastric and intestinal compartments, which could lead to differences in term of amino acid bioavailability and peptide bioactivities. These results shall be confirmed in vivo or by using a dynamic in vitro digestion method to confirm the relevance of using the quick and less costly static method to characterize the effect of industrial processes on milk matrices' digestion.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Molecular weight profiles of gastric and intestinal digests., Table S1: Exhaustive list of identified peptides.

Author contributions: conceptualization, B.C., C.F., A.B. (Audrey Boulier), A.B. (Alain Baniel), and R.R.; methodology, N.A, B.D., B.C., C.F., and D.J–R.B.; formal analysis, N.A., B.D., B.C., D.J–R.B., and C.F.; investigation, N.A. and B.D.; data curation, N.A., B.D., C.F., and B.D.; writing—original draft preparation, N.A.; writing—review and editing, B.C., B.D., A.B. (Audrey Boulier), A.B. (Alain Baniel), R.R., C.F., and D.J–R.B.; supervision, B.C., C.F., A.B. (Audrey Boulier), R.R., and A.B. (Alain Baniel); all authors have read and agreed to the submitted version of the manuscript.

Funding: This work has been carried out in the framework of the joint laboratory between the Charles Viollette institute and the Ingredia project (Allinpep) funded by the Hauts-de-France region (FEDER) and in the framework of Alibiotech research program, which is financed by European Union, French State, and the French Region of Hauts-de-France. The HPLC–MS/MS experiments were performed on the REALCAT platform funded by a French governmental subsidy managed by the French National Research Agency (ANR) within the frame of the “Future Investments’ program (ANR–11–EQPX–0037)”.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] P. F. Fox, « Milk proteins as food ingredients », *Int J Dairy Tech*, vol. 54, n° 2, p. 41–55, mai 2001, doi: 10.1046/j.1471–0307.2001.00014.x.
- [2] D. G. Dalgleish et M. Corredig, « The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing », *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 3, p. 449–467, 2012, doi: 10.1146/annurev–food–022811–101214.
- [3] M. Lacroix *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.*, vol. 84, n° 5, p. 1070–1079, nov. 2006, doi: 10.1093/ajcn/84.5.1070.
- [4] S. Mahé *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.*, vol. 63, n° 4, p. 546–552, avr. 1996, doi: 10.1093/ajcn/63.4.546.

- [5] Y. Boirie, M. Dangin, P. Gachon, M. P. Vasson, J. L. Maubois, et B. Beaufrère, « Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 94, n° 26, p. 14930–14935, déc. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.26.14930.
- [6] G. A. A. van Lieshout, T. T. Lambers, M. C. E. Bragt, et K. A. Hettinga, « How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review », *Crit Rev Food Sci Nutr*, p. 1–24, août 2019, doi: 10.1080/10408398.2019.1646703.
- [7] A. E. Ince Coskun, D. Sağlam, P. Venema, E. van der Linden, et E. Scholten, « Preparation, structure and stability of sodium caseinate and gelatin micro-particles », *Food Hydrocolloids*, vol. 45, p. 291–300, mars 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.11.026.
- [8] D. G. Dalgleish, P. A. Spagnuolo, et H. Douglas Goff, « A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy », *International Dairy Journal*, vol. 14, n° 12, p. 1025–1031, déc. 2004, doi: 10.1016/j.idairyj.2004.04.008.
- [9] X. Wang, A. Ye, Q. Lin, J. Han, et H. Singh, « Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model », *Journal of Dairy Science*, vol. 101, n° 8, p. 6842–6852, août 2018, doi: 10.3168/jds.2017-14284.
- [10] M. Minekus *et al.*, « A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus », *Food Funct*, vol. 5, n° 6, p. 1113–1124, juin 2014, doi: 10.1039/c3fo60702j.
- [11] L. Egger *et al.*, « Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion », *Food Research International*, vol. 102, p. 567–574, déc. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.047.
- [12] T. Bohn *et al.*, « Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? », *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 58, n° 13, p. 2239–2261, 2018, doi: 10.1080/10408398.2017.1315362.
- [13] L. Egger *et al.*, « Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data », *Food Research International*, vol. 118, p. 32–39, avr. 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.049.
- [14] B. A. Bidlingmeyer, S. A. Cohen, et T. L. Tarvin, « Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization », *J. Chromatogr.*, vol. 336, n° 1, p. 93–104, déc. 1984, doi: 10.1016/s0378-4347(00)85133-6.
- [15] U. K. Laemmli, « Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 », *Nature*, vol. 227, n° 5259, p. 680–685, août 1970, doi: 10.1038/227680a0.
- [16] D. Vincent, A. Elkins, M. R. Condina, V. Ezernieks, et S. Rochfort, « Quantitation and Identification of Intact Major Milk Proteins for High-Throughput

- LC-ESI-Q-TOF MS Analyses », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 10, p. e0163471, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0163471.
- [17] C. B. Y. Cordella et D. Bertrand, « SAISIR: A new general chemometric toolbox », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 54, p. 75–82, févr. 2014, doi: 10.1016/j.trac.2013.10.009.
- [18] G. Mandalari *et al.*, « In vitro digestibility of β -casein and β -lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation », *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 55, n° 3, p. 372–381, déc. 2009, doi: 10.1016/j.yrtph.2009.08.010.
- [19] Y. Zhao et Y.-H. Lin, « Whole-Cell Protein Identification Using the Concept of Unique Peptides », *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, vol. 8, n° 1, p. 33–41, mars 2010, doi: 10.1016/S1672-0229(10)60004-6.
- [20] O. Ménard *et al.*, « Gastric Emptying and Dynamic In Vitro Digestion of Drinkable Yogurts: Effect of Viscosity and Composition », *Nutrients*, vol. 10, n° 9, sept. 2018, doi: 10.3390/nu10091308.
- [21] Y. Qiao, M. Gumpertz, et T. V. Kempen, « Stability of a Pancreatic Enzyme Cocktail During in Vitro Protein Digestibility Assays », *Journal of Food Biochemistry*, vol. 29, n° 2, p. 205–220, 2005, doi: 10.1111/j.1745-4514.2005.00003.x.
- [22] R. J. C. Stewart, H. Morton, J. Coad, et K. C. Pedley, « In vitro digestion for assessing micronutrient bioavailability: the importance of digestion duration », *Int J Food Sci Nutr*, vol. 70, n° 1, p. 71–77, févr. 2019, doi: 10.1080/09637486.2018.1481200.
- [23] R. Boutrou *et al.*, « Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans », *Am J Clin Nutr*, vol. 97, n° 6, p. 1314–1323, juin 2013, doi: 10.3945/ajcn.112.055202.
- [24] M. De Cicco, G. Mamone, L. Di Stasio, P. Ferranti, F. Addeo, et G. Picariello, « Hidden “Digestome”: Current Analytical Approaches Provide Incomplete Peptide Inventories of Food Digests », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, n° 27, p. 7775–7782, juill. 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b02342.
- [25] C. Broyard et F. Gaucheron, « Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge », *Dairy Sci. & Technol.*, vol. 95, n° 6, p. 831–862, nov. 2015, doi: 10.1007/s13594-015-0220-y.
- [26] C. Holt, « Structure and stability of bovine casein micelles », *Adv. Protein Chem.*, vol. 43, p. 63–151, 1992, doi: 10.1016/s0065-3233(08)60554-9.
- [27] A. Tsioulpas, M. J. Lewis, et A. S. Grandison, « Effect of minerals on casein micelle stability of cows’ milk », *J. Dairy Res.*, vol. 74, n° 2, p. 167–173, mai 2007, doi: 10.1017/S0022029906002330.
- [28] P. F. Fox et A. Brodtkorb, « The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance », *International Dairy Journal*, vol. 18, n° 7, p. 677–684, juill. 2008, doi: 10.1016/j.idairyj.2008.03.002.

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials

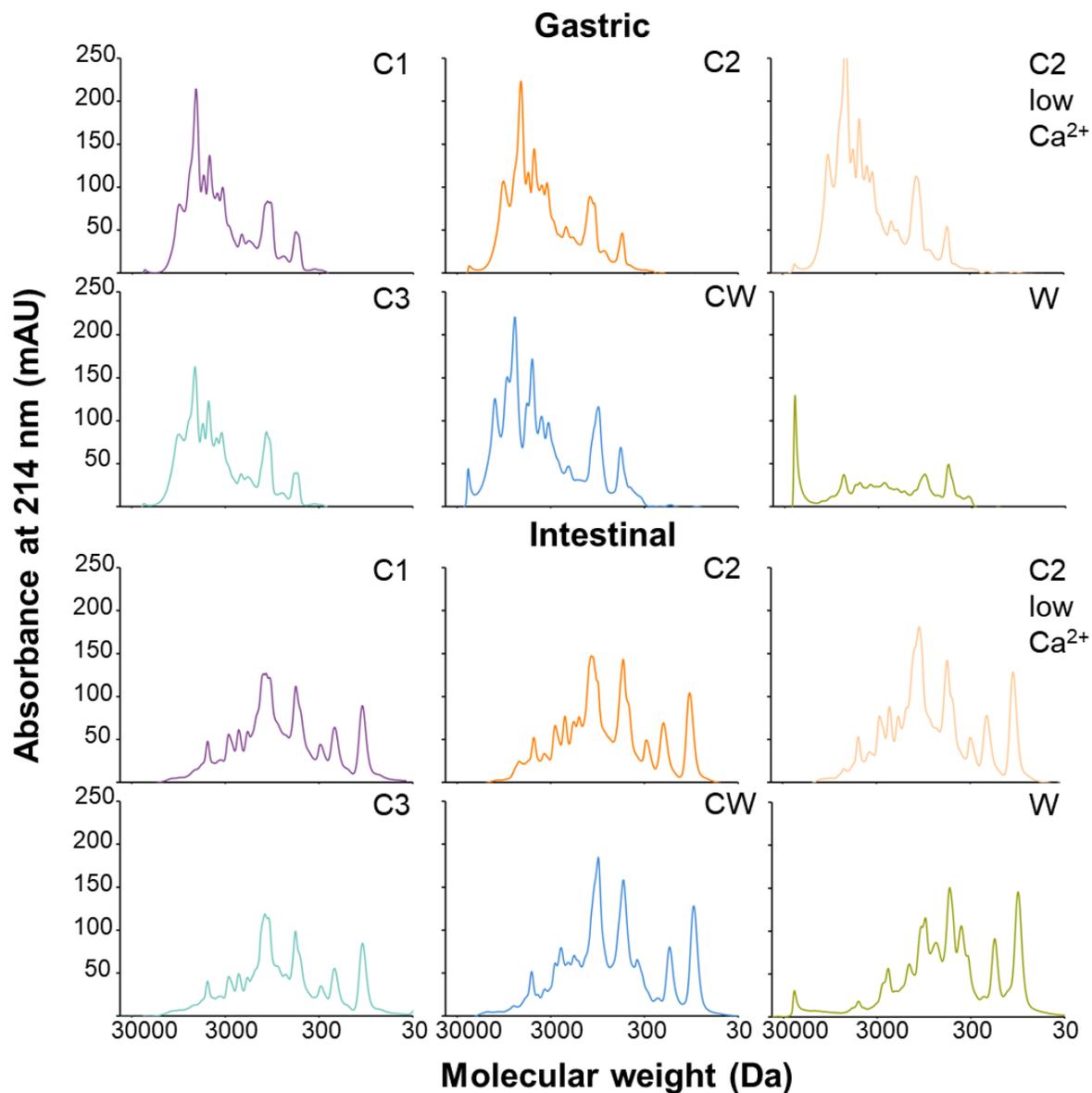


Figure S1. Molecular weight profiles of gastric and intestinal digests. Peptide profiles were obtained by size exclusion chromatography-fast protein liquid chromatography (SEC-FPLC): 2h-gastric digests (top) and 2h-intestinal digests (bottom).

Supplementary Table S1: exhaustive list of identified peptides in intestinal digests displaying a mass signal intensity > to 1E5 and an ANOVA p-value < to 0.005. Amino acid sequences are classified according to i) the dairy matrices where the identified peptides are present in highest mean quantity, ii) the milk proteins, iii) the ANOVA p-value and iv) the maximum fold change.

#	Highest mean quantity in matrix ^a	Protein (OS=Bos taurus)	Amino acid Sequences	Mass ^b	Variable modifications ([position] AA + mass increment) ^c	Anova	Maximum CV ^d	Max fold change	Numbers of deconvoluted peptide ions ^e	Deconvoluted charges ^f	Best Identification Score ^g
1	C2	Alpha-S1-casein	EIVPNSAEE	1066.4266	[6] S+79.97	9.49E-09	38.7	31.9	#491,#3051	1,2	31.2
2	C2	Beta-casein	VYFPFGPIP	1121.5527	[10] N+21.98	3.97E-03	80.5	20.2	#480,#308	1,2	29.32
3	C3	Alpha-S1-casein	YTDAPS	652.2709		1.77E-06	64.6	44	#76	1	41.87
4	C3	Alpha-S1-casein	EIVPN	570.3018		3.96E-06	42.5	12.1	#14	1	32.88
5	C3	Beta-casein	HQPHQLPPT	1150.588		2.67E-08	33.2	14.1	#1023,#242,#5366	1,2,3	58.83
6	C3	Beta-casein	PLPPT	523.3002		1.48E-07	48.1	17.8	#395	1	29.73
7	CW	Alpha-lactalbumin	FLDDDLTDDI	1180.5239		8.75E-04	68.8	5.8	#301,#1689	1,2	47.77
8	CW	Alpha-S1-casein	YFYPE	717.3022		4.45E-08	52.7	32.2	#56	1	30.35
9	CW	Alpha-S1-casein	EDVPSE	674.2768		2.23E-05	115.9	52.2	#186	1	41.79
10	CW	Beta-casein	VVPPFLQPEV	1145.6113	[9] E+21.98	4.16E-05	95.0	81.2	#904,#306	1,2	28.34
11	CW	Beta-casein	ELEEL	631.3076		9.80E-05	82.1	17.2	#427	1	29.23
12	CW	Beta-lactoglobulin	VEELKPTPEGDL	1454.7196		1.34E-07	47.6	22.8	#5084,#367	1,2	74.05
13	W	Alpha-lactalbumin	GGVSLPE	657.3353		3.50E-09	39.8	28.2	#58	1	35.55
14	W	Beta-casein	NVPGEI	627.3226		3.30E-04	56.8	3.8	#29	1	31.97
15	W	Beta-casein	LNVPGIVE	968.5156		1.11E-02	39.1	3	#172,#2012	1,2	33.93
16	W	Beta-lactoglobulin	TPEVDDEALEK	1244.5802		8.81E-10	60.7	134.2	#926,#130	1,2	82.85
17	W	Beta-lactoglobulin	VEELKPTPE	1040.539		1.20E-09	86.1	215.7	#93	2	63.84
18	W	Beta-lactoglobulin	DAQSAPL	700.3414		1.97E-08	81.6	59.8	#52	1	36.95
19	W	Beta-lactoglobulin	YVEELKPTPE	1203.6055		5.19E-11	20.8	16	#1257,#245	1,2	58.18
20	W	Beta-lactoglobulin	VEELKPTPEG	1111.5784	[10] G+14.02	9.87E-11	43.2	43.4	#1947,#430	1,2	42.73
21	W	Beta-lactoglobulin	GLDIQ	544.2873		1.27E-07	48.4	26.7	#55	1	28.82
22	W	Beta-lactoglobulin	GDEI	545.2705		1.44E-06	59.4	24.7	#191	1	30.65
23	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	AMEDIK	705.3353		6.72E-06	85.2	36.5	#289,#320	1,2	33.93
24	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	FVAPFPEV	904.4693		5.11E-12	34.7	71.6	#25,#499	1,2	30.27
25	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	FVAPFPEVFG	1108.5616		7.55E-08	87.4	377.7	#219,#689	1,2	41.79
26	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	VAPFPEV	757.4008		1.40E-07	37.0	8.5	#2,#1088	1,2	41.1
27	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	FVAPFPE	805.3987		1.23E-05	59.8	25.7	#97,#1405	1,2	32.49
28	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	LEIVPN	683.3861		7.32E-04	96.2	15	#31	1	38.32
29	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S1-casein	KVPQLEIVPN	1135.6616		5.94E-03	146.6	90.4	#803,#220	1,2	31.53
30	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S2-casein	KITVDDK	817.4532		1.04E-09	58.4	101.5	#656,#358	1,2	44.09
31	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S2-casein	NMAINPSKEN	1196.4913	[7] S+79.97	3.64E-06	59.4	16.1	#488	2	30.53
32	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S2-casein	KTVDMESTEV	1217.4923	[7] S+79.97	5.81E-04	55.9	4	#2589,#965	1,2	56.68
33	C2 low Ca ²⁺	Alpha-S2-casein	NAVPIIT	613.3427		2.80E-03	45.3	2.9	#266	1	33.12
34	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	VLPVPQ	651.3954		1.41E-12	24.8	45.2	#3,#1106	1,2	35.74
35	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	MHQPHQLPPT	1281.6329		5.56E-12	24.3	45.9	#544,#88	1,2	74.89
36	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	AVPVPQ	673.3415		2.31E-09	49.9	46.8	#4,#3093	1,2	42.82
37	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	QEPVLPV	837.4591		2.45E-08	72.5	159.3	#72,#3394	1,2	34.28
38	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	VVPPFLQPE	1024.5579		7.80E-08	42.9	27.4	#161,#407	1,2	35.06
39	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	NIPPLTQTPVVVPPF	2184.2239		1.01E-07	116.5	2475.2	#263,#665	2,3	37.11
40	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	VVPPFLQPEV	1123.6302		1.31E-07	100.1	240.7	#48,#131	1,2	48.73
41	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	NIPPLTQTPV	1078.5999		3.35E-07	46.0	11.3	#700	2	38.14
42	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	PVVVPPFLQPEVMG	1507.8162		3.64E-07	55.1	28.7	#2214,#278	1,2	60.63
43	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	YQEPV	634.2975		1.29E-06	45.9	13.1	#39	1	32.44
44	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	SLQNPPLTQTPV	1503.835		1.96E-06	87.0	66.3	#590,#282	1,2	42.64
45	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	LVPFPGPIP	1212.6536		5.07E-05	49.4	9.6	#250	2	75.92
46	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	RGPFPI	685.3875		5.10E-05	62.6	10.9	#745	2	34.64
47	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	VYFPFGPIP	1099.5727		5.53E-04	49.3	3	#5,#127	1,2	69.13
48	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	LNVPGIVEESL	1248.6032	[10] S+79.97	7.46E-04	65.8	8.8	#170,#273	1,2	54.03
49	C2 low Ca ²⁺	Beta-casein	QEPVLPV	820.4328	[1] Q-17.03	4.35E-03	122.3	78.2	#283	1	29.7
50	C2 low Ca ²⁺	Kappa-casein	YQKPV	761.4063		1.02E-07	47.9	16.1	#211,#164	1,2	29.88
51	C2 low Ca ²⁺	Kappa-casein	YQKQKVA	832.4441		5.58E-03	33.7	2.8	#574,#517	1,2	34.54

^a: matrix in which mentioned peptides have the highest mean quantity compared to all matrices; ^b: monoisotopic mass; ^c: between bracket = number of the amino acid (AA) + mass increment; ^d: maximum coefficient of variation; ^e: gathering of peptide ions having the same amino acid sequence; ^f: charge state of gathered peptide ions; ^g: best identification score re-imported from Peaks Studio v8.5.

4.2. Un niveau d'adiposité modéré contrebalance les modifications du métabolisme protéique associées au vieillissement chez le rat

(Article 2)

Résumé

Objectifs

Les paramètres physiologiques tels que l'adiposité et l'âge sont susceptibles d'influencer la digestion et l'utilisation des protéines dans les tissus. L'objectif de cette étude était donc d'évaluer les effets combinés de l'âge et de l'adiposité sur la digestibilité de la caséine et son utilisation postprandiale chez le rat.

Matériel et méthodes

Des rats Wistar de 1 mois (n = 15) et 10 mois (n = 15) à leur arrivée ont été nourris *ad libitum* avec un régime standard ou de type « Western » afin d'obtenir des rats d'adiposité normale et élevée. Quatre groupes ont ainsi été constitués (n = 7/8) : 2 mois-adiposité normale, 2 mois-adiposité élevée, 11 mois-adiposité normale et 11 mois-adiposité élevée. Après l'intervention nutritionnelle de quatre semaines, les rats ont reçu un repas calibré contenant de la caséine marquée au ¹⁵N et ont été euthanasiés 6 h plus tard. Les contenus digestifs ont été collectés pour évaluer les digestibilités des protéines et des acides aminés. Les enrichissements en ¹⁵N ont été mesurés dans le plasma et l'urine pour déterminer la désamination corporelle totale. Le taux de synthèse protéique fractionnaire (FSR) a été déterminé dans différents organes avec une injection intraveineuse d'une dose massive de ¹³C-valine.

Résultats

Aucune différence de poids entre les rats d'un même âge après l'intervention nutritionnelle n'a été observée. Cependant, la composition corporelle a montré une différence significative de l'adiposité, avec une augmentation de 3 % chez les jeunes rats et de 7 % chez les rats d'âge moyen. La digestibilité de la caséine était d'environ 95-96 % selon le groupe et était modérément mais

significativement ($P = 0,04$) augmentée de 1 % chez les rats avec une adiposité élevée. Des effets significatifs de l'âge ($P = 0,006$) et de l'adiposité ($P = 0,002$) ont été observés sur le FSR dans le muscle, l'âge le diminuant, et l'adiposité l'augmentant. Le FSR de la peau a diminué chez les rats d'âge moyen ($P = 0,007$) par rapport aux jeunes rats. Un niveau d'adiposité élevé a contrebalancé l'augmentation de la désamination corporelle totale ($P = 0,030$) qui était associée à un âge plus avancé.

Conclusion

Cette étude a révélé qu'un niveau d'adiposité élevé entraînait une légère augmentation des valeurs de digestibilité des protéines et des acides aminés individuels et semblait compenser les altérations métaboliques postprandiales des protéines observées avec l'âge.

Moderate adiposity levels counteract protein metabolism modifications associated with aging in rats

Authors and institutions

Nathalie Atallah¹²³, Claire Gaudichon¹, Audrey Boulier², Alain Baniel², Dalila Azzout-Marniche¹,
Nadezda Khodorova¹, Catherine Chaumontet¹, Julien Piedcoq¹, Martin Chapelais¹, Juliane Calvez¹

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

²Ingredia S.A. 62033 Arras Cedex, France

³Univ Lille INRAE–ICV, 59000 Lille, 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, AP: atom percent, APE: atom percent excess, Asx: asparagine + aspartate, AT: adipose tissue, CCK: cholecystokinin, EA: elementary analyzer, GC-MS: gas chromatography mass spectrometry, GC-C-IRMS: gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, FSR: fractional synthesis rate, Glx: glutamine + glutamate, N: nitrogen, n.s.: non-significant, PEPT1: Peptide transporter 1, SD: standard deviation, Slc: solute carrier, UHPLC: ultra-high-performance liquid chromatography

Keywords

Casein, digestibility, amino acid, age, adiposity, rat

Abstract

Objective: Physiological parameters such as adiposity and age are likely to influence protein digestion and utilization in the tissues. The aim of this study was thus to evaluate the combined effects of age and adiposity on casein digestibility and its postprandial utilization in rats.

Material and methods: Wistar rats of 1 month (n = 15) and 10 months (n = 15) at their arrival were fed *ad libitum* a standard or Western-type diet to obtain rats of normal and high adiposity levels. Four groups were then constituted (n = 7/8): 2 months-normal adiposity, 2 months-high adiposity, 11 months-normal adiposity and 11 months-high adiposity. After the four-week diet intervention, the rats were given a calibrated meal containing ¹⁵N-labeled casein and were euthanized 6 h later. Digestive contents were collected to assess protein and amino acid digestibilities. ¹⁵N enrichments were measured in plasma and urine to determine total body deamination. Fractional protein synthesis rate (FSR) was determined in different organs using a flooding dose of ¹³C valine.

Results: There was no weight difference between rats of the same age after the diet intervention but there was a difference of 3% body fat in young rats and 7% in middle-aged rats. Digestibility was around 95-96% depending on the group and was moderately but significantly (P = 0.04) increased by 1 % in high adiposity rats. Significant effects of age (P = 0.006) and adiposity (P = 0.002) were observed in the muscle fractional synthesis rate (FSR), with age decreasing it and adiposity increasing it. The FSR in the skin was decreased in middle-aged rats (P = 0.007) compared to young rats. Higher adiposity levels counteracted the increase in total body deamination (P = 0.030) that was associated with older age.

Conclusion: This study revealed that a higher level of adiposity resulted in a slight increase in protein and individual amino acid digestibility values and seemed to compensate for the metabolic postprandial protein alterations observed at older age.

1. Introduction

The importance of determining the quality of a protein has been well emphasized in the past decades, notably through numerous report publications by the FAO since the end of the 1950's (Boye et al., 2012). Protein quality can be defined as a protein's ability to satisfy the metabolic demand for amino acids and nitrogen (WHO et al., 2007). It not only depends on a its composition in amino acids, but is also conditioned by its digestibility value and the bioavailability of its individual amino acids. When defining protein quality, emphasis should be placed on two additional aspects: the characteristics of the food matrix, and the specific demands of the individual consuming the protein source (Millward et al., 2008).

The role of the food matrix on digestibility has already been brought to light, especially when comparing plant protein sources with animal proteins (G. Gilani et al., 2005; Sarwar, 1997). In order to adapt protein intakes to individual needs, factors such as age, health status, physiological status, and energy requirements should also be considered when addressing protein quality (Millward et al., 2008). The precise way that all these factors influence protein digestion have not all been elucidated.

The process of aging has already been associated with modulations to the gastro-intestinal tract, notably with delayed gastric emptying, an increase in colon transit time, and histological changes to the gut (Bhutto & Morley, 2008; Salles, 2007). These changes are also often related to sarcopenia, a reason why it is critical for the elderly to maintain muscle mass by consuming high quality protein (Breen & Phillips, 2011). Moreover, a meta-analysis on nitrogen balance studies revealed that older individuals exhibited a lower efficiency of nitrogen utilization compared to their younger counterparts (Rand et al., 2003). Little data address the effect of aging on protein digestibility, but it was reported to be reduced in old rats compared to young rats especially for the lowest digestible protein sources (G. S. Gilani & Sepehr, 2003). In men, older age was associated with a slower protein digestion and an attenuated release of dietary amino acids into the circulation (Gorissen et al., 2020). In contrast to digestion, muscle anabolism during aging is well documented. For instance, a lower protein synthesis rate was observed in older rats compared to adult rats (Dardevet et al., 2000, 2002) and similar results were obtained in a human

trial (Wall et al., 2015) and cohort study (Markofski et al., 2015). This decrease in muscle anabolism response was associated to insulin resistance in older men (Rasmussen et al., 2006). Hence, it is clear that older age plays a role in the way that proteins are digested and metabolized.

In this context, data associating body composition to protein digestion are scarce. However, studies related to its impact on protein metabolism and the resulting gut adaptations were conducted. In a study comparing nitrogen homeostasis in diet-induced obese mice with mice fed a high-fat diet, it has been shown that obese mice underwent major intestinal adaptations (Do et al., 2014), such as an increased intestinal permeability, a delayed transit time, and an increased amino acid absorption paralleled to an upregulation of some amino acid transporters. Obesity also seems to impair postprandial protein synthesis. Diet-induced obese mice were shown to synthesize less skeletal muscle protein in response to nutrient ingestion (Anderson et al., 2008) and a decline in muscle protein synthetic response to a high protein meal was found in overweight and obese adults compared to lean controls (Beals et al., 2016). The changes that occur at the muscle anabolism level were linked to factors that often develop with obesity, such as insulin resistance, inflammation, and lipotoxicity (Guillet et al., 2012).

Taken collectively, the aforementioned studies suggest distinct effects of age and obesity on protein digestion, but studies linking both factors are rare and mostly focus on their effect on muscle protein metabolism. In mice, an accumulation of adipose tissue in muscles has been shown to accelerate age-induced sarcopenia by increasing proteolysis pathways (Zhu et al., 2019). In men, the combination of old age and obesity may also display a worsening of sarcopenia (Kim et al., 2014). In our study, we aimed to investigate the combined effects of age and adiposity on protein digestibility as well as protein postprandial utilization. We hypothesized that age may decrease protein digestibility and that both age and adiposity may reduce protein utilization and synthesis. For this purpose, we evaluated protein digestion and postprandial utilization after consumption of a ^{15}N -labeled casein meal in middle-aged and young rats with varying levels of adiposity.

2. Materials and methods

Milk protein labeling

The cow milk was labeled by Ingredia. Briefly, two cows were administered 50 g of ¹⁵N ammonium sulfate (99%, (¹⁵NH₄)₂SO₄) that were given in drinking water twice a day for 9 consecutive days. The milk was collected everyday starting from the fourth day and was used to produce the casein matrix Prodiet® 85B (Ingredia, Arras, France) which was obtained by filtration and is constituted of 92% native micellar caseins and 8% of whey proteins.

Experimental protocol

The study was performed in agreement with the European Union directive 2010/63/EU for animal experiments and approved by the ethics committee in animal experiments of INRAe Jouy-en-Josas (Comethea, registration number: 18-14) and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS n°15907-2018061823133762 v1). Thirty male Wistar rats aged 1 month (n = 15) and 10 months (n = 15) at their arrival were purchased from Envigo (Horst, The Netherlands). They were housed in individual cages with wire bottoms to prevent from coprophagia. The temperature was controlled and the rats were subjected to a normal 12h/12h dark-light cycle, then gradually switched to a reversed dark-light cycle (dark period 07:00 to 19:00) during the fourth week of the experiment. The rats had unlimited access to water and commercial laboratory chow for the first 7 days upon their arrival before being administered their respective experimental diets (**Table 1**). The rats were fed *ad libitum* for twenty-eight days (**Figure 1**) either with a standard diet (14% of energy as protein, 75% as carbohydrates, 11% as lipids) or a Western diet (14% of energy as protein, 51% as carbohydrates, 35% as lipids) in order to respectively obtain rats of normal and high adiposity levels. In that sense, four groups were constituted (n = 7/8): 2 months/normal adiposity (2m-na), 2 months/high adiposity (2m-ha), 11 months/normal adiposity (11m-na) and 11 months/high adiposity (11m-ha).

Starting from the sixth week (**Figure 1**), all groups were fed the same diet that corresponds to the standard diet composition but with casein (Prodiet® 85B, Ingredia, Arras, France) as the sole

source of protein (**Table 1**). This 1-week diet standardization was to avoid any effect of the previous diet on postprandial tests. The rats were placed under a special protocol for a period of one week in order to accustom them to consuming a single meal at the beginning of the dark phase, as previously described (Tessier et al., 2020). The protocol consisted of two meals during the day. The first meal was a calibrated meal of 4 g (dry weight) the standard casein diet, and available only for 30 min (from 09:00 to 09:30). The second meal was composed of standard diet given *ad libitum* for 7 h (from 10:30 to 17:30). During all the experimental protocol, the rats were weighed every week day.

Table 1. Composition of the experimental diets

	Standard diet (g/kg)	Western diet (g/kg)	Casein diet (g/kg)
Protein ¹	140	160	140
Starch	622	291	622
Sucrose	100	291	100
Soya bean oil	40	120	40
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
Cellulose	50	50	50
Choline	3	3	3
Protein (%Energy)	14	14	14
Carbohydrates (%Energy)	75	51	75
Lipids (%Energy)	11	35	11

¹Total milk protein for Standard and Western diet and casein Prodiets® 85B for Casein diet

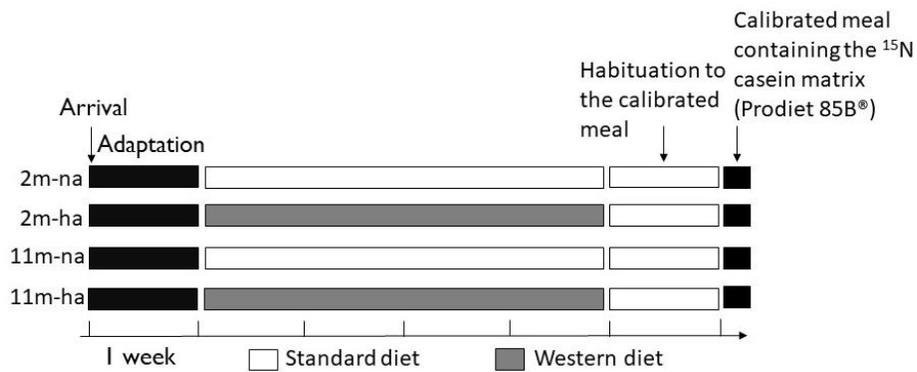


Figure 1. Experimental protocol of the study

The day of euthanasia, the rats consumed a calibrated meal of 4 g containing the ¹⁵N-labeled casein protein. Blood was collected from the tail vein in the fasting state and 1 h, 3 h and 6 h after meal ingestion and plasma was then stored at -20°C after centrifugation. Thirty minutes before euthanasia, the rats were injected in the lateral tail vein with 150 μmol/100 g of body weight of [1-¹³C] valine (Eurisotop, Saint Aubin, France) under gaseous anesthesia. 6 h after meal ingestion, rats were euthanized after cardiac puncture under gaseous anesthesia. The different segments of the gastro-intestinal tract were defined as follows: stomach, small intestine, ileum (the last 10 cm of small intestine before the caecum), caecum and colon. The luminal contents of the segments were rinsed with NaCl (9%) collected, weighed, and stored at -20°C until freeze-drying. Feces were also collected under the cages over the 6 h postprandial period. The mucosae of the duodenum, jejunum and ileum were scraped and stored in TRIzol (Invitrogen), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The gastrocnemius muscle, liver, kidney, and a skin sample were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Urine was retrieved during the 6 h postprandial period by placing an absorbent paper under the cages and by puncturing the bladder after euthanasia. The absorbent paper was rinsed with distilled water, and the urine eluates from each rat were pooled and stored at -20°C. Whole body composition was determined for each rat by dissection and weighing of the main organs and tissues.

Analytical methods

Protein digestibility was assessed by following the ^{15}N recovery in the digestive contents. The nitrogen percentage and ^{15}N enrichment were determined in the digestive samples and the meal by an elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar) coupled with isotopic ratio mass spectrometry (Isoprime; GV instrument) (EA-IRMS). Atropine (Thermo Electron) was used as an elemental standard, and L-glutamic acid (USGS41; Sigma Aldrich) was used as an isotopic standard.

Digestibility of individual amino acids was assessed by following the ^{15}N -amino acid recovery in the digestive contents. To measure isotopic enrichment in individual amino acids, 100 mg of meal and digestive samples were first hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C . Amino acids were then isolated using a hydrogen form resin (Dowex 50WX8 hydrogen form 100–200 mesh; Sigma-Aldrich) and derivatized with ethylchloroformate (Fromentin et al., 2012). ^{15}N -enrichment in amino acids was obtained with GC (GC 6890 N, Agilent Technologies) coupled to an Isoprime isotope ratio mass spectrometer (Isoprime; GV Instruments) via the GC5 Isoprime interface, as previously described (Tessier et al., 2020). To obtain amino acid quantification, 10 mg of meal and digestive samples were hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C with norvaline as internal standard. Calibration standards were composed of an amino acid mixture (Waters), to which norvaline was added. Amino acids and standards were derivatized using the AccQTag Ultra Derivatization Kit (Waters) according to the manufacturer's protocol. Amino acid analyses were conducted on an ultra-performance liquid chromatography system (UHPLC, Acquity H-class, Waters) with a photodiode array detector (260 nm; Waters) and an AccQ-Tag amino acid C18 column (2.1×100 mm; $1.7 \mu\text{m}$ bead size; Waters), as previously described (Tessier et al., 2020).

In vivo protein synthesis rates in the gastrocnemius muscle, liver, kidney and skin were estimated with the [^{13}C]-valine flooding dose method as previously described (Chevalier et al., 2013; Oberli et al., 2015). The proteins were precipitated in the different tissues and their free amino acid and protein-bound fractions were separated. Free amino acids derivatization was conducted using N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide mixed with 1% tert-butyldimethylchlorosilane and acetonitrile (Sigma-Aldrich). [^{13}C]-valine enrichment in free amino

acids was analyzed by gas chromatography (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to mass spectrometry (MS 5973N, Agilent Technologies) (GC-MS) with electron impact ionization and selected ion monitoring (ions mass-to-charge ratio 288 and 289). After hydrolysis, protein-bound amino acids underwent derivatization with propanol and acetyl chloride (Sigma-Aldrich). [¹³C]-valine enrichment in proteins was analyzed by GC (GC 6890 N, Agilent Technologies) coupled to an Isoprime isotope ratio mass spectrometer (Isoprime; GV Instruments). Nitrogen percentage and ¹⁵N-enrichment in freeze-dried protein fraction of organs and tissues was determined by an EA-IRMS.

Total urea was determined in urine and plasma by the Urease-Berthelot method (Urea assay, Randox, Crumlin, UK). Plasma separation of the nitrogen fraction (protein, free amino acid and urea) was achieved as previously described (Bos et al., 2005). ¹⁵N enrichment in plasma fraction and in eluted urine was measured by EA-IRMS with L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) as an isotopic standard. ¹⁵N enrichment in plasma protein was determined after precipitation of protein in plasma collected 0 to 6 h after meal ingestion and dry freezing, by EA-IRMS.

The RNA expression of hormones (cholecystokinin (CCK), secretin) and the main peptide and amino acid transporters in the duodenum, jejunum, and ileum mucosa. The Primer Express software was used to design the primer sequences of genes. Total RNA from these samples were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). Then, the concentration of RNA was determined using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm. Retrotranscription was realized on 0.4 µg of RNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Real time PCR was completed to determine gene expression with the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) on Step One (Applied Biosystems) with 5 ng of cDNA. Gene expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{Gene} - CT_{\beta-actin}$. To detect possible contamination, two negative controls were used: a control without RT and one without RNA. The genes used can be found in **Supplemental Table 1**.

Calculations

Estimation of dietary nitrogen (mmol) in the different digestive content was determined using the following formula:

$$N_{\text{diet}} = N_{\text{tot}} \times \frac{APE_{\text{digesta}}}{APE_{\text{meal}}}$$

Where N_{tot} represents the total amount of nitrogen in the digesta sample (mmol) and APE is the enrichment excess of ^{15}N in the digesta and meal. APE is defined as the enrichment of the sample in atom percent (AP) minus the natural enrichment.

Since amino acids and peptides are mainly absorbed in the duodenum and jejunum parts of the small intestine, the dietary N losses were determined in the most distal part of the intestine (ileum to large intestine including feces). Orofecal nitrogen digestibility (%) was calculated as follows:

$$\text{Orofecal digestibility} = 100 \times \frac{N_{\text{ing}} - (N_{\text{diet ileum}} + N_{\text{diet caecum}} + N_{\text{diet colon+feces}})}{N_{\text{ing}}}$$

Where N_{ing} is the amount of nitrogen ingested by the rats (mmol). Because dietary nitrogen was recovered in the stomach and thus did not enter into the digestive process, in all the calculation, N_{ing} excluded this stomach residual amount. We also used oro-caecal digestibility as a proxy of ileal digestibility in rats (Guillin et al., 2020; Tessier et al., 2020) in order to have sufficient amount of digesta for isotopic enrichment determination. Collection of digesta 6 h after meal intake facilitates a compromise between complete digestion and minimal duration of fermentation of digesta in the caecum. Hence, oro-caecal nitrogen digestibility was calculated similarly as orofecal digestibility (%) without considering losses of dietary nitrogen in the colon + feces.

Estimation of dietary amino acid (mmol) not absorbed in the intestinal tract and recovered in the digesta was determined as follows:

$$AA_{\text{diet}} = AA_{\text{tot}} \times \frac{APE_{\text{digesta}}}{APE_{\text{meal}}}$$

Where AA_{tot} represents the total amount of amino acid in the digesta (mmol) and APE is the enrichment excess of ^{15}N in individual amino acid in the digesta and meal. APE is defined as the enrichment of the sample in atom % (AP) minus the basal enrichment for each amino acid.

The oro-caecal digestibility (%) of each individual amino acid was then determined as follows:

$$\text{AA oro-caecal digestibility} = 100 \times \frac{\text{AA}_{\text{ing}} - \text{AA}_{\text{diet caecum}}}{\text{AA}_{\text{ing}}}$$

Where AA_{ing} is the total amount of ingested amino acid (mmol, corresponding to the amino acid ingested in the meal minus dietary amino acids recovered in the stomach) and $\text{AA}_{\text{diet caecum}}$ is the amount of dietary amino acids (mmol) recovered in the caecum.

The dietary nitrogen recovered in the urea body pool (mmol) was calculated assuming that urea was uniformly distributed throughout the total body water and according to the following formula:

$$N_{\text{diet body urea}} = C_{\text{plasma urea}} \times 2 \times \frac{0.67}{0.92} \times \text{BW} \times \frac{\text{APE}_{\text{urea}}}{\text{APE}_{\text{meal}}}$$

Where $C_{\text{plasma urea}}$ is the concentration of urea in plasma (mmol/L), BW is the body weight of the rat (kg), APE_{urea} is the ^{15}N -enrichment excess of urea in plasma sample, and APE_m is the ^{15}N -enrichment excess of the meal. In the rat, the mean percentages of body water and of water in plasma are assumed to be, respectively, 67 and 92% (Sharp et al., 1998). The dietary nitrogen recovered in the urinary urea (mmol) was calculated assuming that the urinary ^{15}N -enrichment is a proxy of the urinary urea ^{15}N -enrichment and according to the following formula:

$$N_{\text{diet urinary urea}} = C_{\text{urinary urea}} \times V_{\text{urine}} \times 2 \times \frac{\text{APE}_{\text{urine}}}{\text{APE}_{\text{meal}}}$$

Where $C_{\text{urinary urea}}$ is the concentration of urea in urine (mmol/L), V_{urine} is the volume of eluted urine (L), $\text{APE}_{\text{urine}}$ is the ^{15}N -enrichment excess in eluted urine sample, and APE_m is the ^{15}N -enrichment excess of the meal. The total amount of dietary nitrogen transferred to urea ($N_{\text{diet urea total}}$, mmol) is the sum of the dietary nitrogen excreted in urinary urea and the dietary nitrogen recovered in the body urea pool. Dietary nitrogen recovery in the body, urine and total deamination was then expressed as % of nitrogen ingested.

The dietary nitrogen recovered in proteins of organs or plasma (mmol) was calculated as follows:

$$N_{\text{diet}} = N_{\text{tot organ}} \times \frac{APE_{\text{sample}}}{APE_{\text{meal}}}$$

Where $N_{\text{tot organ}}$ is the total nitrogen (mmol) in the organ and APE is the enrichment excess of ^{15}N in the sample and meal. The dietary nitrogen recovered in the different tissues was calculated with respect to organ weight. In plasma proteins, it was calculated assuming that plasma represented 3.5% of BW (Waynforth & Flecknell, 1992). These parameters were then expressed as % of nitrogen ingested.

The fractional protein synthesis rate (FSR, expressed in %/day) in the organs and tissues was calculated as follows:

$$\text{FSR} = \frac{E_{\text{protein-bound Valine}} - E_{\text{basal}}}{E_{\text{free Valine}} \times t_{\text{inc}}} \times 24 \times 60 \times 100$$

Where $E_{\text{free Valine}}$ and $E_{\text{protein-bound Valine}}$ are the $[^{13}\text{C}]$ -valine enrichments in the free and protein-bound amino acids, respectively. E_{basal} is the value of the non-enriched leucine in the same sample, as a surrogate of basal valine enrichment (Boutry et al., 2011). Moreover, t_{inc} is the time of incorporation of $[^{13}\text{C}]$ -valine (in min) between the injection and euthanasia (30 min on average). The factors 24 (h) and 60 (min) were used to calculate the value in % per day (Chevalier et al., 2013). The absolute synthesis rate (ASR, g/d) was calculated by multiplying FSR by protein content ($N \times 6.25$) of each organ or tissue.

Statistical analyses

All results are expressed as mean \pm SD. Student t-tests were performed to determine differences in body composition between groups of the same age. Otherwise, differences between groups were tested using a two-way ANOVA with age and adiposity as factors and Post hoc Bonferroni tests were applied for pairwise comparisons. Graphpad prism 8.2.1 was used for the student t-tests and two-way ANOVA tests. Differences were considered statistically significant with a P-value < 0.05 .

3. Results

Table 2. *Body weight and body composition in rats according to age and adiposity levels*

Age Group	2m			11m		
	2m-na	2m-ha	T-test	11m-na	11m-ha	T-test
Body weight (g)	315.5 ± 18.9	323.2 ± 12.1	<i>n.s.</i>	536.0 ± 32.1	574.1 ± 52.0	<i>n.s.</i>
Total Adiposity (%)	6.5 ± 0.9	9.4 ± 1.5 *	0.0008	13.3 ± 3.9	20.0 ± 1.2 *	0.0004
Total lean mass (%)	73.3 ± 2.3	70.5 ± 7.2	<i>n.s.</i>	72.5 ± 1.5	67.1 ± 1.0	<i>n.s.</i>
Subcutaneous AT (%)	3.5 ± 0.6	3.8 ± 0.4	<i>n.s.</i>	5.8 ± 2.6	9.5 ± 1.1 *	0.0025
Epididymal AT (%)	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.3	<i>n.s.</i>	2.4 ± 0.5	4.0 ± 0.8 *	0.0005
Retroperitoneal AT (%)	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.4	<i>n.s.</i>	2.7 ± 0.8	4.5 ± 0.6 *	0.0003
Mesenteric AT (%)	1.3 ± 0.1	1.8 ± 1.2	<i>n.s.</i>	1.9 ± 0.6	2.4 ± 0.6 *	0.0002
Brown AT (%)	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.03	<i>n.s.</i>	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.03 *	0.0001
Liver (g)	8.3 ± 0.7	8.5 ± 0.6	<i>n.s.</i>	10.9 ± 0.9	12.1 ± 1.4	<i>n.s.</i>
Gastrocnemius muscle (g)	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.1	<i>n.s.</i>	2.3 ± 0.2	2.5 ± 0.4	<i>n.s.</i>
Kidney (g)	1.7 ± 0.3	1.9 ± 0.1	<i>n.s.</i>	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.3	<i>n.s.</i>

*Values are mean ± SD, n = 7-8 rats. The differences in body composition were tested by an unpaired student t-test between groups of the same age. * Significantly different from normal adiposity group within same age. AT, adipose tissue.*

Body weight and body composition

During the 4 weeks of standard or Western diet, the 2-month rats gained 172.0 ± 10.4 g and 184.8 ± 14.9 g for the normal and high adiposity groups, respectively (**Supp Fig.1**). The 11-month rats gained 59.9 ± 17.2 g and 95.1 ± 38.6 g for the normal and high adiposity groups, respectively. A difference in weight gain was noted between 11-month rats ($P = 0.03$) and a trend was noted for the 2-month rats ($P = 0.07$). No difference in final body weight between groups of the same age was observed, but the diets administered to the rats resulted in differences in body composition (**Table 2**). A significant difference in adiposity was noted between groups of the same age, with an increase of 45% in total adiposity in the 2-month rats and 50% in the 11-month rats. Significantly higher fat pads were reported in the 11m-ha compared to the 11m-na, but not in the 2-month groups. No difference in lean body mass percentage or organs weight (kidney, liver, muscle) was observed between groups of the same age.

Table 3. Dietary nitrogen recovered in gastrointestinal segment and orofecal and –caecal nitrogen digestibility of rats according to age and adiposity levels

Age	2m		11 m		Age effect	Adiposity effect	Age x Adiposity
Group	2m-na	2m-ha	11m-na	11m-ha			
Dietary nitrogen (% of ingested)							
Stomach	2.14 ± 5.50 ^a	5.51 ± 7.92 ^{ab}	7.34 ± 8.09 ^{ab}	14.78 ± 9.30 ^b	0.01	n.s.	n.s.
Small intestine	0.61 ± 0.73	0.50 ± 0.28	0.94 ± 0.57	1.13 ± 0.74	0.04	n.s.	n.s.
Ileum	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.01	n.s.	n.s.	n.s.
Caecum	3.93 ± 1.32	3.43 ± 1.27	4.06 ± 1.44	2.54 ± 0.45	n.s.	0.02	n.s.
Colon + feces	0.67 ± 1.06	0.55 ± 0.38	0.45 ± 0.29	0.42 ± 0.35	n.s.	n.s.	n.s.
Nitrogen digestibility (%)							
Orofecal digestibility	94.1 ± 1.1	95.2 ± 1.7	94.5 ± 2.2	95.8 ± 0.7	n.s.	0.04	n.s.
Orocaecal digestibility	94.8 ± 1.6	95.7 ± 1.5	95.0 ± 2.2	96.3 ± 0.4	n.s.	0.05	n.s.

Values are mean ± SD, n = 7-8 rats. The effect of the group was tested with a two-way ANOVA model. Values with different letters within the same row are statistically different. n.s., not significant.

Dietary nitrogen recovery and digestibility of nitrogen and amino acid

A large majority of the dietary nitrogen was found in the stomach and caecum, with minimal amount in the small intestine, ileum and colon (**Table 3**). More dietary nitrogen was recovered in the stomach (P = 0.01) and the small intestine (P = 0.04) in the older rat groups than in young ones. Moreover, a higher adiposity was associated with a lower dietary nitrogen content than the normal adiposity groups in the caecum (P = 0.02). Based on nitrogen recovery in the different segments of the gastrointestinal tract, we calculated nitrogen orofecal and orocaecal digestibility values. Casein digestibility was high in all the groups (> 94%) and an effect of adiposity was found on both orofecal and orocaecal digestibility (P = 0.04 and P = 0.05, respectively) with the higher adiposity groups expressing higher digestibility values. Indeed, a difference of at least 1% was observed between groups of the same age for nitrogen digestibility.

Table 4. Orocaecal digestibility (%) of amino acids of casein according to age and adiposity levels

Age	2m		11m				
Group	2m-na	2m-ha	11m-na	11m-ha	Age effect	Adiposity effect	Age x adiposity
Indispensable AA digestibility							
Isoleucine	93.1 ± 2.1	93.6 ± 2.3	91.3 ± 2.7	93.6 ± 1.4	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Leucine	98.2 ± 0.5	98.3 ± 0.5	98.0 ± 0.5	98.6 ± 0.4	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Lysine	98.2 ± 0.6	98.3 ± 0.6	98.0 ± 0.6	98.7 ± 0.3	<i>n.s.</i>	0.04	<i>n.s.</i>
Methionine	96.5 ± 1.1	96.4 ± 1.4	95.8 ± 1.5	97.0 ± 0.8	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Phenylalanine	99.2 ± 0.3	99.2 ± 0.2	99.1 ± 0.3	99.4 ± 0.3	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Threonine	96.6 ± 1.0	96.0 ± 2.6	96.0 ± 2.6	96.8 ± 1.0	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Valine	95.7 ± 1.3	95.8 ± 1.3	94.8 ± 1.5	96.4 ± 0.9	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Dispensable AA digestibility							
Alanine	95.7 ± 1.3	95.7 ± 1.5	94.8 ± 1.4	96.0 ± 1.0	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Asx	95.5 ± 1.4	95.8 ± 1.4	94.6 ± 1.7	96.4 ± 0.9	<i>n.s.</i>	0.04	<i>n.s.</i>
Glycine	95.7 ± 1.4	96.0 ± 1.3	94.5 ± 1.6	96.1 ± 1.2	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Glx	94.2 ± 1.7	94.9 ± 1.6	93.2 ± 2.1	95.3 ± 1.2	<i>n.s.</i>	0.04	<i>n.s.</i>
Proline	98.5 ± 0.4	98.5 ± 0.5	98.3 ± 0.5	98.8 ± 0.3	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Serine	87.1 ± 3.8	88.4 ± 3.5	83.8 ± 5.8	89.9 ± 3.8	<i>n.s.</i>	0.03	<i>n.s.</i>
Tyrosine	98.1 ± 0.7	98.1 ± 0.5	98.0 ± 0.5	98.6 ± 0.5	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Mean AA digestibility	95.8 ± 1.1	96.2 ± 1.1	95.1 ± 1.4	96.6 ± 0.8	<i>n.s.</i>	0.04	<i>n.s.</i>

Values are mean ± SD, n = 7-8 rats. The effects of age, adiposity and their interaction were tested with a two-way ANOVA model. Mean amino acid digestibility was weighted by the amino acid composition of casein. *n.s.*, not significant; *Asx*, aspartate + asparagine; *glx*, glutamate + glutamine.

The orocaecal digestibility values of individual amino acid for the different rat groups are presented in **Table 4**. As for nitrogen digestibility, higher adiposity levels were associated with a significant increased digestibility of the mean amino acid digestibility. Moreover, significant differences were observed for some AA, lysine, serine, aspartate + asparagine and glutamate + glutamine.

Table 5. Transfer of dietary nitrogen to the urea pool and to the liver, gastrocnemius muscle, kidney, and skin 6 h after ingestion of the experimental meal (expressed as % of ingested nitrogen)

Age	2m		11m				
Group	2m-na	2m-ha	11m-na	11m-ha	Age effect	Adiposity effect	Age x Adiposity
Body urea pool	3.9 ± 2.1 ^a	5.3 ± 2.2 ^{ab}	8.3 ± 1.9 ^b	5.4 ± 3.1 ^{ab}	0.022	n.s.	0.029
Urinary urea pool	2.4 ± 1.4	4.0 ± 2.1	4.1 ± 2.3	3.6 ± 2.1	n.s.	n.s.	n.s.
Total deamination	6.3 ± 3.1 ^a	9.3 ± 3.8 ^{ab}	12.4 ± 3.5 ^b	9.0 ± 2.4 ^{ab}	0.030	n.s.	0.017
Liver	8.6 ± 2.7	9.6 ± 3.8	11.9 ± 6.7	15.3 ± 7.3	0.036	n.s.	n.s.
Muscle	0.8 ± 0.5	0.7 ± 0.7	1.0 ± 0.8	0.8 ± 0.8	n.s.	n.s.	n.s.
Kidney	1.7 ± 0.7	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.3	1.8 ± 0.3	n.s.	n.s.	n.s.
Skin	12.4 ± 3.8	14.0 ± 5.0	15.2 ± 3.7	16.8 ± 4.3	n.s.	n.s.	n.s.

Values are mean ± SD, n = 5-7 rats. The effects of age and adiposity and their interaction were tested with a two-way ANOVA model. Values with different letters within the same row are statistically different. n.s., not significant.

Postprandial distribution of dietary nitrogen

Table 5 presents the percentage of dietary nitrogen retained in some organs and transferred to body and urinary urea (deamination pool). Significant effects of age and interaction of age and adiposity were found on dietary nitrogen recovered in body urea pool 6 h after the meal and on total deamination. Indeed, dietary nitrogen recovered in the body urea pool as well as total deamination were increased in middle-aged rats with normal adiposity in comparison to their young counterparts, whereas values were comparable in high adiposity middle-aged and young rats. No effect of age, adiposity or their interaction was found on the transfer of dietary nitrogen to the urinary urea pool. However, there was an effect of age that increased the transfer to the body urea pool and an interaction of age and adiposity, as adiposity tended to counteract the effect of age. As a result, total deamination increased with age but adiposity triggered an inverse effect in young and middle-aged rats. There was no effect of age or adiposity on the incorporation of ¹⁵N in the tissues, except in the liver where a significant effect of age was observed with higher incorporation of dietary nitrogen in older rats. When calculated with respect to body weight (**Supp. Table 2**), a significant effect of age was observed only in kidney and skin, with a higher incorporation of dietary nitrogen in the kidney and skin of young rats.

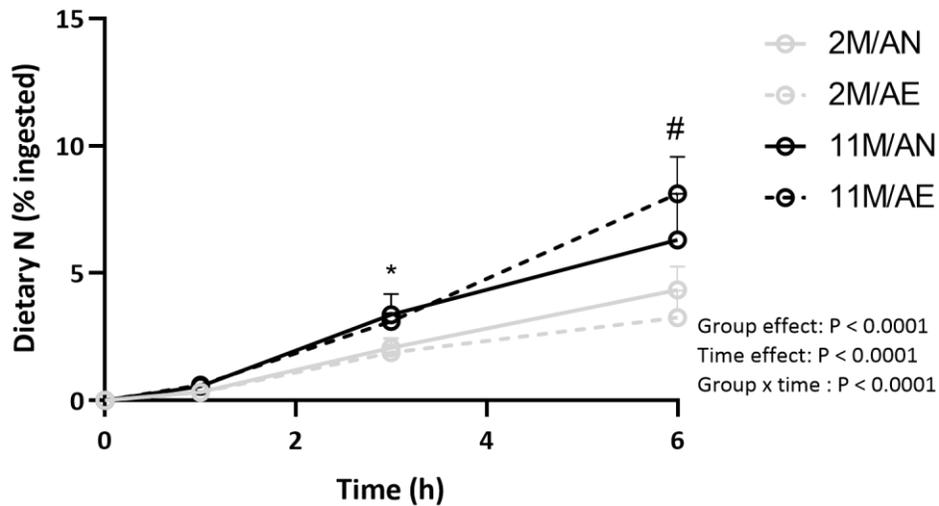


Figure 2. Incorporation of dietary nitrogen to plasma proteins over the 6-h postprandial period. Values are mean \pm SD, n = 7-8 rats. * indicating a significant difference ($P < 0.05$) between the 2m-ha and 11m-na groups and # indicating a significant difference ($P < 0.05$) between the 11m rat groups and the 2m rat groups.

Figure 2 represents the incorporation of dietary nitrogen into plasma proteins over the whole postprandial period according to the different rat groups. Overall, a group effect was observed at 3 h after ingestion as middle-aged rats with normal adiposity presented a higher incorporation of dietary nitrogen into plasma proteins compared to the young rats with high adiposity. At the end of the postprandial period, an effect of age was found as the older rat groups had a higher incorporation of dietary nitrogen into plasma proteins compared to the younger rats ($P < 0.0001$ for 11m-ha:2m-na and 11m-ha:2m-ha groups; $P = 0.0001$ and $P = 0.0002$ for 11m-na:2m-na 11m-na:2m-ha respectively). No difference was found at 6 h within rats of the same age regardless of adiposity levels.

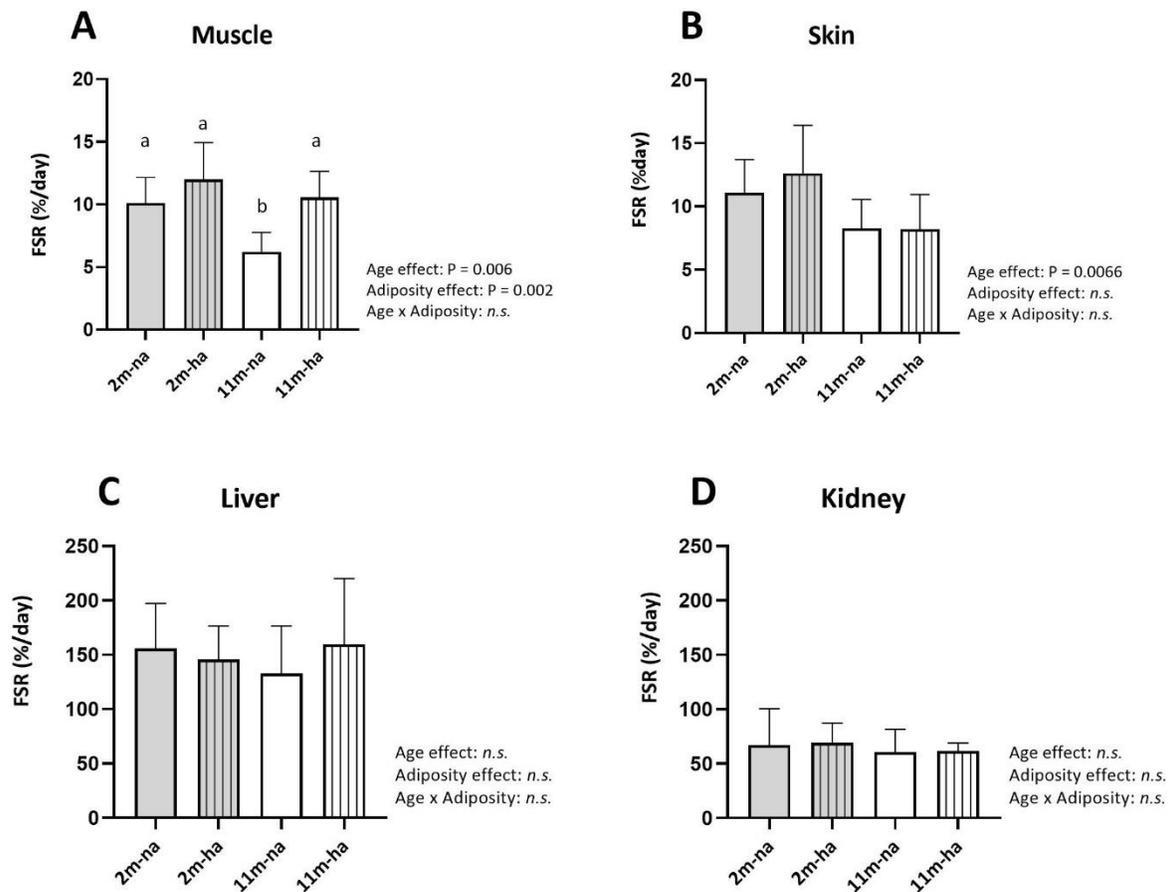


Figure 3. Fractional synthesis rate (FSR) in the gastrocnemius muscle (A), skin (B), liver (C), kidney (D) 6 h after meal ingestion. Values are mean \pm SD, $n = 7-8$ rats. The effects of age and adiposity and their interaction were tested with a two-way ANOVA model. Values with different letters within a graph are statistically different. *n.s.*, not significant.

Protein anabolism

The FSR in the liver, gastrocnemius muscle, kidney and skin are presented in **Figure 3**. No effect of age or adiposity was observed on the FSR per day in the liver and kidney. In the gastrocnemius muscle, age decreased the FSR whereas adiposity increased it. Hence, muscle FSR of the middle-aged group with normal adiposity was significantly reduced compared to the young groups ($P = 0.03$ in comparison to 2m-na and $P = 0.0005$ in comparison to 2m-ha) and muscle FSR of the middle-aged group with high adiposity was not different from the young groups. Furthermore, an

effect of age on protein synthesis in the skin was noted with higher FSR per day in the younger rat groups, no matter the adiposity level.

Table 6. Expression of the main peptides and amino acids transporters and hormones in the mucosa of the different segments of the small intestine according to age and adiposity levels

Age	2m		11m		Age effect	Adiposity effect	Age x Adiposity
	Group	2m-na	2m-ha	11m-na			
Duodenum							
PEPT1	4.4 ± 3.9	4.5 ± 3.1	6.3 ± 3.5	4.4 ± 2.6	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
CCK	2.2 ± 1.1 ^a	2.2 ± 1.1 ^a	3.5 ± 1.5 ^a	4.2 ± 1.6 ^a	<i>0.005</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Secretin	4.7 ± 3.2	6.6 ± 5.4	5.0 ± 1.1	6.9 ± 6.9	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Jejunum							
PEPT1	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.7	0.9 ± 0.3	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc6a19	2.5 ± 1.8	1.8 ± 0.5	1.7 ± 0.7	1.4 ± 1	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc38a2	1.2 ± 0.6	1.1 ± 0.3	1.5 ± 0.6	0.8 ± 0.2	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc1a1	2.7 ± 3.7	1.1 ± 0.7	1.5 ± 0.7	1.2 ± 1.4	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc6a14	3.8 ± 2.6	4.3 ± 3.4	7.0 ± 3.2	3.5 ± 2.0	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc36a1	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.4	2.1 ± 1.2	1.8 ± 0.7	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slca31	3.0 ± 1.3	2.4 ± 2.7	3.4 ± 1.4	2.8 ± 1.8	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc1a5	1.1 ± 0/.8	1.0 ± 0.5	1.4 ± 0.9	0.8 ± 0.2	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Ileum							
PEPT1	3.7 ± 1.4	4.0 ± 1.1	4.4 ± 1.6	3.4 ± 0.8	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc6a19	1.5 ± 1.0 ^a	1.0 ± 0.2 ^a	1.4 ± 0.5 ^a	1.0 ± 0.3 ^a	<i>n.s.</i>	<i>0.03</i>	<i>n.s.</i>
Slc38a2	5.9 ± 1.7 ^a	4.5 ± 0.9 ^{ab}	6.9 ± 4.2 ^{ab}	4.0 ± 1.1 ^b	<i>n.s.</i>	<i>0.007</i>	<i>n.s.</i>
Slc1a1	1.8 ± 0.6	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.6	1.4 ± 0.4	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc6a14	6.3 ± 2.8	5.4 ± 1.9	7.6 ± 4.7	7.8 ± 5.8	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc36a1	4.0 ± 0.5	3.8 ± 0.7	5.8 ± 3.4	4.3 ± 0.8	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slca31	8.5 ± 2.9	8.2 ± 2.3	9.4 ± 4.1	7.1 ± 1.3	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Slc1a5	5.1 ± 2.9 ^a	4.1 ± 1.9 ^a	8.2 ± 5.0 ^a	3.7 ± 1.5 ^a	<i>n.s.</i>	<i>0.03</i>	<i>n.s.</i>

Values are mean ± SD, n = 7-8 rats. The results are expressed in arbitrary units. The effects of age and adiposity and their interaction were tested with a two-way ANOVA model. Values with different letters within the same row are statistically different. CCK, cholecystokinin; PEPT1, Peptide transporter 1; Slc, solute carrier; n.s, not significant.

Expression of hormones and peptide and amino acid transporters in the intestinal mucosa

Table 6 presents the expression of hormones and transporters in intestinal mucosa of rats. For hormones, the expression of CCK was higher in older rats, with an increase of 60 to 90% compared to young rats. No effect of age, adiposity or their interaction was observed in the expression of transporters in the duodenum and the jejunum. In the ileum, an effect of adiposity was demonstrated for the expression of Slc6a19, Slc38a2 and Slc1a5, with higher expression of these transporters in normal adiposity groups compared to their higher adiposity counterparts.

4. Discussion

This study aimed to evaluate the effects of age and adiposity on the digestibility and postprandial utilization of ¹⁵N-labeled native micellar casein in rats. To the best of our knowledge, no previous study has evaluated the combined effect of these two factors on the digestion and postprandial metabolic fate of dietary nitrogen. In this regard, different aspects were examined: protein and amino acid digestibility, postprandial deamination, dietary nitrogen transfer to organs, tissues, and to plasma proteins, protein synthesis rates in different organs and tissues, and gene expression of amino acid transporters and hormones in the small intestine. Our main results showed that age slowed down casein gastric emptying, increasing postprandial deamination, and reduced muscle protein synthesis rate, whereas adiposity slightly increased casein digestibility and reduced the effects of age on nitrogen utilization and protein synthesis.

The rats included in our study were young rats (2 months old) and rats of middle age (11 months old). To obtain different levels of adiposity, half of the rats consumed a high fat/high sucrose diet, considered as a western-style diet, during a period of 4 weeks. Despite no difference in final body weight, these rats presented significantly higher adiposity levels compared to their lean counterparts of the same age, with an increase of 45% for the young rats and 50% for the middle-aged rats. The relatively short length of the nutritional intervention (4 weeks) may explain the comparable final body weight between groups of the same age. However longer duration of an obesogenic diet may have also resulted in a similar final body weight of obese and control rats together with higher adiposity level for obese rats (Matias et al., 2018). Standard thresholds for obesity have not been developed in rats but comparison with diet-induced obesity models in

literature suggests that the 9.4% and 20.0% of fat mass in the young and middle-aged high adiposity groups correspond to moderately high level of adiposity and intermediate obesity (Boozer et al., 1995). In the case of advanced stages of obesity, the increase in adiposity was also usually associated with approximately a 10% increase in body weight compared to control groups (Chevalier et al., 2013; Woods et al., 2003).

In our study, the oro-caecal digestibility of the micellar casein ranged between 94.6% and 96.3%, depending on the group. These values are in the same range as previously observed in a comparable study where ¹⁵N-labelled micellar casein presented a caecal digestibility of 95.6% (Lacroix et al., 2006). Accordingly, we also reported a mean amino acid digestibility of micellar casein that varied from 95.1% to 96.6% depending on the group, in line with previous results showing a mean ileal amino acid digestibility of casein of 96.5% in rats (Rutherford & Moughan, 1998).

We observed no effect of age on protein or amino acid digestibility of casein, in contrast with the study by Gilani & Sepehr that showed a decreased digestibility associated with aging (Gilani & Sepehr, 2003). They evaluated the effects of age on the fecal digestibility of various protein sources. They showed that 20-month-old rats presented a lower digestibility for nearly all protein sources including casein compared to young rats of 5 weeks, and the effect of age was particularly important for the less digestible proteins. Although the methods used to evaluate digestibility were different from those in our study, this result suggests that in contrast to old rats, middle-aged rats may not present a declined digestibility. Nevertheless, gastric emptying rate seemed to be modified with age since between 7 and 15% of dietary nitrogen was still in the stomach of middle-aged rats 6 h after meal intake. A slower gastric emptying rate has already been associated with older age. Studies conducted on young, adult, and old rats have demonstrated a delayed gastric emptying that appeared in adult rats and increased gradually in old rats (Horiuchi et al., 2014; Smits & Lefebvre, 1996). The mechanisms are not well elucidated but it might be due to a by reduced gastric contractile forces or age-related neurodegeneration of the enteric nervous system (Salles, 2007). Interestingly, we found a higher expression of CCK in the duodenum of the middle-aged rats, a hormone that is known to slow down gastric emptying (Rehfeld, 2017). The delayed gastric emptying observed in middle-aged rats may have been also emphasized by the

nature of the protein ingested. Micellar casein is a slowly digested protein since it forms curds in the stomach which results in a gradual and slow amino acid plasma release (Boirie et al., 1997). Hence, it has been previously shown that in aged rats, gastric emptying and small intestinal transit were slowed down after casein intake compared to whey or soy proteins (Dalziel et al., 2017).

Whereas age did not alter digestibility, we observed a slight but significant effect of adiposity that increased protein and amino acid digestibility by around 1%. To the best of our knowledge, no other study has evaluated the effect of adiposity on protein and amino acid digestibility. In a study performed on diet-induced obese mice, a decrease in fecal nitrogen excretion and a higher nitrogen apparent digestibility was reported (Do et al., 2014). Moreover, in that same study, a higher expression of the Slc6a20a and Slc36a1 amino acid transporters in the small intestine of obese mice was found. On the contrary, we observed a slight decrease in gene expression of some amino acid transporters in the ileum of the high adiposity rats and, while the majority of peptides and amino acid absorption occurs in the upper small intestine, no difference between groups in the gene expression of any of the specific amino acid transporters measured was revealed in the duodenum or jejunum. Peptides and amino acids are mainly absorbed via transporters, but they can also be absorbed through other mechanisms, such as paracellular pathways via the tight junctions, passive diffusion through the enterocytes or even endocytosis (Miner-Williams et al., 2014). Thus, the slightly improved digestibility found in the higher adiposity groups might have been caused by an increase in these transportation pathways. This hypothesis is supported by the effects of a high fat diet and subsequent low-grade systemic inflammation on gut dysbiosis and increased permeability of colon mucosa (Cani et al., 2008; Guo et al., 2015; Rohr et al., 2020; Suzuki, 2013).

The use of ¹⁵N-labelled casein allowed us to evaluate the postprandial metabolic fate of dietary nitrogen. We found that postprandial total deamination 6 h after meal intake was increased from 6% in young rats to 12% in middle-aged rats with normal adiposity. Hence, the delayed gastric emptying of middle-aged rats in our study did not result in a reduced catabolism of protein, in contrast to previously published data showing that slower dietary amino acid delivery may reduce catabolism of proteins (Dangin et al., 2001). However, in the study by Dangin *et al* (2001), casein was compared to a quickly digested meal containing a mix of amino acids mimicking casein

composition, whereas in our study the same slowly digested protein meal was studied. The metabolic fate of nitrogen was then assessed by measuring dietary nitrogen incorporation into proteins. An increase in dietary nitrogen uptake was found in the liver of middle-aged rats compared to young rats, which is in line with the higher splanchnic sequestration observed in elderly (Boirie et al., 1997; Jourdan et al., 2011). The dietary nitrogen deposition in the liver of older rats may also be partly due to the higher body and liver weight of these rats, as this effect was not observed when expressed with respect to body weight. Furthermore, incorporation of dietary nitrogen in plasma protein was increased in middle-aged groups. Since plasma proteins are mainly composed of exported liver proteins, this is consistent with the higher splanchnic protein postprandial sequestration observed in older rats. Nevertheless, we found no difference in the liver protein synthesis rate measured by the ^{13}C -valine flooding dose method. Although we cannot exclude that differences in the FSR would have been observed in the early postprandial phase, our result of a higher splanchnic sequestration in the absence of any effect on the anabolic rate is not surprising since the 11-month-rats are heavier than the 2-month-rats. Nevertheless, as all organs are heavier in the middle-aged groups, our results show a differential postprandial dietary nitrogen disposal in the tissues. The first-pass splanchnic metabolism, including deamination and incorporation of dietary nitrogen into proteins resulted in a proportionally less amount of dietary nitrogen available for protein synthesis in peripheral tissues. Together with no higher incorporation of dietary nitrogen into the gastrocnemius muscle or the skin in middle-aged rats compared to young rats, we reported a decrease in protein synthesis rate in the skin and muscle of middle-aged rats. Previous results showed a gradual age-associated decline in protein synthesis rate in the skin, due to a general decrease in protein synthesis rate with age but also to the high protein turnover and accretion in skin during rat growth (Mays et al., 1991; Obled & Arnal, 1992). Furthermore, the effect of age on muscle protein synthesis has already been well demonstrated in rats (Dardevet et al., 2000; Holloszy et al., 1991; L. Mosoni et al., 1995; Laurent Mosoni et al., 1993) and humans (Forbes, 1976; Rasmussen et al., 2006). Indeed, aging is well associated with sarcopenia which may be due to a loss of sensitivity to anabolic stimulating signal, such as the presence of amino acids (Breen & Phillips, 2011). Taken together, we found that middle-aged rats of 11 months displayed metabolic adaptations usually reported in aged rats, such as higher

postprandial deamination, increased splanchnic retention and decreased peripheral protein synthesis rate. Interestingly, these alterations of protein metabolism were not all observed in the middle-aged rats with high adiposity levels.

In addition to a slightly increased protein and amino acid digestibility, middle-aged rats with high adiposity levels had a postprandial deamination of casein comparable to the younger rat groups. However, dietary nitrogen retention in the liver 6 h after meal intake and incorporation in plasma proteins over the 6-h postprandial phase were comparable in middle-aged rats with normal and high adiposity. These results suggest that middle-aged rats with high adiposity may have displayed the age-related higher nitrogen splanchnic sequestration but that it was also accompanied by reduced losses in dietary amino acids through deamination. Therefore, more dietary nitrogen and amino acids may have been available for peripheral metabolism in these rats. As the amount of substrate is a key factor in regulating protein synthesis, it could explain why protein synthesis rate in the muscle was higher in middle-aged rats with high adiposity compared to normal adiposity and seemed to counteract the effect of age. The impact of adiposity on muscle protein synthesis has previously been observed in a study where protein synthesis was found to increase in the muscle at an intermediate stage of obesity constitution (Masgrau et al., 2012) and the increased muscle protein synthesis in obese rats was shown to be associated with an improvement in ribosomal activity (Estornell et al., 1995). Moreover, the role of insulin together with a high availability of plasma amino acids on muscle protein anabolism is now well established (Wolfe, 2000). While insulin levels were not monitored in our study, we could suppose that a higher adiposity was accompanied by higher insulin levels (Gloy et al., 2010) which could have stimulated muscle protein synthesis. However, it should be pointed out that according to the stage of obesity, this increase in muscle protein synthesis could be impaired since advanced stages of obesity are often accompanied by insulin resistance which can in turn impact muscle protein metabolism (Beals et al., 2018). Taken collectively, the moderately high levels of adiposity in our middle-aged rats seemed to have counteracted the effect of aging on postprandial protein metabolism such as the age-related increase in amino acid postprandial deamination and decrease in muscle protein synthesis. The increased digestibility associated with

higher adiposity may have also partly participated in counterbalancing this effect by means of a higher absorption of dietary amino acids available for metabolic utilization.

In conclusion, this study provided the first data on the effects of adiposity levels on micellar casein digestibility and postprandial utilization in young and middle-aged rats. A strength of our study is that we used ¹⁵N labeled proteins that allowed us to track dietary nitrogen in the gastrointestinal tract, urea pools and in peripheral organ and tissues. A higher level of adiposity resulted in a slight increase in protein and individual amino acid digestibility values and seemed to compensate for the metabolic protein alteration linked with aging, including reduced muscle anabolic response. Although contradictory data exist, moderate adiposity might be a marker of a healthy aging process (Pes et al., 2019) and our data support this hypothesis in the context of protein metabolism.

Acknowledgements

We thank Antoine Verloin from GAEC des 3 chênes for labeling the cow milk and Aziz Smira and Martin Chapelais for contributing to sample analysis.

Financial support

This project was funded by Ingredia.

Conflict of interest

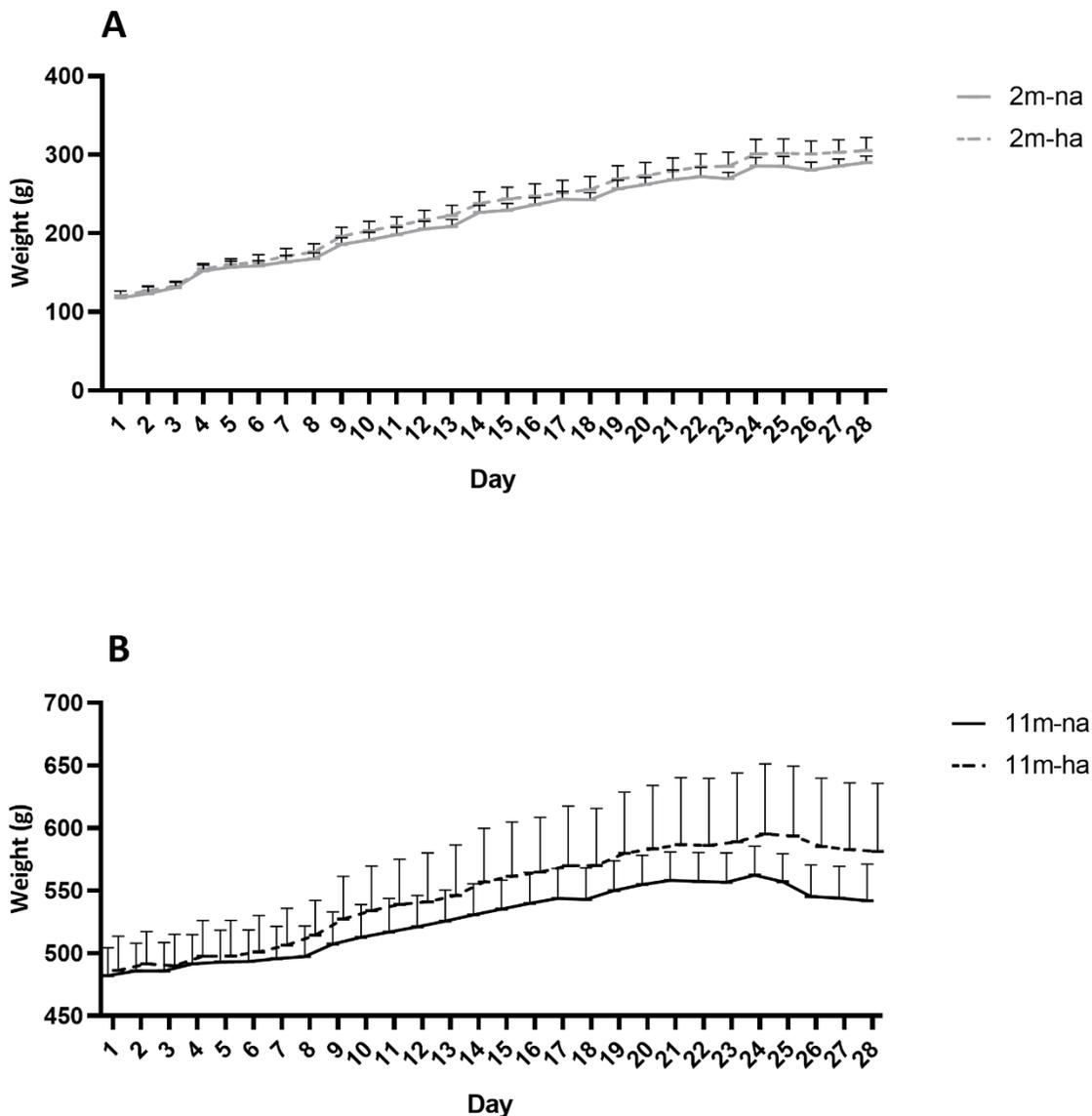
C.G., D.A.M., N.K., C.C., J.P., M.C. and J.C. declare that they have no conflict of interest. N.A., A.B., and A.B. are employed by Ingredia.

Authorship

The authors' responsibilities were as follows: C.G., J.C., A.B. and A.B. contributed to the conception and design of the study; N.A., J.C. conducted the research; N.K., C.C., J.P., and M.C. contributed to data acquisition, N.A. and J.C. analyzed the data; N.A. wrote the original draft of

the paper; J.C., C.G., D.A.M, A.B., and A.B. reviewed and edited the manuscript; C.G. administered the project; and all authors read and approved the final manuscript.

Supplemental data



Supplemental Figure 1. Weight of the 2 months rats (A) and 11 months rats (B) over time. Values are expressed as mean (n = 7-8). There were no significant differences in weight were observed between the groups.

Supplemental Table 1. Primer sequences used for duodenum, jejunum and ileum mRNA analysis

Gene	Forward Primer (5' to 3')	Reverse primer (3' to 5')
β -actin	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT	AGCGCAGCGATATCGTCAT
CCK	CAGGTCCGCAAAGCTCCTT	TCCAGGCTCTGCAGGTTCT
Seceretin	TGCTGCTCTCAAGTTCTTTCGT	CGTCCCCTCCGAGTGTCT
PEPT1	GGCTGAGGCAGGCCACTT	AGCAAGGAGGCGAACAGAAC
Slc6a19	CCGAGCGCTTTGATGACTGT	GGCAGGTCGAACCCATTG
Slc38a2	TCTGCAGGCGGACATTAACC	ACGCGGCAGGCAGATG
Slc1a1	GTCCTGAGTGGGCTTGCAAT	CCGCACGACTATGAAATAGATCAG T
Slc6a14	TCTGTGTGACTCAGGCTGGAA	CCCATCCAGCACAGAAGTGA
Slc36a1	TTCTGCTGCGTCTACTTTGTGTTT	TGGCTGCCTCTATCACCTGTT
Slca31	GCGGTCCATGACAAAGGTTTAA	TCGATTGGAACCAAGGATGTTT
Slc1a5	TCCAATCTGGTGTCTGCTTCTG	TGGTCCATGGTTGCATTGC

Supplemental Table 2. Transfer of dietary nitrogen to the liver, gastrocnemius muscle, kidney, and skin 6 h after ingestion of the experimental meal (expressed as % of ingested nitrogen per 100 g of body weight)

	2m-na	2m-ha	11m-na	11m-ha	Age effect	Adiposity effect	Age x Adiposity
Liver	2.7 \pm 0.8	3.0 \pm 1.2	2.2 \pm 1.3	2.6 \pm 1.2	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Muscle	0.3 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.2	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Kidney	0.6 \pm 0.2 ^a	0.5 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.1 ^{ab}	0.3 \pm 0.1 ^b	<0.0001	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>
Skin	3.9 \pm 1.2	4.4 \pm 1.6	2.8 \pm 0.7	3.0 \pm 0.8	0.007	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Values are mean \pm SD, n = 7-8 rats. The effects of age and adiposity and their interaction were tested with a two-way ANOVA model. Values with different letters within the same row are statistically different. *n.s.*, not significant.

References

1. Anderson, S. R., Gilge, D. A., Steiber, A. L., & Previs, S. F. (2008). Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. *Metabolism*, *57*(3), 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.10.009>
2. Beals, J. W., Sukiennik, R. A., Nallabelli, J., Emmons, R. S., van Vliet, S., Young, J. R., Ulanov, A. V., Li, Z., Paluska, S. A., De Lisio, M., & Burd, N. A. (2016). Anabolic sensitivity of postprandial muscle protein synthesis to the ingestion of a protein-dense food is reduced in overweight and obese young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *104*(4), 1014-1022. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.130385>
3. Bhutto, A., & Morley, J. E. (2008). The clinical significance of gastrointestinal changes with aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *11*(5), 651-660. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32830b5d37>
4. Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14930-14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>
5. Boozer, C. N., Schoenbach, G., & Atkinson, R. L. (1995). Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.268.4.E546>
6. Bos, C., Stoll, B., Fouillet, H., Gaudichon, C., Guan, X., Grusak, M. A., Reeds, P. J., Burrin, D. G., & Tomé, D. (2005). Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *288*(2), E436-E446. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00263.2004>
7. Boutry, C., Fouillet, H., Mariotti, F., Blachier, F., Tomé, D., & Bos, C. (2011). Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutrition & Metabolism*, *8*, 52. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-52>
8. Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score

- method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183-S211.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>
9. Breen, L., & Phillips, S. M. (2011). Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the « anabolic resistance » of ageing. *Nutrition & Metabolism*, 8(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-68>
 10. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481. <https://doi.org/10.2337/db07-1403>
 11. Chevalier, L., Bos, C., Azzout-Marniche, D., Fromentin, G., Mosoni, L., Hafnaoui, N., Piedcoq, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2013). Energy restriction only slightly influences protein metabolism in obese rats, whatever the level of protein and its source in the diet. *International Journal of Obesity*, 37(2), 263-271. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.19>
 12. Dalziel, J. E., Young, W., McKenzie, C. M., Haggarty, N. W., & Roy, N. C. (2017). Gastric Emptying and Gastrointestinal Transit Compared among Native and Hydrolyzed Whey and Casein Milk Proteins in an Aged Rat Model. *Nutrients*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nu9121351>
 13. Dangin, M., Boirie, Y., Garcia-Rodenas, C., Gachon, P., Fauquant, J., Callier, P., Ballèvre, O., & Beaufrère, B. (2001). The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 280(2), E340-348. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.2.E340>
 14. Dardevet, D., Sornet, C., Balage, M., & Grizard, J. (2000). Stimulation of In Vitro Rat Muscle Protein Synthesis by Leucine Decreases with Age. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2630-2635. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2630>
 15. Dardevet, D., Sornet, C., Bayle, G., Prugnaud, J., Pouyet, C., & Grizard, J. (2002). Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *The Journal of Nutrition*, 132(1), 95-100. <https://doi.org/10.1093/jn/132.1.95>

16. Do, T. T. H., Hindlet, P., Waligora-Dupriet, A.-J., Kapel, N., Neveux, N., Mignon, V., Deloménie, C., Farinotti, R., Fève, B., & Buyse, M. (2014). Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 306(6), E668-680. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00437.2013>
17. Estornell, E., Cabo-Soler, J., & Barber, T. (1995). Protein synthesis is stimulated in nutritionally obese rats. *The Journal of nutrition*, 125, 1309-1315. <https://doi.org/10.1093/jn/125.5.1309>
18. Forbes, G. B. (1976). The Adult Decline in Lean Body Mass. *Human Biology*, 48(1), 161-173.
19. Fromentin, G., Darcel, N., Chaumontet, C., Marsset-Baglieri, A., Nadkarni, N., & Tomé, D. (2012). Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 29-39. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000175>
20. Gilani, G., Cockell, K., & Sepehr, E. (2005). Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods. *Journal of AOAC International*, 88, 967-987. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.967>
21. Gilani, G. S., & Sepehr, E. (2003). Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(1), 220-225. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.220>
22. Gloy, V. L., Lutz, T. A., Langhans, W., Geary, N., & Hillebrand, J. J. (2010). Basal plasma levels of insulin, leptin, ghrelin, and amylin do not signal adiposity in rats recovering from forced overweight. *Endocrinology*, 151(9), 4280-4288. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0439>
23. Gorissen, S. H. M., Trommelen, J., Kouw, I. W. K., Holwerda, A. M., Pennings, B., Groen, B. B. L., Wall, B. T., Churchward-Venne, T. A., Horstman, A. M. H., Koopman, R., Burd, N. A., Fuchs, C. J., Dirks, M. L., Res, P. T., Senden, J. M. G., Steijns, J. M. J. M., de Groot, L. C. P. G. M., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. C. (2020). Protein Type, Protein Dose, and Age Modulate Dietary Protein Digestion and Phenylalanine Absorption Kinetics and Plasma

- Phenylalanine Availability in Humans. *The Journal of Nutrition*, 150(8), 2041-2050.
<https://doi.org/10.1093/jn/nxaa024>
24. Guillet, C., Masgrau, A., Walrand, S., & Boirie, Y. (2012). Impaired protein metabolism: interlinks between obesity, insulin resistance and inflammation. *Obesity Reviews*, 13(S2), 51-57. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01037.x>
25. Guillin, F. M., Gaudichon, C., Guérin-Deremaux, L., Lefranc-Millot, C., Azzout-Marniche, D., Khodorova, N., & Calvez, J. (2020). Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine. *British Journal of Nutrition*, 125(4), 389-397. <https://doi.org/10.1017/S0007114520002883>
26. Guo, S., Nighot, M., Al-Sadi, R., Alhmoud, T., Nighot, P., & Ma, T. Y. (2015). Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 195(10), 4999-5010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402598>
27. Holloszy, J. O., Chen, M., Cartee, G. D., & Young, J. C. (1991). Skeletal muscle atrophy in old rats: Differential changes in the three fiber types. *Mechanisms of Ageing and Development*, 60(2), 199-213. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90131-I](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90131-I)
28. Horiuchi, A., Tanaka, N., Sakai, R., & Kawamata, Y. (2014). Effect of Age and Elemental Diets on Gastric Emptying in Rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research*, 3, 1340-1343. <https://doi.org/10.17554/j.issn.2224-3992.2014.03.462>
29. Jourdan, Deutz, N. E. P., Cynober, L., & Aussel, C. (2011). Features, Causes and Consequences of Splanchnic Sequestration of Amino Acid in Old Rats. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027002>
30. Kim, T. N., Park, M. S., Ryu, J. Y., Choi, H. Y., Hong, H. C., Yoo, H. J., Kang, H. J., Song, W., Park, S. W., Baik, S. H., Newman, A. B., & Choi, K. M. (2014). Impact of visceral fat on skeletal muscle mass and vice versa in a prospective cohort study: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). *PloS One*, 9(12), e115407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115407>

31. Lacroix, M., Bos, C., Airinei, G., Fauquant, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2006). Heat markers and quality indexes of industrially heat-treated [15N] milk protein measured in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1508-1517. <https://doi.org/10.1021/jf051304d>
32. Markofski, M. M., Dickinson, J. M., Drummond, M. J., Fry, C. S., Fujita, S., Gundermann, D. M., Glynn, E. L., Jennings, K., Paddon-Jones, D., Reidy, P. T., Sheffield-Moore, M., Timmerman, K. L., Rasmussen, B. B., & Volpi, E. (2015). Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women. *Experimental gerontology*, 65, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.02.015>
33. Masgrau, A., Mishellany-Dutour, A., Murakami, H., Beaufrère, A.-M., Walrand, S., Giraudet, C., Migné, C., Gerbaix, M., Metz, L., Courteix, D., Guillet, C., & Boirie, Y. (2012). Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 20), 5199-5210. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238576>
34. Matias, A. M., Estevam, W. M., Coelho, P. M., Haese, D., Kobi, J. B. B. S., Lima-Leopoldo, A. P., & Leopoldo, A. S. (2018). Differential Effects of High Sugar, High Lard or a Combination of Both on Nutritional, Hormonal and Cardiovascular Metabolic Profiles of Rodents. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/nu10081071>
35. Mays, P. K., McAnulty, R. J., & Laurent, G. J. (1991). Age-related changes in rates of protein synthesis and degradation in rat tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, 59(3), 229-241. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(91\)90134-L](https://doi.org/10.1016/0047-6374(91)90134-L)
36. Millward, D. J., Layman, D. K., Tomé, D., & Schaafsma, G. (2008). Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1576S-1581S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1576S>
37. Miner-Williams, W. M., Stevens, B. R., & Moughan, P. J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Reviews*, 27(2), 308-329. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000225>

38. Mosoni, L., Valluy, M. C., Serrurier, B., Prugnaud, J., Obled, C., Guezennec, C. Y., & Mirand, P. P. (1995). Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 268(2), E328-E335. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.268.2.E328>
39. Mosoni, Laurent, Mirand, P. P., Houlier, M. L., & Arnal, M. (1993). Age-related changes in protein synthesis measured in vivo in rat liver and gastrocnemius muscle. *Mechanisms of Ageing and Development*, 68(1), 209-220. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(93\)90152-H](https://doi.org/10.1016/0047-6374(93)90152-H)
40. Oberli, M., Marsset-Baglieri, A., Airinei, G., Santé-Lhoutellier, V., Khodorova, N., Rémond, D., Foucault-Simonin, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Fromentin, G., Benamouzig, R., & Gaudichon, C. (2015). 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. *The Journal of Nutrition*, 145(10), 2221-2228. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216838>
41. Obled, C., & Arnal, M. (1992). Contribution of skin to whole-body protein synthesis in rats at different stages of maturity. *The Journal of Nutrition*, 122(11), 2167-2173. <https://doi.org/10.1093/jn/122.11.2167>
42. Pes, G. M., Licheri, G., Soro, S., Longo, N. P., Salis, R., Tomassini, G., Niolu, C., Errigo, A., & Dore, M. P. (2019). Overweight: A Protective Factor against Comorbidity in the Elderly. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(19), 3656. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193656>
43. Rand, W. M., Pellett, P. L., & Young, V. R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(1), 109-127. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.1.109>
44. Rasmussen, B. B., Fujita, S., Wolfe, R. R., Mittendorfer, B., Roy, M., Rowe, V. L., & Volpi, E. (2006). Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), 768-769. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4607fje>

45. Rehfeld, J. F. (2017). Cholecystokinin—From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger. *Frontiers in Endocrinology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00047>
46. Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in Nutrition*, 11(1), 77-91. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>
47. Rutherford, S. M., & Moughan, P. J. (1998). The digestible amino acid composition of several milk proteins: application of a new bioassay. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 909-917. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75650-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75650-4)
48. Salles, N. (2007). Basic Mechanisms of the Aging Gastrointestinal Tract. *Digestive Diseases*, 25(2), 112-117. <https://doi.org/10.1159/000099474>
49. Sarwar, G. (1997). The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats. *The Journal of Nutrition*, 127(5), 758-764. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.758>
50. Sharp, P. E., La Regina, M. C., & Suckow, M. A. (1998). *The laboratory rat*. CRC Press.
51. Smits, G. J. M., & Lefebvre, R. A. (1996). Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit, and fecal output in rats. *Experimental Gerontology*, 31(5), 589-596. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(96\)00029-0](https://doi.org/10.1016/0531-5565(96)00029-0)
52. Suzuki, T. (2013). Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(4), 631-659. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1070-x>
53. Tessier, R., Khodorova, N., Calvez, J., Kapel, R., Quinsac, A., Piedcoq, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2020). ¹⁵N and ²H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *The Journal of Nutrition*, 150(3), 450-457. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>
54. Tessier, R., Ribeiro-Parenti, L., Bruneau, O., Khodorova, N., Cavin, J.-B., Bado, A., Azzout-Marniche, D., Calvez, J., Le Gall, M., & Gaudichon, C. (2019). Effect of different bariatric surgeries on dietary protein bioavailability in rats. *American Journal of Physiology-*

- Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(5), G592-G601.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00142.2019>
55. Wall, B. T., Gorissen, S. H., Pennings, B., Koopman, R., Groen, B. B. L., Verdijk, L. B., & van Loon, L. J. C. (2015). Aging Is Accompanied by a Blunted Muscle Protein Synthetic Response to Protein Ingestion. *PLoS ONE*, 10(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140903>
56. Waynforth, H. B., & Flecknell, P. A. (1992). *Experimental and surgical technique in the rat*. Academic Press.
57. WHO, FAO, & United Nations University (Éds.). (2007). *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation ; [Geneva, 9 - 16 April 2002]*. WHO.
58. Wolfe, R. R. (2000). Effects of insulin on muscle tissue. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 3(1), 67–71.
59. Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., & Tso, P. (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of Nutrition*, 133(4), 1081-1087.
<https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1081>
60. Zhu, S., Tian, Z., Torigoe, D., Zhao, J., Xie, P., Sugizaki, T., Sato, M., Horiguchi, H., Terada, K., Kadomatsu, T., Miyata, K., & Oike, Y. (2019). Aging- and obesity-related peri-muscular adipose tissue accelerates muscle atrophy. *PLoS ONE*, 14(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221366>

4.3. Digestibilité des protéines et métabolisme postprandial de différentes matrices protéiques laitières chez le rat (Article 3)

Résumé

Objectifs

Il existe actuellement peu de données reliant la structure d'une protéine à la façon dont elle est digérée et assimilée *in vivo*. L'objectif de cette étude était donc d'analyser la digestibilité des protéines et le métabolisme postprandial de matrices protéiques laitières obtenues via différents procédés industriels chez le rat.

Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée sur des rats Wistar âgés de 5 semaines ayant consommé un repas contenant différentes matrices protéiques laitières marquées au ^{15}N . Suite à une étape de screening réalisée en digestion *in vitro*, quatre matrices laitières ont été testées : des caséines micellaires natives (C1), des caséines avec une teneur en calcium réduite (C2 low Ca^{2+}), une matrice contenant un ratio de caséines et de protéines solubles modifié 63 : 37 (CW2), et des protéines solubles (W). Des prises de sang ont été effectuées à $t = 0, 1$ et 3 h après l'ingestion du repas et les rats ont été euthanasiés 6 h après la consommation du repas. Les contenus digestifs ont été collectés pour évaluer les digestibilités des protéines et des acides aminés. L'incorporation de l'azote alimentaire a été mesurée dans différents tissus et les enrichissements en ^{15}N ont été mesurés dans le plasma et l'urine pour évaluer la désamination. Le taux de synthèse protéique fractionnaire (FSR) a été déterminé dans le foie et le muscle avec une injection intraveineuse d'une dose massive de ^{13}C -valine.

Résultats

Des valeurs élevées de digestibilité caecale des protéines autour de 95% , ont été obtenues pour les matrices C1, C2 low Ca^{2+} et W, tandis que CW2 présentait une digestibilité légèrement plus faible de $93,5\%$. De même, les digestibilités caecales individuelles des acides aminés se situaient

entre 96 et 96,6 % pour les matrices C1, C2 low Ca²⁺ et W, mais cette valeur était de 92,4 % pour CW2. La matrice W a présenté un pic de concentration de leucine dans le plasma et une incorporation plus élevée de l'azote alimentaire dans la zone splanchnique (muqueuse intestinale et foie) ainsi que dans les protéines plasmatiques, notamment par rapport aux matrices C1 et C2 low Ca²⁺. Les FSR dans le muscle et le foie étaient comparables après l'ingestion des 4 matrices laitières. Enfin, moins de peptides ont été identifiés dans le caecum des rats après l'ingestion de la matrice W par rapport à C1 et C2 low Ca²⁺.

Conclusion

Cette étude a révélé que la structure de la matrice laitière pouvait avoir un impact sur la digestibilité des protéines, la matrice CW2 ayant la valeur la plus faible. De plus, les résultats ont montré que la matrice de protéines solubles était digérée plus rapidement que les deux matrices à base de caséine, indépendamment de la teneur en calcium, suggérant que les changements structurels liés à la déminéralisation de la caséine n'ont pas modifié sa digestibilité et son métabolisme postprandial.

Protein digestibility and postprandial metabolism of different milk protein matrices in rats

Authors and institutions

Nathalie Atallah^{1,2,3}, Claire Gaudichon¹, Audrey Boulier², Alain Baniel², Benoit Cudennec³, Barbara Deracinois³, Dalila Azzout-Marniche¹, Nadezda Khodorova¹, Martin Chapelais¹, Juliane Calvez¹

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

²Ingredia S.A. 62033 Arras Cedex, France

³Univ Lille INRAE–ICV, 59000 Lille, 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, AP: atom percent, APE: atom percent excess, Asx: asparagine + aspartate, AUC: area under the curve, CASA1: α_{S1} -casein, CASA2: α_{S2} -casein, CASB: β -casein, EA-IRMS: elementary analyzer coupled to isotope ratio mass spectrometry, GC-MS: gas chromatography mass spectrometry, GC-C-IRMS: gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry, FSR: fractional synthesis rate, Glx: glutamine + glutamate, N: nitrogen, n.s.: non-significant, QC: quality control, SD: standard deviation, UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography

Keywords

Milk proteins, digestibility, amino acid, rat, protein matrix

Abstract

Objective: There is currently little evidence linking the structure of a protein to the way that it is digested and assimilated *in vivo*. The aim of this study was thus to analyze the protein digestibility and postprandial metabolism of milk protein matrices obtained by different industrial processes in rats.

Material and methods: The study was conducted on 5-week old Wistar rats that consumed a meal containing different ¹⁵N-labeled milk protein matrices. Four milk matrices were tested: native micellar caseins (C1), caseins low in calcium (C2 low Ca²⁺), a matrix containing a ratio 63:37 of caseins and whey (CW2), and whey proteins (W). Blood samples were taken at t = 0, 1, and 3 h after meal consumption and the rats were euthanized 6 h after meal consumption. Digestive contents were collected to assess protein and amino acid digestibilities. Dietary nitrogen incorporation was measured in different tissues and ¹⁵N enrichments were measured in plasma and urine to evaluate deamination. Fractional protein synthesis rate (FSR) was determined in liver and muscle using a flooding dose of ¹³C valine.

Results: High protein oro-caecal digestibility values around 95% were obtained for C1, C2 low Ca²⁺ and W matrices and CW2 displayed a slightly lower digestibility of 93.5%. Similarly, individual oro-caecal amino acid digestibilities ranged between 96 and 96.6% for C1, C2 low Ca²⁺ and W matrices, but this value was significantly lower for CW2 and was of 92.4%. The W matrix exhibited a peak in plasma leucine concentration and a higher incorporation of dietary nitrogen in the splanchnic area (intestinal mucosa and liver) as well as in plasma proteins, especially compared to the C1 and C2 low Ca²⁺. The FSR in the muscle and liver were comparable after ingestion of the 4 milk matrices. Finally, less peptides were identified in the caecum of the rats after W matrix ingestion compared to C1 and C2 low Ca²⁺.

Conclusion: This study revealed that the structure of the milk protein matrix may have impacted protein digestibility, with the CW2 matrix having the lowest value. Moreover, the results showed that the whey protein matrix was digested more rapidly than both casein-based matrices, regardless of calcium content, suggesting that structural changes linked to demineralization of casein did not modify its digestibility and postprandial metabolism.

1. Introduction

In the past five decades, milk protein extraction has been widely applied at the dairy industry level in order to use these proteins as food ingredients (Fox, 2001). Milk proteins can be categorized into two classes: caseins which represent 80% of the protein content in cow milk, and whey proteins which make up the remaining percentage (Wong et al., 1996). In their native state, both categories of proteins differ in their structure and physicochemical properties. Whey proteins have a well-established globular structure and include β -lactoglobulin, α -lactalbumin and other minor fractions. Caseins have a flexible structure and exist in four types that are more or less phosphorylated. They are known as α_{S1-} , α_{S2-} , β -, and κ -caseins. The particularity of caseins is their ability to interact together and with calcium phosphate to form aggregates known as casein micelles. In contrast with whey proteins, the precise structure of the casein micelle is still a subject of debate and numerous theories exist. However, it is generally accepted that the α_{S1-} , α_{S2-} , and β -caseins are found at the heart of the micelle and that κ -caseins, which are the least phosphorylated, are present at the surface of the micelle, providing it stability and limiting its growth. It is also well established that the calcium phosphate is necessary to maintain the integrity of the micelle (Dalgleish & Corredig, 2012).

The impact of structural and physicochemical properties on the way that whey proteins and caseins are digested has already been well demonstrated. Indeed, the notion of “slow” and “fast” proteins was conceptualized when it was shown that caseins were digested in up to six hours and whey proteins in two hours (Boirie et al., 1997; Mahé et al., 1996). This was explained by the ability of caseins to form curds in the stomach, which delayed gastric emptying, whereas whey proteins remained soluble in acidic conditions and were emptied rapidly from the stomach (Boirie et al., 1997). Moreover, this difference in digestion time also affected protein postprandial utilization. Indeed, after whey protein consumption, dietary nitrogen incorporation into urea was twice as high as after casein and total milk protein ingestion, which was attributed to whey protein-induced hyperaminoacidemia (Lacroix et al., 2006a). Thus, it was concluded that the rate of appearance of amino acids in plasma after ingestion of whey proteins was too rapid to maintain anabolic requirements during the postprandial period, whereas the slower digestion of caseins induced better nitrogen utilization. In terms of protein synthesis, muscle postprandial anabolism

was greater after ingestion of a whey hydrolysate compared to micellar caseins (Tang et al., 2009). The effect of the food matrix on muscle protein synthesis was also demonstrated in old rats that exhibited a lower anabolic rate after whey protein ingestion compared to casein (Berrazaga et al., 2020).

Evaluation of a protein's quality implies its ability to satisfy the nitrogen and amino acid metabolic demands. It is now determined by its composition in indispensable amino acids and their individual digestibility (FAO, 2013) It is now well established that milk proteins have a high nutritional quality as they are rich in indispensable amino acids and have high digestibility values (van Lieshout et al., 2019). However, less is known about how industrial processes affect digestibility and postprandial utilization of milk proteins. In terms of heat treatments, it was observed in a rat study that protein quality of microfiltered milk was maintained after different types of heating, except for spray drying which decreased its digestibility (Lacroix et al., 2006b). The milk that was spray dried also exhibited a higher incorporation of dietary nitrogen into the splanchnic bed compared to milk that was only microfiltered, and to caseins and whey isolates (Lacroix et al., 2006b).

Moreover, it has already been demonstrated that according to the type of processing applied, protein structure can be modified. This is notably the case for casein micelles that undergo demineralization. This demineralization process can be achieved through pH changes (acidification or alkalization) (Silva et al., 2013) or through phosphorus and calcium chelation (de Kort et al., 2011). In the case of acidification, the process results in sodium caseinates which have an irregular shape and porous structure (Coskun, 2015) compared to micellar caseins obtained by membrane filtration that preserves the integrity of the micelle (Dalgleish et al., 2004). In an *in vitro* study using a dynamic digestion model, it was shown that native micellar caseins and sodium caseinates were digested differently (Wang et al., 2018). Indeed, gastric hydrolysis of milk powder containing the native form of caseins was much slower than for sodium caseinate and that was related to its better coagulation ability. Moreover, in a static *in vitro* study, it was shown that demineralized and reticulated caseins generated a different peptide pattern compared to native micellar caseins, suggesting an effect of protein structure on its digestion (Atallah et al., 2020).

Our hypothesis was thus that the processing methods applied to generate milk protein matrices impact their structure and composition, and thus the way that they are digested. Therefore, the aim of our study was to evaluate the digestibility and postprandial utilization of ¹⁵N-labeled caseins and whey proteins obtained by different industrial processes in rats. Four milk protein matrices were tested: native micellar caseins, demineralized micellar caseins (low in calcium), a matrix containing a modified ratio of micellar casein to whey proteins (63:37), and whey proteins.

2. Materials and methods

Labeling and production of the milk protein matrices

The milk was labeled by Ingredia (Arras, France) by providing two cows with water containing 50 g of ¹⁵N ammonium sulfate (99%, (¹⁵NH₄)₂SO₄) twice per day for a period of 9 days. Collection of the milk occurred from the fourth to the ninth day. ¹⁵N-labeled milk was used to produce different milk protein matrices (**Table 1**). Milk was pasteurized (75°C, 15 s) prior to protein extraction, and a total of four protein matrices were obtained by filtration then manufactured with different industrial processes. Two matrices were concentrated in native micellar caseins (C1 and C2 low Ca²⁺) with C2 low Ca²⁺ having the lowest calcium concentration. CW2 was constituted of a modified casein-to-whey ratio (67:33) compared to the one occurring naturally in cow milk (80:20), and the matrix W contained only whey proteins.

Table 1. Characteristics of the milk protein matrices

	Native micellar casein (%)	Whey protein (%)	Calcium (%)	Total protein content (%)
C1	92	8	2.6	83
C2 low Ca²⁺	92	8	1.6	85
CW2	63	37	1.8	81
W	0	100	0.3	81

C: casein; W: whey. The matrices C1 and C2 low Ca²⁺ are casein-based but differ in their calcium concentration, while the CW2 matrix contains both casein and whey proteins. The matrix W is entirely composed of whey proteins. The total protein content was based on nitrogen content x 6.38.

Experimental protocol

The experimental protocol was implemented in compliance with the European Union directive 2010/63/EU for animal experiments and received an approval from the ethics committee in animal experiments of INRAe Jouy-en-Josas (Comethea, registration number: 18-14) and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS n°15907-2018061823133762 v1). Thirty-two male Wistar rats aged 5 weeks at their arrival were acquired from Envigo (Horst, The Netherlands). After a week of adaptation to their new housing, they were placed in individual cages that contained wire-bottoms in order to avoid coprophagia. The rats were on a usual 12h/12h dark-light cycle before being placed on a reversed dark-light cycle (dark period 07:00 to 19:00) at the beginning of the second week of the protocol. The rats were fed commercial laboratory chow during the first week then a standard diet (containing total milk protein as the protein source) (**Table 2**) *ad libitum* during the second week. On the third week, the rats were subjected to an adaptation protocol for 1 week and randomly split into 4 groups according to the milk protein matrices they would consume: native micellar casein (C1), micellar casein low in calcium (C2 low Ca²⁺), whey and protein (CW2), and whey (W). All milk protein matrices were provided by Ingredia (Arras, France). The objective of the adaptation protocol during the third week was to get the rats used to consuming a single meal in a limited time-frame (Tessier et al., 2020). It involved giving them access to a first meal (weighing 4 g in dry weight) that had the same composition as the standard diet but contained the respective protein matrices in isonitrogenous amounts. They had access to this first meal for 30 min (from 09:00 to 09:30) then to the standard diet *ad libitum* for 7 h (from 10:30 to 17:30). The rats were weighed every week-day, temperature was controlled and they had unlimited access to water during the whole experimental protocol.

On the day of euthanasia, the rats consumed the calibrated meals containing the different ¹⁵N-labeled milk protein matrices (n=8/group). Blood was collected from the vein of the tail in the fasting state as well as 1 h, 3 h, and 6 h after meal ingestion. It was then centrifuged and the plasma was stored at -20°C. The rats received an injection at the lateral vein of the tail of [1-¹³C] valine (Eurisotop, Saint Aubin, France) at 150 µmol/100 g of body weight thirty minutes before euthanasia under gaseous anesthesia. Collection of the luminal contents in the stomach, small intestine, ileum (defined as the last 10 cm of small intestine before the caecum), caecum and colon was carried-out by rinsing with NaCl (9%). Feces were gathered over the 6 h postprandial

period. The contents were weighed and stored at -20°C until freeze-drying. The mucosa of the duodenum, jejunum and ileum were scraped, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The gastrocnemius muscle and liver samples were also collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Absorbent papers were placed under the cages in order to retrieve urine during the 6 h postprandial period and the bladder was punctured after euthanasia. The absorbent papers were then rinsed with distilled water and the urine eluates and from the bladder were pooled and stored at -20°C.

Table 2. Composition of the experimental diets

	Standard (g/kg)	diet	Experimental diet (g/kg)
Protein	140		140
Starch	622		622
Sucrose	100		100
Soya bean oil	40		40
Mineral mix	35		35
Vitamin mix	10		10
Cellulose	50		50
Choline	3		3
Protein (%Energy)	14		14
Carbohydrates (%Energy)	75		75
Lipids (%Energy)	11		11

Analytical methods

To assess protein digestibility, determination of the nitrogen percentage and ¹⁵N enrichment in the digestive contents and meals was performed with an elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar) coupled with isotopic ratio mass spectrometry (Isoprime; GV instrument) (EA-IRMS). Two standards were used: atropine (Thermo Electron) which served as an elemental standard, and L-glutamic acid (USGS41; Sigma Aldrich) which was used as an isotopic standard.

Individual amino acid digestibility was determined by determining the ¹⁵N-amino acid enrichment and amino acid content in the digestive contents recovered from the caecum and in the meals.

Thus, 100 mg of meal and caecum samples were weighed and hydrolyzed for 24 h with HCl 6N at 110°C. Amino acid isolation was then performed with a hydrogen form resin (Dowex 50WX8 hydrogen form 100–200 mesh; Sigma-Aldrich) and derivatized with ethylchloroformate (Fromentin et al., 2012). Determination of the ^{15}N -enrichment in each amino acid was obtained with gas chromatography (GC 6890 N, Agilent Technologies) coupled to an Isoprime isotope ratio mass spectrometer (Isoprime; GV Instruments) via the GC5 Isoprime interface (GC-C-IRMS), as previously described (Tessier et al., 2020). Quantification of amino acids was established by weighing 10 mg of meal and digestive samples and hydrolyzing them for 24 h at 110°C with HCl 6N and norvaline as an internal standard. Calibration standards containing an amino acid mixture (Waters) and norvaline were also prepared. Samples and standards were derivatized using the AccQTag Ultra Derivatization Kit (Waters) according to the manufacturer's protocol. Amino acid analyses were then performed using an ultra-high-performance liquid chromatography system (UHPLC, Acquity H-class, Waters) with a photodiode array detector (260 nm; Waters) and an AccQ-Tag amino acid C18 column (2.1 × 100 mm; 1.7 μm bead size; Waters), as previously described (Tessier et al., 2020).

In vivo protein synthesis rates in the gastrocnemius muscle and liver were determined using the [^{13}C]-valine flooding dose method as previously described (Chevalier et al., 2013; Oberli et al., 2015). Briefly, the protein-bound and free amino acid fractions were separated in each tissue by precipitation then hydrolyzed. The free amino acid fraction was derivatized using N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide mixed with 1% tert-butyltrimethylchlorosilane and acetonitrile (Sigma-Aldrich). Gas chromatography (GC 6890N, Agilent Technologies, Les Ulis, France) coupled to mass spectrometry (MS 5973N, Agilent Technologies) (GC-MS) with electron impact ionization and selected ion monitoring (ions mass-to-charge ratio 288 and 289) was used to estimate [^{13}C]-valine enrichment in the free amino acid fraction. The protein-bound amino acid fraction was derivatized using propanol and acetyl chloride (Sigma-Aldrich). Enrichment in [^{13}C]-valine was analyzed using a GC-C-IRMS).

Plasma concentration of free amino acids 0 to 6 h after meal ingestion was determined by precipitating the samples with sulfosalicylic acid with norvaline as internal standard. The supernatant was derivatized with the AccQTag Ultra Derivatization Kit (Waters). Calibration

standards containing the Waters amino acid mixture, to which norvaline, asparagine, glutamine and tryptophan were added were prepared and derivatized. Analysis was conducted using the UHPLC. ¹⁵N enrichment in plasma protein as well as in the mucosae of the duodenum, jejunum and ileum was determined by EA-IRMS after freeze-drying of the samples.

Total urea in urine and plasma was estimated by the Urease-Berthelot method (Urea assay, Randox, Crumlin, UK). Plasma was separated in protein, free amino acid, and urea fractions as previously described (Bos et al., 2005). EA-IRMS was then used to determine the ¹⁵N-enrichment in plasma fraction and urine, with L-glutamic acid (USGS41, Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA) as an isotopic standard.

Peptide molecular weight profiles in the caecum contents were obtained by Size Exclusion Chromatography as previously described (Atallah et al., 2020) using a Superdex Peptide 10/300 GL column (10 × 300 – 310 mm, 13 µm, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) coupled to an AKTA Purifier Protein Purification System (GE Healthcare). Column calibration was done using known standard peptides (cytochrome C, 12,400 Da; aprotinin, 6500 Da; vitamin B12, 1355 Da; and glutathione 307.3 Da). The peptide molecular weight distribution was obtained by determining the relationship between Log of molecular weight of standard peptides and the elution volume. Peptide content estimation was then expressed as a percentage of the total profile area and referred to as area under the curve (AUC).

Peptide sequence identifications in the caecal digesta samples were performed as previously described (Atallah et al., 2020). The dried caecum samples were rehydrated then purified in order to remove remaining salts and sugars by adding samples to a C18 solid phase extraction (SPE) with Bond Elut C18 1000 mg minicolumns (Agilent Technologies). Samples were then analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS). Mass spectrometry measurements were made in sensitivity- and positive-mode using the proprietary MassLynx software (version 4.1, Waters). Database searches were performed on PEAKS studio v8.5 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) using the UniProt database restricted to the *Bos taurus* organism. Raw data were then imported to Progenesis Q1 for proteomics 4.1 software (Nonlinear Dynamics,

Newcastle upon Tyne, UK) and then exported back to PEAKS studio v8.5 as described (Atallah et al., 2020).

Calculations

Dietary nitrogen (N_{diet} , mmol) was determined using the formula as follows:

$$N_{\text{diet}} = N_{\text{tot}} \times \frac{APE_{\text{digesta}}}{APE_{\text{meal}}}$$

Where N_{tot} represents the total amount of nitrogen in the sample and APE the enrichment excess of ^{15}N in the sample and meal. APE is defined as the enrichment of the sample in atom percent (AP) minus the natural enrichment.

As amino acids and peptides absorption mainly occurs in the duodenum and jejunum parts of the small intestine, the dietary N losses were estimated in the most distal part of the intestine (ileum to large intestine including feces). Orofecal digestibility (%) was calculated with the following formula:

$$\text{Orofecal digestibility} = 100 \times \frac{N_{\text{ing}} - (N_{\text{diet ileum}} + N_{\text{diet caecum}} + N_{\text{diet colon+feces}})}{N_{\text{ing}}}$$

Where N_{ing} stands for the quantity of nitrogen ingested by the rats (in mmol).

Orocaecal digestibility (%) was used as a proxy of ileal digestibility (Guillin et al., 2020; Tessier et al., 2020) in order to have enough digesta for the determination of isotopic enrichment. Since digesta collection occurred 6 h after ingestion, it was a compromise between complete digestion and minimal duration of fermentation of digesta in the caecum. To estimate the non-absorbed dietary amino acids (AA_{diet} , mmol) in the intestinal tract and recovered in the digesta, the following formula was used:

$$AA_{\text{diet}} = AA_{\text{tot}} \times \frac{APE_{\text{sample}}}{APE_{\text{meal}}}$$

Where AA_{tot} expresses the total amount of amino acids present (mmol) and APE the enrichment excess of ^{15}N for each individual amino acid in the sample and meal. APE is defined as the enrichment of the sample in atom % (AP) minus the natural enrichment for each amino acid.

The oro-caecal digestibility (%) of each individual amino acid was then determined as follows:

$$AA \text{ oro-caecal digestibility} = 100 \times \frac{AA_{ing} - AA_{diet \text{ caecum}}}{AA_{ing}}$$

Where AA_{ing} is the total amount of ingested amino acids (mmol) and $AA_{diet \text{ caecum}}$ is the amount of dietary amino acids (mmol) recovered in the caecum.

Urea was assumed to be uniformly distributed throughout the total body water and dietary nitrogen recovered in the urea body pool (mmol) was calculated with the following formula:

$$N_{diet \text{ urea}} = C_{urea} \times 2 \times \frac{0.67}{0.92} \times BW \times \frac{APE_{urea}}{APE_{meal}}$$

Where C_{urea} represents the concentration of plasma urea (mmol/L), BW the body weight of the rat (kg), APE_{urea} the ^{15}N -enrichment excess of urea in plasma sample, and APE_m the ^{15}N -enrichment excess of the meal. The percentages of body water and of water in plasma in the rats are assumed to be 67 % and 92 % respectively (Sharp et al., 1998). The dietary nitrogen recovered in the urinary urea (mmol) was calculated assuming that the urinary ^{15}N -enrichment is a proxy of the urinary urea ^{15}N -enrichment and according to the following formula:

$$N_{diet \text{ urinary urea}} = C_{urinary \text{ urea}} \times V_{eluate} \times 2 \times \frac{APE_{urine}}{APE_{meal}}$$

Where $C_{urinary \text{ urea}}$ is the concentration of urea in the eluated urine sample (mmol/L), V_{eluate} is the total volume of eluated urine (L), APE_{urine} is the ^{15}N -enrichment excess in eluated urine sample, and APE_m is the ^{15}N -enrichment excess of the meal. The total amount of dietary nitrogen transferred to urea was obtained from the sum of the dietary nitrogen excreted in urinary urea and the dietary nitrogen recovered in the body urea pool.

The dietary nitrogen recovered in proteins of organs or plasma (mmol) was calculated as follows:

$$N_{\text{diet}} = N_{\text{tot organ}} \times \frac{APE_{\text{sample}}}{APE_{\text{meal}}}$$

Where $N_{\text{tot organ}}$ is the total nitrogen (mmol) in the organ or plasma protein and APE is the enrichment excess of ^{15}N in the sample and meal. The dietary nitrogen recovered in the different tissues was calculated with respect to organ weight. In plasma proteins, plasma was assumed to represent 3.5% of body weight for the calculation (Waynforth & Flecknell, 1992). For the different mucosae tissues, values were expressed as %/100mg of tissue.

The fractional protein synthesis rate (FSR, expressed in %/day) in the organs and tissues was obtained with the following formula:

$$\text{FSR} = \frac{E_{\text{protein-bound Valine}} - E_{\text{basal}}}{E_{\text{free Valine}} \times t_{\text{inc}}} \times 24 \times 60 \times 100$$

Where $E_{\text{free Valine}}$ and $E_{\text{protein-bound Valine}}$ represent the ^{13}C -valine enrichments in the free and protein-bound amino acids, respectively. E_{basal} is the value of the non-enriched leucine in the same sample, as a surrogate of basal valine enrichment (Boutry et al., 2011). Moreover, t_{inc} is the time of incorporation of ^{13}C -valine (in min) between the injection and euthanasia (30 min on average). The factors 24 (h) and 60 (min) were used to calculate the value in % per day (Chevalier et al., 2013).

Statistical analyses

All results are expressed as mean \pm SD. The effect of the group was tested using a one-way ANOVA and Post hoc Bonferroni tests were applied for pairwise comparisons. Graphpad prism 8.2.1 was used for the ANOVA tests. Otherwise, mixed linear models with repeated measures were performed with the software R version 3.5.2 to test differences between groups over time. Differences were considered statistically significant with a P-value < 0.05.

3. Results

Body weight and food intake

No difference in body weight gain and food intake (data not shown) was observed between the 4 groups of rats. The final body weights were 291.8 ± 16.33 g, 291.8 ± 14.08 g, 288.03 ± 16.47 g and 290.29 ± 17.19 g for the rats consuming the C1, C2 low Ca²⁺, CW2 and W matrix respectively.

Table 3. Dietary nitrogen (expressed as % of ingested nitrogen) recovered in gastrointestinal tract contents according to the protein matrix

	C1	C2 low Ca²⁺	CW2	W	P value
Stomach	1.02 ± 1.71	0.55 ± 1.20	0.93 ± 1.37	0.14 ± 0.09	<i>n.s.</i>
Small intestine	0.87 ± 1.18	1.11 ± 0.49	1.04 ± 0.52	0.97 ± 0.36	<i>n.s.</i>
Ileum	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	<i>n.s.</i>
Caecum	4.61 ± 1.06^a	4.10 ± 0.67^a	6.05 ± 1.13^b	4.60 ± 0.98^a	<i>0.005</i>
Colon + feces	0.96 ± 0.81	1.09 ± 0.64	1.23 ± 0.93	0.78 ± 0.39	<i>n.s.</i>

Values are mean \pm SD, n = 8 rats /group. The effect of the protein matrix was tested with a one-way ANOVA model.

Values with different letters within the same row are statistically different ($P < 0.05$). *n.s.*, not significant.

Dietary nitrogen recovery

Table 3 expresses the quantity of dietary nitrogen collected in the different portions of the gastrointestinal tract according to the protein matrix ingested by the rats. The majority of the dietary nitrogen was recovered in the caecum of rats. A significant effect of the matrix was observed in the caecum with a significantly higher amount of dietary nitrogen after ingestion of CW2 in comparison to C1 ($P = 0.048$), C2 low Ca²⁺ ($P = 0.004$) and W ($P = 0.046$). No significant difference between the milk protein matrices was noted in the other segments of the gastro-intestinal tract.

Table 4. Amino acid and nitrogen digestibility of the different milk protein matrices

	C1	C2 low Ca²⁺	CW2	W	P value
Indispensable AA oro-caecal digestibility (%)					
Isoleucine	96.0 ± 1.3 ^a	95.5 ± 0.9 ^a	92.5 ± 1.4 ^b	96.0 ± 1.1 ^a	< 0.0001
Leucine	97.4 ± 0.7 ^a	97.4 ± 0.5 ^a	93.5 ± 1.4 ^b	96.1 ± 1.1 ^a	< 0.0001
Lysine	97.7 ± 0.8 ^a	97.6 ± 0.8 ^a	94.5 ± 1.2 ^b	94.4 ± 2.1 ^b	< 0.0001
Methionine	96.9 ± 0.9 ^a	97.5 ± 0.4 ^{ab}	96.7 ± 0.7 ^a	98.1 ± 0.6 ^b	0.003
Phenylalanine	97.5 ± 1.7 ^a	97.6 ± 0.6 ^a	94.3 ± 2.0 ^b	97.5 ± 0.6 ^a	< 0.0001
Threonine	97.4 ± 0.6 ^a	97.4 ± 0.3 ^a	96.5 ± 0.8 ^b	97.8 ± 0.7 ^a	0.003
Valine	96.6 ± 1.2 ^a	96.0 ± 0.5 ^a	90.6 ± 1.9 ^b	96.2 ± 1.2 ^a	< 0.0001
Dispensable AA oro-caecal digestibility (%)					
Alanine	98.6 ± 0.8 ^a	97.0 ± 0.8 ^b	98.0 ± 0.8 ^a	98.2 ± 0.9 ^a	0.006
Asx	97.3 ± 0.9 ^a	95.8 ± 0.7 ^a	90.0 ± 1.8 ^b	97.2 ± 1.0 ^a	< 0.0001
Glycine	97.4 ± 1.1	97.4 ± 0.8	96.7 ± 0.8	97.5 ± 0.6	n.s.
Glx	96.0 ± 1.7 ^a	94.7 ± 1.4 ^a	87.9 ± 2.1 ^b	97.0 ± 1.4 ^a	< 0.0001
Proline	94.8 ± 1.7 ^a	94.0 ± 1.8 ^{ab}	91.4 ± 3.3 ^b	95.7 ± 1.2 ^a	0.004
Serine	95.5 ± 1.8	95.5 ± 1.2	95.3 ± 1.1	96.7 ± 1.2	n.s.
Tyrosine	98.8 ± 0.3 ^a	98.5 ± 0.1 ^a	96.5 ± 0.8 ^b	98.4 ± 0.7 ^a	< 0.0001
Average AA digestibility¹ (%)	96.6 ± 0.9 ^a	96.0 ± 0.6 ^a	92.4 ± 1.4 ^b	96.6 ± 1.0 ^a	< 0.0001
Nitrogen digestibility (%)					
Orofecal digestibility	93.9 ± 1.2 ^a	94.4 ± 0.7 ^a	92.1 ± 1.2 ^b	94.2 ± 0.7 ^a	0.0004
Orocaecal digestibility	94.9 ± 1.0 ^a	95.5 ± 0.9 ^a	93.5 ± 1.0 ^b	95.2 ± 0.9 ^a	0.002

Values are mean ± SD, n = 8 rats /group. ¹Average digestibility was calculated from the mean amino acid digestibilities weighted by the proportion of each amino acid in the protein matrix. The effect of the protein matrix was tested with a one-way ANOVA model. Values with different letters within the same row are statistically different (P < 0.05). n.s., not significant. AA, amino acid; Asx, aspartate + asparagine; Glx, glutamate + glutamine.

Digestibility of nitrogen and amino acids

Nitrogen and individual amino acid digestibility values for the different rat groups are presented in **Table 4**. High values of nitrogen digestibility were found for the 4 milk protein matrices ranging from 92.1% for CW2 matrix to 94.4% for C2 low Ca²⁺ for orofecal digestibility, and from 93.5% for CW2 to 95.5% for C2 low Ca²⁺ for oro-caecal digestibility. Both orofecal and oro-caecal nitrogen digestibility were significantly lower for the matrix CW2 in comparison to C1 (P = 0.008 and P =

0.05, for orofecal and oro-caecal digestibility respectively), C2 low Ca²⁺ (P < 0.001 and P = 0.002, for orofecal and oro-caecal digestibility respectively) and W (P = 0.003 and P = 0.01, for orofecal and oro-caecal digestibility respectively). Regarding individual amino acid digestibility values, their average oro-caecal digestibility varied from 92.3% for CW2 to 96.7% for C1, and the same tendency was observed for CW2 which had a significantly lower value compared to the other matrices (P < 0.0001). Indeed, the oro-caecal digestibility was lower for the CW2 matrix for most of the individual amino acids except for methionine, alanine, glycine, and serine.

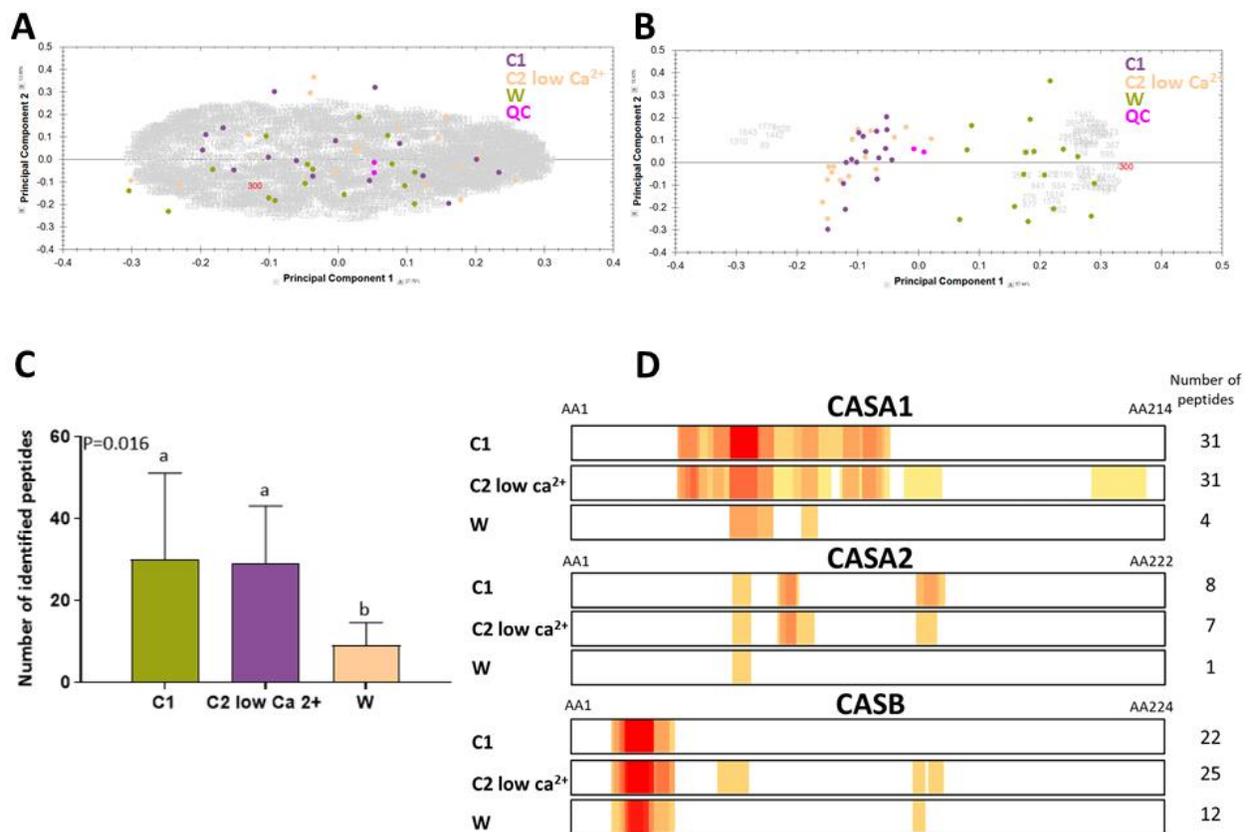


Figure 1. Principal Component Analysis (PCA) of all detected peptides (A) and the most relevant peptides detected (B) in the caecum of rats (n = 8 /group). Grey and red numbers correspond to the identified peptides displaying a mass signal intensity > to 1 × 10⁵ and an Anova with P < 0.005. (C) corresponds to the number of identified peptides and is expressed as mean ± SD. (D) corresponds to the heat map of the main caseins identified. The colors from yellow to red express the frequency of the peptide identified from the lowest to the highest. QC, quality control; CASA1, α₁-casein; CASA2, α₂-casein; CASB, β-casein.

Peptide identification in the caecum

Figure 1 represents the peptides detected in the caecal digesta according to the different matrices ingested. The CW2 matrix was not included in the results because the samples of the CW2 rats were not analyzed at the same time as the other matrices. The PCA in **Fig.1A** presents all the peptides detected before application of the mass signal intensity filters and was generated using the first two dimensions (PC1 = 27.76% and PC2 = 13.99%). The PCA in **Fig.1B** presents all the peptides identified after application of the mass signal intensity filters and was generated using the first two dimensions (PC1 = 57.44% and PC2 = 10.43%) as well. While the peptides detected were very dispersed in **Fig.1A**, two clusters appeared in **Fig.1B**: one comprising the C1 and C2 low Ca²⁺ matrices and one comprising the W matrix. In terms of number of peptides identified (**Fig.1C**), significantly more peptides were identified when C1 and C2 low Ca²⁺ were compared to W. Finally, the heat maps (**Fig.1D**) show the digestion resistant zones found for the main caseins present in the matrices. For CASA1, the same digestion resistant zones were found within C1 and C2 low Ca²⁺ except that C2 low Ca²⁺ exhibited more resistant zones towards the end of the sequence. Very little resistant zones were identified for W. For CASA2 the patterns were overall the same for C1 and C2 low Ca²⁺ and only one zone of digestion was found for W. For CASB, the same resistant zones were identified for all three matrices but C2 low Ca²⁺ exhibited one additional zone of resistance.

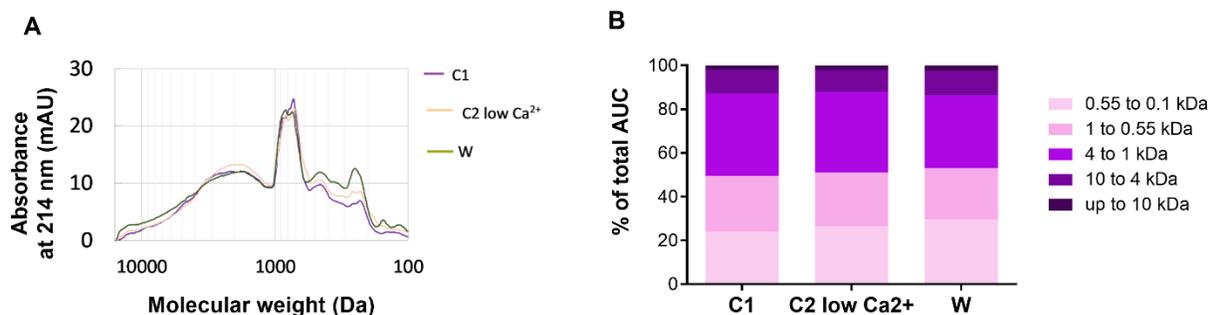


Figure 2. Molecular weight profiles obtained in the caecum digesta according to the different matrices (A) and the mean molecular weight distribution expressed in percentage of total area under the curve (AUC) (B).

Molecular weight profiles in the caecum

Figure 2 shows the peptide profile and the mean molecular weight distribution in the caecum according to the different protein matrices. The CW2 matrix was not included in the results because the samples of the CW2 rats were not analyzed at the same time as the other matrices. A similar overall molecular weight profile was obtained between all matrices (**Fig.2A**). However, it seems that C1 exhibited a larger area under the curve for apparent molecular weights comprised between 600 and 800 Da. Differences in percentage of total area under the curve (**Fig.2B**) also occurred for lower apparent molecular weight peptides, especially for molecular weights comprised between 100 and 500 Da as the W matrix seemed to exhibit a larger surface area compared to C1 and C2 low Ca²⁺.

Table 5. Transfer of dietary nitrogen to the urea pool and to the liver and gastrocnemius muscle (expressed as % of ingested nitrogen) 6 h after ingestion of the different protein matrices

	C1	C2 low Ca ²⁺	CW2	W	P value
Body urea pool	2.53 ± 1.14	2.57 ± 1.36	3.22 ± 2.09	2.50 ± 1.47	<i>n.s.</i>
Urinary urea pool	5.91 ± 2.13	5.22 ± 1.88	8.05 ± 3.73	6.69 ± 1.55	<i>n.s.</i>
Total deamination	8.44 ± 2.44	7.79 ± 2.13	11.27 ± 4.85	9.19 ± 2.02	<i>n.s.</i>
Liver ¹	12.58 ± 1.92 ^a	11.42 ± 1.45 ^a	14.79 ± 3.93 ^a	19.55 ± 2.06 ^b	< 0.0001
Gastrocnemius muscle ¹	0.50 ± 0.08 ^a	0.41 ± 0.07 ^a	0.51 ± 0.12 ^a	0.65 ± 0.13 ^b	0.0006

Values are mean ± SD, n = 8 rats /group. ¹ expressed as % of ingested nitrogen /organ. The effect of the protein matrix was tested with a one-way ANOVA model. Values with different letters within the same row are statistically different (P < 0.05). *n.s.*, not significant.

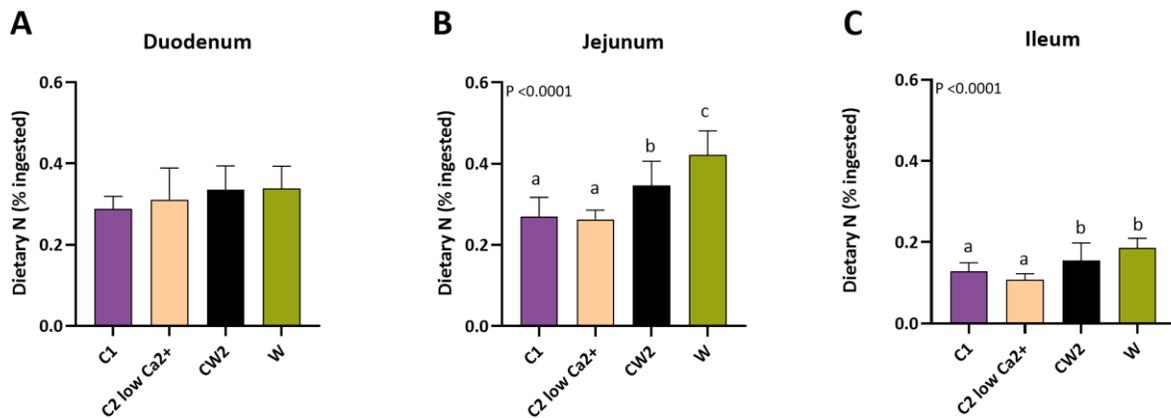


Figure 3. Transfer of dietary nitrogen to mucosa of the duodenum (A), jejunum (B) and ileum (C). Values are presented as % of dietary nitrogen incorporated in 1 g of mucosae and expressed as mean \pm SD, n = 8 rats /group. The effect of the protein matrix was tested with a one-way ANOVA model. Values with different letters within an intestinal segment are statistically different ($P < 0.05$).

Postprandial distribution of dietary nitrogen

Table 5 represents the incorporation of dietary nitrogen into the body and urinary urea pools and into organs 6 h after meal ingestion, according to the different rat groups. No significant difference was observed between the matrices on the quantity of dietary nitrogen transfer to body or urinary urea pool and consequently, no difference was found on the total deamination with values ranging from 7.8% for the C2 low Ca²⁺ to 11.3% for the CW2 group. A significant effect of group was found on the incorporation of dietary nitrogen into the liver and gastrocnemius muscle 6 h after meal. The group of rats consuming the W matrix showed a significantly higher incorporation of dietary nitrogen in the both liver ($P < 0.0001$ for C1 and C2 low Ca²⁺, $P = 0.007$ for CW2) and gastrocnemius muscle ($P = 0.02$ for C1, $P < 0.001$ for C2 low Ca²⁺ and $P = 0.04$ for CW2) in comparison to the other groups.

Figure 3 presents the incorporation of dietary nitrogen in the different portions of the small intestine 6 h after the ingestion of the 4 milk protein matrices. There was no difference in the duodenum, but differences between groups were found in the more distal parts of the small

intestine. Significantly higher dietary nitrogen was found after ingestion of CW2 in the jejunum in comparison to C1 ($P = 0.04$) and C2 low Ca^{2+} ($P = 0.02$) and even higher after ingestion of the W matrix in comparison to the 3 others ($P < 0.001$ for C1 and C2 low Ca^{2+} and $P = 0.02$ for CW2). In the ileum, incorporation of dietary nitrogen was significantly higher when CW2 was compared to C2 low Ca^{2+} ($P = 0.009$) and the incorporation was higher for W compared to C1 ($P = 0.001$) and C2 low Ca^{2+} ($P < 0.001$).

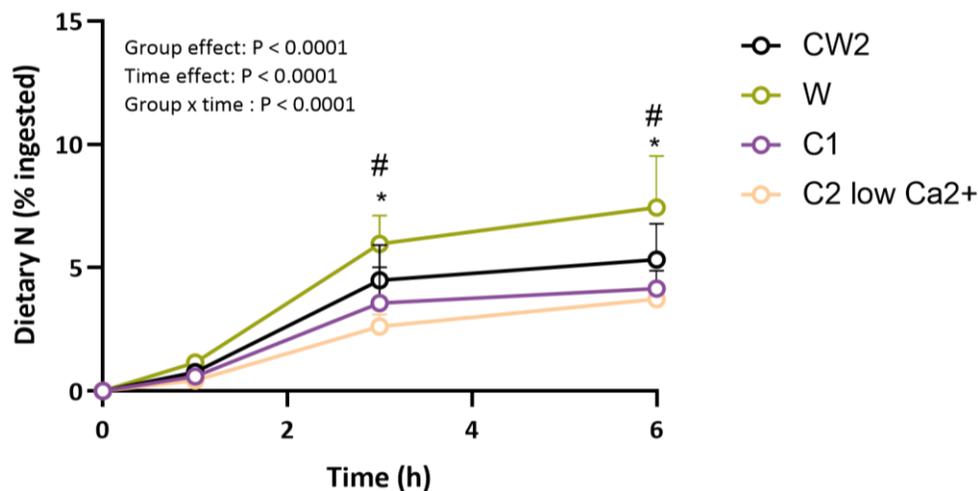


Figure 4. Incorporation of dietary nitrogen to plasma proteins over the 6-hour postprandial period. Values are mean \pm SD, $n = 8$ rats. The group and protein matrix effects were tested through mixed linear models with repeated measures with * indicating a significant difference ($P < 0.05$) between CW2 and C2 low Ca^{2+} and # indicating a significant difference ($P < 0.05$) between W and all the other protein matrices.

Incorporation of dietary nitrogen to plasma proteins over time

Figure 4 represents the incorporation of dietary nitrogen to plasma proteins according to the different matrices over the 6-hour postprandial period. A significant effect of group and time were observed during the whole postprandial period. Starting from 3 h after ingestion, the W matrix starts to differentiate from the other matrices as it incorporated more dietary nitrogen to plasma proteins compared to CW2 ($P = 0.01$), C1 ($P < 0.0001$) and C2 low Ca^{2+} ($P < 0.0001$). 6 h after ingestion, the W matrix still showed the highest incorporation of dietary nitrogen compared to CW2 ($P = 0.0001$), C1 ($P < 0.0001$) and C2 low Ca^{2+} ($P < 0.0001$). The CW2 matrix also incorporated

significantly more dietary nitrogen into plasma protein compared to the C2 low Ca²⁺ 3 h and 6 h after meal ingestion (P = 0.001 and P = 0.003, respectively). While there was no significant difference between CW2 and C1 at 6 h, a trend was observed with CW2 showing a higher incorporation of dietary nitrogen (P = 0.06). During the entire postprandial period, no difference between the casein-based matrices, C1 and C2 low Ca²⁺, were observed.

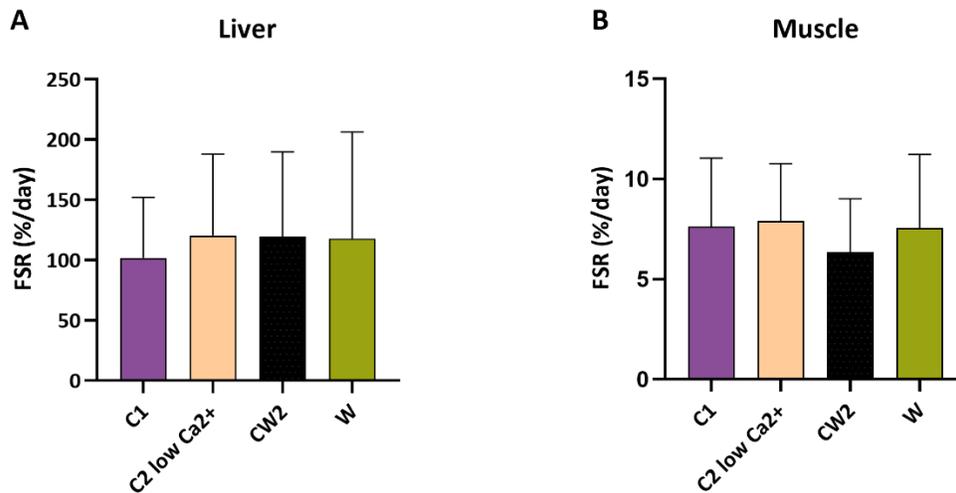


Figure 5. Fractional synthesis rate (FSR) in the liver (A) and (B) gastrocnemius muscle 6 h after the meal. Values are mean \pm SD, n = 8 rats /group. The effect of the protein matrix was tested with a one-way ANOVA model.

Protein anabolism

Figure 5 shows the FSR in the liver and gastrocnemius muscle according to the different milk protein matrices ingested. No significant difference between the protein matrix groups was pointed out in either the liver or the gastrocnemius muscle. The FSR was approximately ranged from around 100 to 120 %/day for all groups in the liver, and this value was around 7% for all groups in the gastrocnemius muscle.

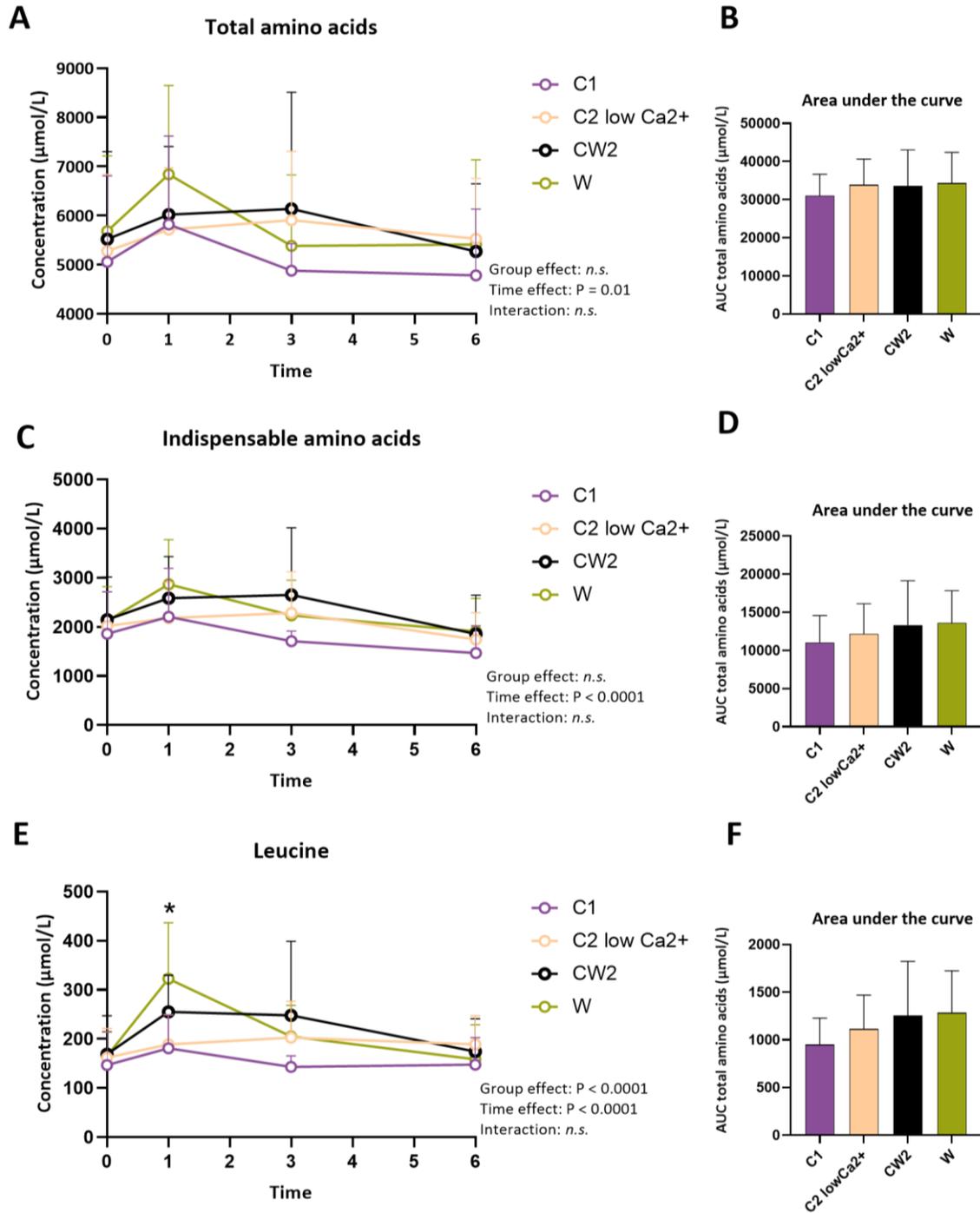


Figure 6. Plasma concentrations and the associated area under the curve (AUC) of total amino acids (A, B) indispensable amino acids (C, D), and leucine (E, F). Values are expressed as mean \pm SD, $n = 8$ rats/group. The group and time effects were tested through mixed linear models with repeated measures for the plasma amino acid concentrations and with a one-way ANOVA model for the area under the curve. *n.s.*, not significant. * indicates a significant difference ($P < 0.05$) between W and the groups C1 and C2 low Ca^{2+} within a time point.

Postprandial plasma amino acid kinetics

Figure 6 represents plasma amino acid kinetics from the fasting state to 6 h after ingestion of the protein matrices. A significant effect of time was observed for total and indispensable amino acid kinetics, as well as leucine kinetics, with an increase in amino acid concentrations after meal ingestion and a return to basal level at 6 h. The casein-based matrices (C1 and C2 low Ca²⁺) exhibited a prolonged plateau over 6 h after meal ingestion, however no significant effect of group was observed on total or indispensable amino acid kinetics. In contrast, leucine kinetics was influenced by groups and ingestion of the W matrix induced a significantly higher peak of leucine at 1 h after meal intake in comparison to C1 (P = 0.004) and C2 low Ca²⁺ (P = 0.006). No difference on the AUC for total and indispensable amino acids or leucine between the groups of rats was demonstrated.

4. Discussion

The aim of this study was to characterize the digestibility and postprandial utilization of ¹⁵N-labeled milk protein matrices obtained by different industrial processes in rats. The matrices included two micellar casein-based matrices with varying calcium concentrations (C1 and C2 low Ca²⁺), a modified ratio of whey-to-micellar casein matrix (CW2) and a whey-based matrix (W). The number of identified peptides was significantly lower in the caecum content for the whey matrix and exhibited fewer zones that were resistant to digestion compared to the two other casein-based matrices. However, digestibility of whey was comparable to casein matrices whereas we observed a slightly lower digestibility value for the matrix contained a modified ratio of whey proteins and caseins (CW2) in comparison to the 3 other matrices. Moreover, a higher incorporation of dietary nitrogen into plasma proteins, intestinal mucosa, liver and muscle was obtained 6 h after ingestion of the whey matrix compared to the other matrices, whereas no differences in protein synthesis in the muscle or liver were observed.

Milk proteins are considered as high-quality proteins and are therefore known to display amongst the highest digestibility values for dietary proteins. Accordingly, in humans, total milk protein exhibited a true ileal nitrogen digestibility value of 95% (Gaudichon et al., 2002). The true ileal

nitrogen digestibility of casein was estimated to be of 94% and 98% in humans and pigs respectively (Deglaire et al., 2009) and was around 94 to 95% in rats (Lacroix et al., 2006b). In some studies, whey proteins demonstrated even higher digestibility, with values around 98% in rats (Lacroix et al., 2006b). Our results are partly in accordance with these previously published studies as the true oro-caecal digestibility of the casein-based matrices were comprised between 94.9 and 95.5% for nitrogen and 96.0 and 96.6% for mean amino acid digestibility. Moreover, we found an oro-faecal nitrogen digestibility of 94% for the C1 matrix, which was comparable to the one obtained for the same matrix in a previous study (Atallah et al., ongoing submission). However, we observed a slightly lower digestibility of whey protein (95.2% and 96.6% for nitrogen and mean amino acid oro-caecal digestibility, respectively) in comparison to previously published data. These slight discrepancies may be due to differences in methodology or in the whey protein used. We also studied a milk protein matrix that had a modified whey-to-micellar casein ratio (63:37; CW2). Surprisingly, the rats consuming this matrix displayed a higher amount of dietary nitrogen in the caecum 6 h after ingestion. Accordingly, the caecal digestibility of this matrix was slightly lower for both nitrogen (93.5%) and mean amino acid (92.4%) in comparison to all the other matrices, and was lower than values obtained for total milk proteins in the literature. Indeed, total milk proteins which contain a casein-to-whey ratio of 80:20 had a true caecal nitrogen digestibility of 96% in rats (Lacroix et al., 2006b). An increase in the whey protein content could have thus possibly led to additional interactions between whey proteins and caseins which resulted in structural changes that made the CW2 matrix a little less digestible. Indeed, this could be explained by a higher amount of free thiol groups available from β -lactoglobulin which led to an increase in the formation of disulfide bonds between caseins and whey proteins (Zhao et al., 2016).

An interesting characteristic amongst the different milk proteins is that casein is considered as a slowly digested protein whereas whey protein is considered as a rapidly digested protein (Boirie et al., 1997). This has been demonstrated previously with differences in plasma amino acid profile (Boirie et al., 1997; Hall et al., 2003; Lacroix et al., 2006a) and gastric emptying rate (Mahé et al., 1996) in human clinical trials. Indeed, after the consumption of whey protein isolate, a peak in plasma amino acid concentration occurred 1 h after ingestion then started to decrease drastically,

while casein ingestion resulted in a slowly descending plateau over the 8-hour postprandial period (Lacroix et al., 2006a). We did not clearly observe this plasma amino acid concentration profile in our study after ingestion of the different milk protein matrices. This may be due to the fact that our protein matrices were given in a mixed meal that included lipids and carbohydrates which could have decreased gastric emptying and minimized potential kinetics differences (Gaudichon et al., 1999; Mahé et al., 1995). However, the rats that consumed the whey protein meal exhibited a peak of leucine in the plasma 1 h after ingestion in comparison to the two other casein-based matrices, whereas no difference was observed with the CW2 matrix. The whey protein matrix presents a high leucine content (**Supplemental table S1**) and it has been previously observed that whey proteins presented a more rapid rate of appearance of leucine in plasma compared to caseins (Tang et al., 2009). Consistently, the moderately high leucine content of the CW2 matrix together with its lower digestibility resulted in a slight plateau-type increase of plasma leucine whereas no increase was observed for the casein matrices.

Thanks to ¹⁵N-labelling of the milk protein matrices, we evaluated the incorporation of dietary nitrogen in the splanchnic area (intestinal mucosa, liver) as well as in plasma protein and muscle. At the end of the 6-h postprandial period, the rats consuming the whey protein matrix presented a higher incorporation of dietary nitrogen into the splanchnic area with higher dietary nitrogen in the liver and in the jejunal and ileal mucosa. Similarly, an increased incorporation of dietary nitrogen was observed in plasma proteins and in periphery in the muscle 6 h after whey protein meal ingestion. The increased incorporation in plasma proteins was also observed as soon as 3 h after whey protein intake. The higher splanchnic and peripheral uptake of dietary nitrogen from whey was probably linked to the higher speed of digestion of whey proteins. In contrast, in a previously published study, no difference was found between whey protein and micellar caseins in terms of dietary nitrogen transfer to the liver and medial or distal intestinal mucosa of rats 6 h after meal intake (Lacroix et al., 2006b). These contradictory results could be explained by the difference in processing method used to obtain the milk protein powders, which could have in turn affected the protein structure (Sawyer et al., 2002). In the study by Lacroix *et al.*, both the micellar caseins and whey protein isolate were obtained through filtration and underwent very little heat treatment that reached a temperature of 35°C, whereas the milk protein matrices that

were tested in our study were pasteurized and thus received a higher temperature treatment. We also determined the transfer of dietary nitrogen to body and urinary urea. We reported a postprandial deamination of milk proteins ranging from 8 to 11% and no difference between the protein matrices. Values of postprandial deamination ranging from 8% to 20% have been previously reported depending of the size of the meal, the habitual protein intake and the time after meal ingestion in rats (Lacroix et al., 2006b; Morens et al., 2000). Had we evaluated the postprandial kinetics of dietary nitrogen transfer to urea, a difference might have been observed, since transfer of dietary nitrogen to urea was quicker for whey proteins and reached a peak 2 h after ingestion compared to caseins or total milk proteins in a human clinical trial (Lacroix et al., 2006a)

Despite higher incorporation of dietary nitrogen in muscle and liver, and a peak of plasma leucine after whey protein ingestion, no difference in terms of protein synthesis was found in the gastrocnemius muscle and the liver compared to the other matrices. In the literature, the effect of different milk proteins on the stimulation of muscle protein synthesis has been evaluated and is highly dependent of the structure of the matrix and the composition in amino acids of the milk proteins. By instance, in healthy volunteers, no difference in muscle protein anabolism was found after ingestion of whey proteins vs calcium caseinates (Reitelseder et al., 2011) and after ingestion of whey proteins vs micellar caseins (Tipton et al., 2004). In contrast, greater postprandial muscle anabolism was demonstrated after whey hydrolysate ingestion compared to micellar casein (Tang et al., 2009). In our study, we found a FSR of around 100-110%/day in the liver and around 5-7%/day in the muscle 6 h after ingestion of the four milk protein matrices. Milk proteins are high in quality and are known to stimulate protein synthesis (Elliot et al., 2006; Mitchell et al., 2015) so it is not surprising that no difference in FSR was observed between our four milk protein matrices at the end of the postprandial period. Similarly, no difference in muscle and liver FSR was previously observed in energy-restricted rats that consumed meals containing either caseins or whey, or a 50/50 mixture of both proteins (Adechian et al., 2011, 2012) However, differences could have been pointed out if the FSR had been measured at different time points. Indeed, in a study evaluating protein anabolism after different milk protein consumption in rats, the muscle FSR measured at 4 h after ingestion was similar after whey protein, caseinate, and milk protein

intake and was around 7-8%/day, but time-course of FSR time varied among the different protein types (Kanda et al., 2016).

In addition to the determination of the postprandial digestive and metabolic fate of dietary nitrogen of the milk protein matrices, we studied the peptides identified in the caecum content of rats collected 6 h after ingestion. We found that the whey matrix contained trace amounts of caseins, as it was already observed in a previous study in which the same protein matrix was digested using a static digestion model (Atallah et al., 2020). The molecular weight profile showed that the whey matrix exhibited a higher proportion of smaller molecular weights compared to casein-based matrices. This suggests that whey proteins were degraded into smaller peptides compared to caseins, especially since whey proteins were further hydrolyzed by pancreatic and intestinal peptidases compared to caseins in human volunteers (Boutrou et al., 2013). Moreover, the molecular weight profile obtained at the end of the intestinal phase of the *in vitro* static digestion model (Atallah et al., 2020) presented more variations in terms of apparent molecular weights compared to the one in this study. It is important to note that in the present study, the molecular weights were analyzed in the caecum of rats, which means that the digestion process of the protein matrices was completed and that absorption had already occurred. Thus, in the rat model, the molecular weight profile does not show all of the molecular weights that resulted from the protein matrices' digestion, whereas in the *in vitro* static digestion model, all of the molecular weights generated were present in the samples analyzed. A similar milk protein peptide profile in terms of zones resistant to digestion was found between the human jejunum and the gastric and intestinal phases of the *in vitro* Infogest protocol (Sanchón et al., 2018). It would therefore be interesting to proceed to peptide identification in all compartments of the gastrointestinal tract of the rat in order to further compare the results obtained.

In conclusion, all the milk protein matrices tested in this study had high digestibility values. However, our results showed that milk proteins with a modified whey-to-micellar casein ratio displayed a slightly lower digestibility in comparison to casein or whey, probably due to an alteration in the structure of the matrix induced by a rearrangement of the proteins. Despite similar digestibilities in both the casein-based and whey matrices, some differences were observed in terms of postprandial utilization. Indeed, the rapidly-digested whey protein induced

a higher incorporation of dietary nitrogen in most tissues 6 h after ingestion. Whey protein also displayed a higher plasma leucine concentration 1 h after ingestion, but no differential effect on protein anabolism between whey and the other matrices was observed in our experimental conditions. No difference on digestibility and postprandial metabolism was observed after ingestion of micellar casein and casein with low calcium, suggesting that structural changes linked to demineralization of casein did not modify the nutritional quality of casein.

Acknowledgements

We thank Antoine Verloin from GAEC des 3 chênes for labeling the cow milk, Aziz Smira, and Maureen Maillard for contributing to sample analysis.

Financial support

This project was funded by Ingredia.

Conflict of interest

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

Authorship

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

Supplemental data

Table S1. Amino acid compositions (mg/g protein) of the 4 milk protein matrices

	C1	C2 low Ca²⁺	CW2	W
Dispensable amino acids				
Alanine	28	27	33	43
Arginine	37	38	35	30
Aspartate	59	56	71	94
Glutamate	187	182	171	154
Glycine	16	16	17	16
Proline	105	105	85	51
Serine	60	61	56	53
Tyrosine	52	55	48	37
Indispensable amino acids				
Histidine	60	62	57	47
Isoleucine	51	52	55	59
Leucine	89	90	102	121
Lysine	73	70	76	87
Methionine	27	27	25	21
Phenylalanine	47	49	46	40
Threonine	42	43	47	53
Valine	61	62	59	52

References

1. Adechian, S., Rémond, D., Gaudichon, C., Dardevet, D., & Mosoni, L. (2011). The Nature of the Ingested Protein Has No Effect on Lean Body Mass During Energy Restriction in Overweight Rats. *Obesity*, *19*(6), 1137-1144. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.260>
2. Adechian, S., Rémond, D., Gaudichon, C., Pouyet, C., Dardevet, D., & Mosoni, L. (2012). Spreading intake of a leucine-rich fast protein in energy-restricted overweight rats does not improve protein mass. *Nutrition*, *28*(5), 566-571. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.08.020>
3. Atallah, N., Deracinois, B., Boulhier, A., Baniel, A., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Ravallec, R., Flahaut, C., & Cudennec, B. (2020). In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol. *Foods*, *9*(11), 1580. <https://doi.org/10.3390/foods9111580>
4. Berrazaga, I., Salles, J., Laleg, K., Guillet, C., Patrac, V., Giraudet, C., Le Bacquer, O., Gueugneau, M., Denis, P., Pouyet, C., Pion, A., Sanchez, P., Boirie, Y., Micard, V., & Walrand, S. (2020). Anabolic Properties of Mixed Wheat-Legume Pasta Products in Old Rats: Impact on Whole-Body Protein Retention and Skeletal Muscle Protein Synthesis. *Nutrients*, *12*(6), 1596. <https://doi.org/10.3390/nu12061596>
5. Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14930-14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>
6. Bos, C., Stoll, B., Fouillet, H., Gaudichon, C., Guan, X., Grusak, M. A., Reeds, P. J., Burrin, D. G., & Tomé, D. (2005). Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *288*(2), E436-E446. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00263.2004>
7. Boutrou, R., Gaudichon, C., Dupont, D., Jardin, J., Airinei, G., Marsset-Baglieri, A., Benamouzig, R., Tomé, D., & Leonil, J. (2013). Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *97*(6), 1314-1323. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.055202>

8. Boutry, C., Fouillet, H., Mariotti, F., Blachier, F., Tomé, D., & Bos, C. (2011). Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutrition & Metabolism*, *8*, 52. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-52>
9. Chevalier, L., Bos, C., Azzout-Marniche, D., Fromentin, G., Mosoni, L., Hafnaoui, N., Piedcoq, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2013). Energy restriction only slightly influences protein metabolism in obese rats, whatever the level of protein and its source in the diet. *International Journal of Obesity*, *37*(2), 263-271. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.19>
10. Coskun, A. E. I. (2015). Preparation, structure and stability of sodium caseinate and gelatin micro-particles. *Food Hydrocolloids*, *10*.
11. Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*, 449-467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>
12. Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Douglas Goff, H. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, *14*(12), 1025-1031. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.008>
13. de Kort, E., Minor, M., Snoeren, T., van Hooijdonk, T., & van der Linden, E. (2011). Effect of calcium chelators on physical changes in casein micelles in concentrated micellar casein solutions. *International Dairy Journal*, *21*(12), 907-913. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.007>
14. Deglaire, A., Bos, C., Tomé, D., & Moughan, P. J. (2009). Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *The British Journal of Nutrition*, *102*(12), 1752-1759. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991267>
15. Elliot, T. A., Cree, M. G., Sanford, A. P., Wolfe, R. R., & Tipton, K. D. (2006). Milk ingestion stimulates net muscle protein synthesis following resistance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *38*(4), 667-674. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000210190.64458.25>

16. FAO. (2013). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation, 31 March - 2 April 2011, Auckland, New Zealand*. FAO. <http://www.fao.org/documents/card/en/c/ab5c9fca-dd15-58e0-93a8-d71e028c8282/>
17. Fox, P. F. (2001). Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, 54(2), 41-55. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2001.00014.x>
18. Fromentin, G., Darcel, N., Chaumontet, C., Marsset-Baglieri, A., Nadkarni, N., & Tomé, D. (2012). Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 29-39. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000175>
19. Gaudichon, C., Bos, C., Morens, C., Petzke, K. J., Mariotti, F., Everwand, J., Benamouzig, R., Daré, S., Tomé, D., & Metges, C. C. (2002). Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology*, 123(1), 50-59. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.34233>
20. Gaudichon, C., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Fouillet, H., Daré, S., Van Oyccke, M., Ferrière, F., Rautureau, J., & Tomé, D. (1999). Net Postprandial Utilization of [15N]-Labeled Milk Protein Nitrogen Is Influenced by Diet Composition in Humans. *The Journal of Nutrition*, 129(4), 890-895. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.890>
21. Guillin, F. M., Gaudichon, C., Guérin-Deremaux, L., Lefranc-Millot, C., Azzout-Marniche, D., Khodorova, N., & Calvez, J. (2020). Multi-criteria assessment of pea protein quality in rats: a comparison between casein, gluten and pea protein alone or supplemented with methionine. *British Journal of Nutrition*, 125(4), 389-397. <https://doi.org/10.1017/S0007114520002883>
22. Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *C C*, 10.
23. Kanda, A., Nakayama, K., Sanbongi, C., Nagata, M., Ikegami, S., & Itoh, H. (2016). Effects of Whey, Caseinate, or Milk Protein Ingestion on Muscle Protein Synthesis after Exercise. *Nutrients*, 8(6), 339. <https://doi.org/10.3390/nu8060339>

24. Lacroix, M., Bos, C., Léonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Daré, S., Benamouzig, R., Fouillet, H., Fauquant, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(5), 1070-1079. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1070>
25. Lacroix, M., Bos, Cécile., Airinei, Gheorge., Fauquant, Jacques., Tomé, Daniel., & Gaudichon, Claire. (2006). Heat markers and quality indexes of industrially heat-treated [15N] milk protein measured in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(4), 1508-1517. <https://doi.org/10.1021/jf051304d>
26. Mahé, S., Benamouzig, R., Gaudichon, C., Huneau, J. F., De Cruz, I., Rautureau, J., & Tomé, D. (1995). Nitrogen movements in the upper jejunum lumen in humans fed low amounts of casein or beta-lactoglobulin. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, *19*(1), 20-26.
27. Mahé, S., Roos, N., Benamouzig, R., Davin, L., Luengo, C., Gagnon, L., Gaussergès, N., Rautureau, J., & Tomé, D. (1996). Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *63*(4), 546-552. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.4.546>
28. Mitchell, C. J., McGregor, R. A., D'Souza, R. F., Thorstensen, E. B., Markworth, J. F., Fanning, A. C., Poppitt, S. D., & Cameron-Smith, D. (2015). Consumption of Milk Protein or Whey Protein Results in a Similar Increase in Muscle Protein Synthesis in Middle Aged Men. *Nutrients*, *7*(10), 8685-8699. <https://doi.org/10.3390/nu7105420>
29. Morens, C., Gaudichon, C., Metges, C. C., Fromentin, G., Baglieri, A., Even, P. C., Huneau, J.-F., & Tomé, D. (2000). A High-Protein Meal Exceeds Anabolic and Catabolic Capacities in Rats Adapted to a Normal Protein Diet. *The Journal of Nutrition*, *130*(9), 2312-2321. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2312>
30. Oberli, M., Marsset-Baglieri, A., Airinei, G., Santé-Lhoutellier, V., Khodorova, N., Rémond, D., Foucault-Simonin, A., Piedcoq, J., Tomé, D., Fromentin, G., Benamouzig, R., & Gaudichon, C. (2015). 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. *The Journal of Nutrition*, 145(10), 2221-2228. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216838>
31. Reitelseder, S., Agergaard, J., Doessing, S., Helmark, I. C., Lund, P., Kristensen, N. B., Frystyk, J., Flyvbjerg, A., Schjerling, P., van Hall, G., Kjaer, M., & Holm, L. (2011). Whey and casein labeled with L-[1-13C]leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 300(1), E231-242. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00513.2010>
32. Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Gaudichon, C., & Recio, I. (2018). Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food Chemistry*, 239, 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.134>
33. Sharp, P. E., La Regina, M. C., & Suckow, M. A. (1998). *The laboratory rat*. CRC Press.
34. Silva, N. N., Piot, M., de Carvalho, A. F., Violleau, F., Fameau, A.-L., & Gaucheron, F. (2013). pH-induced demineralization of casein micelles modifies their physico-chemical and foaming properties. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 322-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.004>
35. Tang, J. E., Moore, D. R., Kujbida, G. W., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 107(3), 987-992. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00076.2009>
36. Tessier, R., Khodorova, N., Calvez, J., Kapel, R., Quinsac, A., Piedcoq, J., Tomé, D., & Gaudichon, C. (2020). 15N and 2H Intrinsic Labeling Demonstrate That Real Digestibility in Rats of Proteins and Amino Acids from Sunflower Protein Isolate Is Almost as High as That of Goat Whey. *The Journal of Nutrition*, 150(3), 450-457. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>
37. Tipton, K. D., Elliott, T. A., Cree, M. G., Wolf, S. E., Sanford, A. P., & Wolfe, R. R. (2004). Ingestion of Casein and Whey Proteins Result in Muscle Anabolism after Resistance

- Exercise: *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2073-2081.
<https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000147582.99810.C5>
38. van Lieshout, G. A. A., Lambers, T. T., Bragt, M. C. E., & Hettinga, K. A. (2019). How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-24.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1646703>
39. Wang, X., Ye, A., Lin, Q., Han, J., & Singh, H. (2018). Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6842-6852. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14284>
40. Waynforth, H. B., & Flecknell, P. A. (1992). *Experimental and surgical technique in the rat*. Academic Press.
41. Wong, D. W. S., Camirand, W. M., Pavlath, A. E., Parris, D. N., & Friedman, D. M. (1996). Structures and functionalities of milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(8), 807-844. <https://doi.org/10.1080/10408399609527751>
42. Zhao, L. L., Wang, X. L., Tian, Q., & Mao, X. Y. (2016). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7768-7775. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10794>

Chapitre III

Discussion

Cette thèse a permis d'étudier l'effet de différents facteurs capables de moduler la digestion des protéines : des facteurs physiologiques tels que l'âge et l'adiposité, mais aussi des facteurs propres à la matrice protéique. Ce travail a été réalisé en utilisant deux modèles complémentaires : la digestion *in vitro* statique, afin de sélectionner des matrices protéiques laitières d'intérêt obtenues à partir de différents procédés sur la base de leur profil peptidique et de leur peptidome intestinal, et le modèle *in vivo* lors de deux études chez le rat. La première étude nous a permis d'étudier les effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestion dans le but de déterminer un modèle animal discriminant en termes d'efficacité digestive, et la deuxième de mieux caractériser l'assimilation et l'utilisation des matrices sélectionnées sur le modèle de rat discriminant.

Cette discussion générale est réalisée en trois parties, (1) sur les méthodes de digestion *in vitro* et *in vivo* mises en place dans l'étude, (2) sur le comportement des matrices protéiques laitières au cours des digestions *in vitro* et *in vivo*, et (3) sur les effets de l'âge et de l'adiposité en tant que facteurs capables de moduler la digestion et l'utilisation postprandiale des protéines.

1. Discussion sur les modèles de digestion *in vitro* statique et *in vivo*

utilisés

Tel qu'il a été discuté tout au long de ce manuscrit, différents modèles *in vitro* et *in vivo* peuvent être utilisés pour étudier le devenir des aliments au cours de la digestion, et le choix du modèle dépend fortement de la question de recherche posée et des moyens disponibles. Nos matrices protéiques ont été étudiées grâce au modèle de digestion *in vitro* statique Infogest adapté à nos matrices protéiques (**Article 1**) avant d'évaluer la digestion *in vivo* chez le rat au niveau caecal (**Article 3**). Avant d'aborder la complémentarité des données obtenues au cours des digestions *in vitro* et *in vivo*, cette section se focalisera sur les choix méthodologiques.

Optimisation du protocole Infogest pour les matrices protéiques purifiées

Pour assurer la bonne mise en place du protocole Infogest, des paramètres clés doivent être déterminés à chaque étape de la digestion tels que la concentration des enzymes digestives et des solutions électrolytes. Tout au long de la digestion, le protocole Infogest recommande d'atteindre un rapport volume : volume équivalent (50 : 50) entre la matrice alimentaire et les fluides digestifs. La quantité d'enzyme requise, calculée en fonction de son activité, dépend ensuite du volume final de la phase de digestion. Ainsi, le protocole recommande d'estimer la quantité de pancréatine (un mélange de trypsine, chymotrypsine, élastases et carboxypeptidases issues d'un extrait de pancréas porcin) à ajouter en phase intestinale partir d'un dosage mesurant l'activité tryptique qui doit être équivalente à 100 U.mL^{-1} dans la solution finale [222]. En suivant ces indications, une quantité de 732,8 mg de pancréatine était nécessaire pour digérer nos matrices protéiques réhydratées contenant 800 mg de protéines. Ce rapport enzyme : substrat proche de 1 était trop élevé, et une telle quantité de pancréatine aurait compliqué l'analyse des peptidomes qui seraient alors composés d'une part importante de peptides issus de l'autolyse des enzymes digestives [281] et de protéines présentes dans la pancréatine. Nous avons ainsi procédé à une étape préliminaire afin d'optimiser le protocole Infogest pour l'adapter à des matrices protéiques purifiées. En effet, l'objectif principal du réseau Infogest est de rassembler un ensemble de conditions proches de la situation physiologique pour simuler la digestion des aliments et d'établir un modèle de digestion *in vitro* statique consensuel, adapté à une large gamme de matrices alimentaires [222]. A cet égard, les auteurs expriment d'ailleurs qu'aucune des conditions décrites n'est adaptée à toutes les questions de recherche posées et que celles-ci peuvent être modifiées pour mieux les adapter aux conditions retrouvées chez certaines populations telles que les personnes âgées et les enfants par exemple. Le protocole n'est donc pas figé et a même été révisé récemment [224] afin d'apporter plus de précisions concernant l'étude de certains nutriments. La mise au point du protocole pour l'adapter à nos matrices protéiques relativement simples est donc justifiée.

Nos résultats ont montré qu'un profil peptidique similaire en termes de répartition des poids moléculaires apparents était obtenu à partir de 200 mg de pancréatine comparé à la quantité requise de 732,8 mg. De plus, les profils électrophorétiques obtenus avec le SDS-PAGE ont

démontré une hydrolyse complète des protéines à la fin de la phase intestinale dès l'utilisation de 200 mg de pancréatine. Grâce à des digestions dites « blanches », c'est à dire ne contenant aucun substrat, les légères différences observées au niveau de la répartition des poids moléculaires et du SDS-PAGE ont pu être attribuées à l'autolyse des enzymes digestives. En effet, l'autolyse pancréatique n'est pas négligeable [281], et les digestions « blanches » ont montré que l'aire sous la courbe augmentait avec la quantité de pancréatine. Ainsi, nos résultats démontrent que les conditions d'hydrolyse que nous avons mises en place, avec l'utilisation d'une quantité de 200 mg de pancréatine en phase intestinale, sont suffisantes pour hydrolyser les protéines présentes dans nos matrices, malgré la diminution considérable de la quantité d'enzyme utilisée en comparaison à celle recommandée dans le protocole initial. En effet, le protocole Infogest a été développé initialement pour la digestion de matrices alimentaires complexes, ce qui peut expliquer la quantité relativement élevée de pancréatine préconisée au départ. Ce protocole adapté pourra donc être utilisé pour la digestion de matrices protéiques purifiées.

Evaluation de la digestibilité caecale chez le rat

Dans le cadre de l'évaluation de la qualité des protéines alimentaires, la FAO préconise de déterminer la digestibilité chez l'Homme, le porc ou le rat [159]. Les études chez le rat ont l'avantage d'être plus simples à mettre en place que celles chez l'Homme ou chez le porc. De plus, dans ce même rapport, la FAO recommande la mesure de digestibilité au niveau iléal plutôt qu'au niveau fécal afin de s'affranchir de l'activité du microbiote colique qui métabolise les peptides et acides aminés alimentaires non absorbés [104]. Chez le rat, la mesure de la digestibilité iléale s'avère difficile à évaluer et des considérations méthodologiques sont à prendre en compte.

Chez le rat, à l'inverse du porc, les digestats ne peuvent pas être collectés en continu grâce à la pose d'une canule intestinale. Ainsi, les contenus digestifs doivent être prélevés à un temps donné après l'ingestion du repas, lors de l'euthanasie de l'animal. La collecte exhaustive des digestats iléaux contenant les pertes alimentaires n'est donc pas possible et l'utilisation d'un marqueur non-absorbable pour corriger la collecte incomplète des digestats au niveau iléal est nécessaire [282]. Le marqueur doit être totalement indigestible et avoir un taux de récupération élevé, qui

se définit comme le rapport entre la quantité collectée sur l'ensemble du recueil et la quantité ingérée [255]. Les marqueurs les plus fréquemment utilisés sont l'oxyde de chrome (Cr_2O_3), le dioxyde de titane (TiO_2), et les cendres insolubles dans l'acide [109]. Le choix du marqueur non-absorbable est important étant donné que le taux de récupération peut varier en fonction du marqueur [283,284] et être considérablement inférieur à 100 % comme le montrent certaines études où des taux de 60 % [245] et 75 % [255] ont été observés chez le porc avec le Cr_2O_3 . Ainsi la mesure de la digestibilité iléale des protéines et acides aminés chez le rat peut présenter des incertitudes liées à la fiabilité du marqueur non-absorbable. Un autre inconvénient de la collecte des digestats au niveau de l'iléon est la faible quantité de digestats récupérée à ce niveau chez les petits animaux tels que le rat [262]. La quantité de contenus iléaux est d'autant plus problématique lorsque des analyses isotopiques sont réalisées pour évaluer les pertes d'azote et d'acides aminés alimentaires et endogènes. Afin de maximiser le contenu intestinal, des petits repas donnés à intervalles réguliers pendant plusieurs heures sont administrés aux animaux, permettant d'obtenir un débit intestinal constant avant la collecte des digestats iléaux [254]. Les quantités nécessaires pour le dosage du marqueur non-absorbable, et les analyses isotopiques des protéines et des acides aminés sont de l'ordre de 100 mg par analyse alors que la quantité moyenne de digestat retrouvée dans l'iléon varie entre 50 et 130 mg selon l'animal et est en moyenne autour de 100 mg d'après notre expérience. Afin de s'affranchir des problèmes de quantité de digestats et de précision du marqueur non-absorbable, une alternative est d'évaluer la digestibilité au niveau caecal comme approximation de la digestibilité iléale, tel qu'il est précisé dans un rapport de l'AFSSA [111].

Le caecum est un organe en forme de poche situé à la jonction de l'iléon et du côlon proximal [285]. Le caecum du rat est volumineux [252] et a donc la capacité d'accumuler un grand volume de digestat à la sortie de l'intestin grêle. Il peut alors être hypothétiquement considéré comme un lieu de stockage des pertes iléales. Le principe de la méthode caecale repose ainsi sur l'hypothèse que la très grande majorité des pertes azotées et d'acides aminés alimentaires est retrouvée dans le caecum après un temps de digestion adéquat et que la collecte de ces pertes est quasiment exhaustive, ce qui permet de se passer de l'usage d'un marqueur non-absorbable. En recueillant les digestats au niveau de tous les compartiments du tube digestif, un bilan de

matière peut être établi afin de vérifier ce prérequis. Bien que retrouvé en quantité limitée, les acides aminés alimentaires retrouvés dans l'intestin grêle et le côlon ne sont pas pris en compte dans les calculs et il est donc important de minimiser ces quantités en choisissant bien le temps de digestion et en effectuant un bilan de matière complet du tractus gastro-intestinal. Dans une étude sur les protéines de lait, Lacroix *et al.*, ont retrouvé plus de 80 % de l'azote alimentaire non digéré dans le caecum 6 h après l'ingestion du repas test [186]. Nous avons donc choisi de collecter les digestats 6 h après l'ingestion du repas dans nos deux études réalisées chez le rat (**Articles 2 et 3**). Le **Tableau 6** montre les pertes d'azote alimentaire retrouvées dans le tractus gastro-intestinal dans l'étude *in vivo* sur l'effet de l'âge et de l'adiposité sur la digestibilité de la matrice contenant des caséines micellaires natives (**Article 2**). Les pertes alimentaires étaient très importantes dans l'estomac des rats âgés (40-60 %) et nous avons choisi de soustraire ces pertes à la quantité ingérée. Sans prendre en compte les pertes alimentaires restées dans l'estomac 6 h après le repas, une grande majorité de l'azote alimentaire, entre 70 et 80 %, se retrouve dans le segment iléon/caecum pour l'ensemble des 4 groupes.

Tableau 6. Répartition des pertes d'azote alimentaire (% pertes alimentaires totales) 6 h après ingestion du repas test contenant des caséines micellaires pour les groupes d'âges et d'adiposité différents.

	Incluant l'estomac				Sans l'estomac		
	Estomac	Intestin grêle	Iléon + caecum	Côlon + fèces	Intestin grêle	Iléon + caecum	Côlon + fèces
2m-na	10 ± 24	6 ± 4	73 ± 27	11 ± 18	9 ± 9	80 ± 18	11 ± 18
2m-ha	28 ± 37	6 ± 5	57 ± 30	9 ± 10	10 ± 4	79 ± 6	11 ± 9
11m-na	38 ± 33	9 ± 5	48 ± 29	5 ± 5	15 ± 4	76 ± 8	8 ± 6
11m-ha	66 ± 27	7 ± 5	24 ± 21	3 ± 3	23 ± 12	69 ± 11	9 ± 7

Les valeurs sont les moyennes ± ET.

Le **Tableau 7** présente les pertes d'azote alimentaire retrouvées dans le tractus gastro-intestinal dans l'étude *in vivo* sur l'effet des différentes matrices de protéines laitières chez le rat (**Article 3**). Selon le groupe, entre 62 et 73 % des pertes alimentaires d'azote se retrouvent dans l'iléon et le caecum des rats 6 h après le repas. Ainsi dans les deux études *in vivo* réalisées, une large majorité des pertes alimentaires sont accumulées dans l'iléon et le caecum 6 h après le repas.

Tableau 7. Répartition des pertes d'azote alimentaire (% pertes alimentaires totales) 6 h après ingestion du repas test contenant différentes matrices de protéines laitières.

	Estomac	Intestin grêle	Iléon + caecum	Côlon + fèces
C1	11 ± 17	11 ± 3	65 ± 14	12 ± 10
C2 low Ca²⁺	6 ± 13	16 ± 7	62 ± 12	16 ± 10
CW2	9 ± 11	11 ± 3	67 ± 10	13 ± 9
W	2 ± 2	15 ± 5	73 ± 7	10 ± 7

Les valeurs sont les moyennes ± ET.

Néanmoins, on peut noter qu'une partie des pertes est encore dans l'intestin grêle (10-15 %) ou se retrouve déjà dans le côlon et les fèces (10-15 %) 6 h après le repas. Pour les protéines très digestibles, le fait de ne pas prendre en compte ces pertes dans le calcul de la digestibilité caecale a peu d'impact. En effet, l'azote alimentaire toujours présent dans l'intestin grêle sera en grande partie absorbé et les pertes au niveau du côlon restent minimales lorsqu'exprimées en quantité d'ingéré. Par exemple, pour une digestibilité caecale de la caséine micellaire (matrice C1) de 94,8 % chez les jeunes rats à adiposité normale, l'azote alimentaire dans l'intestin grêle qui ne sera effectivement pas absorbé correspondrait à 0,03 % de l'ingéré et la surestimation de la digestibilité est donc très faible. Avec 11 % de pertes alimentaires se retrouvant dans le côlon ou les fèces, nous négligeons de 0,6 % seulement l'azote ingéré perdu et surestimons d'autant la digestibilité caecale calculée. Ainsi, pour des protéines hautement digestibles, la surestimation de la digestibilité caecale est acceptable. Néanmoins, la méthode d'évaluation de la digestibilité au niveau caecal présente des limites. Tout d'abord, dans le cas de protéines peu digestibles, la sous-estimation des pertes alimentaires liée au fait de ne pas considérer les pertes dans l'intestin grêle proximal et le côlon peut être importante si la très grande majorité des pertes ne sont pas situées dans le caecum. Dans ce cas, l'approximation de la digestibilité iléale par la digestibilité caecale peut être biaisée. Un autre aspect non négligeable est que le caecum est tout de même un site de digestion microbienne [252]. Il est difficile d'estimer l'utilisation et la métabolisation des acides aminés alimentaires par les bactéries caecales mais il est possible que cela conduise à une surestimation ou sous-estimation de la digestibilité des acides aminés. L'activité microbienne dans l'iléon est quant à elle très faible, bien qu'elle soit existante [106]. Malgré ces inconvénients,

des études précédemment réalisées chez le rat ont montré des valeurs de digestibilité d'isolat de protéines de lactosérum comparables lorsque mesurées par la méthode caecale (98,3 %) [186] et au niveau iléal avec l'utilisation d'un marqueur non-absorbable (99 %) [266]. De même, nous avons reporté une digestibilité moyenne des acides aminés de la caséine micellaire variant de 95,1 % à 96,6 % selon l'âge et l'adiposité des rats (**Article 2**), ce qui est comparable à la digestibilité iléale moyenne des acides aminés de la caséine de 96,5 % retrouvée chez le rat [286].

2. Caractérisation des matrices protéiques au cours des digestions *in*

vitro et in vivo

Nos travaux nous ont permis de caractériser sept matrices protéiques laitières d'assemblages moléculaires différents au cours des digestions *in vitro* et *in vivo*. Les avantages et limites des modèles de digestion ayant déjà été mis en évidence tout au long de ce manuscrit, cette section se focalisera plutôt sur les données complémentaires apportées par les deux modèles, ainsi que sur la comparaison des données obtenues au cours des digestions (**Articles 1 et 3**).

L'étape de digestion *in vitro*, nous a permis de caractériser la transformation de six matrices protéiques tout au long de la digestion. Ainsi, la répartition relative des peptides en fonction de leur poids moléculaire, l'identification des peptides générés, les teneurs en calcium, acides aminés et peptides ont pu être déterminées à chaque phase de la digestion (**Article 1**). A la fin de la phase gastrique, des différences notables sont apparues entre les peptidomes des matrices. En effet, l'hydrolyse pour toutes les matrices à base de caséines (C1, C2, C2 low Ca²⁺, et C3) avait commencé au cours de la phase gastrique tandis que la matrice W, composée de protéines solubles, n'était que très peu hydrolysée. Ces résultats vont dans le même sens que la littérature où des études *in vitro* [168–170] ont démontré la résistance des protéines solubles face à la protéolyse gastrique, un effet attribué à leur structure globulaire compacte [6]. À la fin de la phase intestinale, les différences observées au niveau gastrique entre les matrices à base de caséines et la matrice contenant les protéines solubles étaient fortement atténuées. En revanche, des différences sont apparues entre les matrices à base de caséines en termes de peptides générés

pour les caséines réticulées (C3) et déminéralisées (C2 low Ca²⁺) par rapport aux caséines micellaires natives (C1), reflétant l'impact de la structure sur leur dégradation. Des études portant sur la modification de la structure des caséines par réticulation ont montré que l'unité micellaire était maintenue, mais que des liaisons se formaient entre les résidus lysine et arginine des caséines. De plus, les micelles de caséines réticulées avaient une charge négative plus importante, étaient plus petites et présentaient une surface plus lisse que celle des caséines natives [287,288]. On peut alors supposer que la réticulation induite entre les résidus de lysine et d'arginine des caséines aurait empêché les enzymes d'accéder aux mêmes sites de coupure que ceux des caséines micellaires natives en raison de l'encombrement stérique. Concernant la caséine déminéralisée, il a été démontré que l'élimination du phosphate de calcium colloïdal par les procédés appliqués pour obtenir des caséines déminéralisées (acidification ou chélation du calcium) conduisait à une désintégration de la micelle en petites particules [289]. Ce processus s'explique par la réduction du nombre de nanoclusters de phosphate de calcium colloïdal instables se trouvant à l'intérieur de la micelle [51]. Bien que la structure des matrices protéiques n'ait pas été étudiée dans le cadre de cette thèse, une autre thèse portant sur la structure des mêmes matrices de caséines a montré que la diminution de la concentration des nanoclusters instables conduisait à une structure plus lâche et poreuse des caséines déminéralisées [52]. De ce fait, on pourrait supposer que la structure plus lâche de la micelle de caséine déminéralisée aurait donné un accès plus facile aux sites de coupure des enzymes, expliquant la plus grande quantité de peptides retrouvés au niveau intestinal pour cette matrice (C2 low Ca²⁺) par rapport à toutes les autres matrices à base de caséines.

Ainsi, cette phase des travaux a servi de première approche pour sélectionner les matrices pour lesquelles il était intéressant d'aller plus loin : les matrices C1 et C2 low Ca²⁺ ont été choisies en raison de l'hétérogénéité des profils peptidiques obtenus, et la matrice W au vu de sa composition en protéines solubles, discriminante par rapport aux matrices à base de caséines. L'étude *in vivo* chez le rat nous a permis d'étudier la qualité nutritionnelle de nos matrices en évaluant leur digestibilité et leur utilisation postprandiale à l'aide d'un marquage au ¹⁵N, mais aussi d'obtenir plus d'informations relatives aux cinétiques de digestion (**Article 3**).

La digestibilité caecale réelle de nos matrices à base de caséines, C1 et C2 low Ca²⁺, était respectivement de 94,9 et 95,5 % pour l'azote et entre 96,6 et 96,0 % pour la digestibilité moyenne des acides aminés. Nous pouvons donc argumenter que malgré le fait que certains peptides résistants, générés lors de la digestion *in vitro*, étaient différents entre les matrices C1 et C2 low Ca²⁺ (**Article 1**), aucun impact n'a été identifié au niveau de la digestibilité, suggérant que les changements structuraux liés à la déminéralisation de la caséine n'ont pas modifié sa qualité nutritionnelle. Néanmoins les différences observées entre les peptides résistants pourraient conduire à des effets physiologiques différents, comme par exemple une satiété induite plus ou moins rapidement via la modulation de la sécrétion des hormones intestinales par les peptides au niveau apical des cellules entéroendocrines [72]. Les valeurs de digestibilité obtenues pour la matrice C1, la caséine micellaire native utilisée lors de nos deux études chez le rat, sont comparables avec une digestibilité caecale de 94,8 % pour l'azote et de 95,8 % pour les acides aminés retrouvés chez les jeunes rats à l'adiposité normale (**Article 2**). En revanche, nous avons observé une légère diminution de la digestibilité de la matrice contenant une quantité modifiée de protéines solubles et de caséines micellaires (ratio 63 : 37 ; CW2). Les rats consommant cette matrice ont présenté une plus grande quantité d'azote alimentaire dans le caecum 6 h après l'ingestion du repas. En conséquence, la digestibilité caecale de cette matrice était inférieure à celle des autres matrices pour l'azote (93,5 %) et pour les acides aminés (92,4 %). Cette valeur est également plus faible que celle obtenue pour des protéines totales du lait d'un ratio caséines : protéines solubles de 80 : 20 et qui ont une digestibilité caecale réelle de l'azote de 96 % chez les rats [186]. Une augmentation de la teneur en protéines solubles pourrait conduire à des interactions supplémentaires entre les protéines solubles et les caséines, entraînant des modifications structurelles et rendant la matrice un peu moins digestible. Plus précisément, cela pourrait s'expliquer par une plus grande quantité de groupements thiol libres provenant de la β -lactoglobuline conduisant à une augmentation des liaisons disulfures avec les caséines [290]. Cette matrice a été ajoutée à l'étude *in vivo* à la fin de la phase *in vitro* de ce projet et n'a donc malheureusement pas été étudiée au cours de la digestion statique. En revanche, il aurait été intéressant de mettre en lien cette perte de digestibilité avec les profils peptidiques obtenus au cours des différentes phases de la digestion. En effet, la digestion *in vitro* aurait pu

nous apporter plus d'information concernant la taille des peptides générés et les zones de résistance à la digestion.

Comparaison des profils peptidiques obtenus in vitro et in vivo

Au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en place une étude préliminaire visant à comparer les données peptidiques obtenues dans le caecum de rat avec celles obtenues au terme de la digestion *in vitro*. Les résultats de l'étude *in vitro* nous ont permis de sélectionner trois matrices aux profils de digestion hétérogènes afin de les tester chez le rat. La quatrième matrice a été ajoutée dans l'étude *in vivo* et comme elle n'a pas été testée *in vitro*, la comparaison des données obtenues au cours de la digestion des deux modèles ne concernera donc que trois matrices.

La digestion *in vitro* a permis de montrer que les protéines solubles étaient résistantes à la digestion gastrique mais que celles-ci ont ensuite subi une forte hydrolyse au cours de la phase intestinale (**Article 1**). Bien que l'hydrolyse des protéines dans l'estomac n'ait pas pu être vérifiée *in vivo*, la matrice contenant les protéines solubles (W) semblait avoir été plus hydrolysée en arrivant dans le caecum, c'est-à-dire après l'action des enzymes intestinales. En effet, la **Figure 34B** indique que dans le contenu caecal, une proportion plus importante de peptides de petite taille (autour de 300 Da) était retrouvée pour la matrice W comparée aux matrices de caséine micellaire native (C1) et de caséine déminéralisée (C2 low Ca²⁺), suggérant que les protéines solubles auraient été dégradées en plus petits peptides par rapport aux caséines. Des résultats similaires ont été retrouvés *in vitro* puisque la matrice W présentait significativement plus de peptides d'une taille de 300 à 2000 Da par rapport à toutes les matrices à base de caséines (C1, C2, C2 low Ca²⁺, et C3) (**Article 1**). Chez l'Homme, il a été observé un résultat similaire, les protéines solubles étant davantage hydrolysées par les peptidases pancréatiques et intestinales comparées aux caséines [174], ce qui corrobore nos résultats.

Une forte variabilité est tout de même à noter dans les profils peptidiques générés *in vitro* et *in vivo* (**Figure 34**). En effet, la phase intestinale du modèle *in vitro* présentait plus de diversité en termes de poids moléculaires par rapport au modèle *in vivo*, et ces différences peuvent être attribuées à différents facteurs. Tout d'abord, lors de la digestion *in vitro*, les matrices

alimentaires sont soumises uniquement à l'action des enzymes gastriques et pancréatiques alors qu'*in vivo*, le processus de digestion est complété par l'action des peptidases de la bordure en brosse qui transforment certains oligopeptides en di-, tri-peptides et acides aminés libres [291]. De plus, le phénomène d'absorption n'est pas simulé en digestion *in vitro* statique, et la masse de protéines, peptides et acides aminés issus de la matrice protéique reste identique tout au long de la digestion. Dans le caecum du rat, le profil n'est donc pas représentatif de tous les poids moléculaires résultant de l'hydrolyse des matrices protéiques au cours de la digestion du fait de l'absorption. Enfin, il est important de mentionner que le profil peptidique de la **Figure 34B** présente l'ensemble des peptides générés qu'ils soient alimentaires ou endogènes. Il pourrait alors être intéressant d'analyser la part de dérivés protéiques attribuables à l'autolyse des enzymes digestives et à l'apport azoté issu des cellules épithéliales desquamées, des pertes plasmatiques et des protéines du mucus [104] en analysant du contenu caecal de rats ayant été sous régime protéoprive.

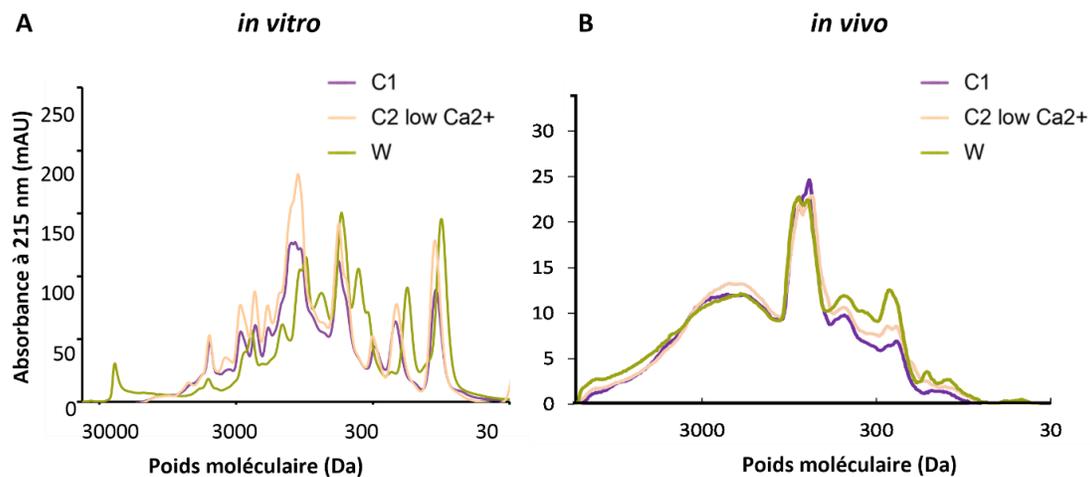


Figure 34. Comparaison des profils de répartition des poids moléculaires des matrices protéiques lactières au cours de la digestion *in vitro* statique en phase intestinale (A) et *in vivo* dans le caecum du rat (B).

Au terme de la digestion *in vitro*, des peptides issus des différents types de caséines, de l' α -lactalbumine et de la β -lactoglobuline ont été identifiés en phase intestinale pour les matrices C1, C2 low Ca^{2+} et W (**Article 1**). Cependant, aucun peptide issu de l'hydrolyse de la β -lactoglobuline n'a été identifié dans le caecum des rats, où seuls des peptides provenant des caséines- α_{s1} , $-\alpha_{s2}$ et $-\beta$ ont été identifiés (**Article 3**). La répartition des poids moléculaires (**Figure 34**) a montré que la matrice W, contenant majoritairement des protéines solubles et donc de la β -lactoglobuline, présentait une plus grande proportion de petits peptides dans le caecum des rats par rapport à C1 et C2 low Ca^{2+} . En LC-MS/MS, seuls les peptides de plus de 4-5 acides aminés (poids moléculaire > 400 Da) sont identifiés. En effet, une des limites de la LC-MS/MS est que les peptides de petite et de grande taille peuvent passer inaperçus [292] et uniquement les peptides compris entre 500 et 2500 Da ont été identifiés lors des études *in vitro* et *in vivo*. Par conséquent, certaines différences ou ressemblances entre les peptidomes concernant les très petits et/ou les grands peptides pourraient ne pas être mises en évidence.

Une autre possibilité est l'évacuation plus rapide des protéines solubles non digérées depuis le caecum vers le côlon au bout de six heures de digestion. Les peptides des caséines, digérées plus lentement, seraient en revanche plus présents dans le caecum à ce stade de la phase postprandiale. L'évacuation plus rapide des protéines solubles est confortée par l'apparition d'un pic de leucine dans le plasma 1 h après l'ingestion, ce qui est en accord avec la littérature [293]. De plus, l'augmentation de l'incorporation de l'azote alimentaire dans les protéines plasmatiques a également été observée dès 3 h après l'ingestion des protéines solubles, et continuait d'être supérieure aux autres matrices à la fin de la phase postprandiale. La comparaison de la position des peptides, dans la séquence de la protéine d'origine, issus de la digestion des trois matrices protéiques communes aux études *in vitro* et *in vivo* est présentée dans la **Figure 35**.

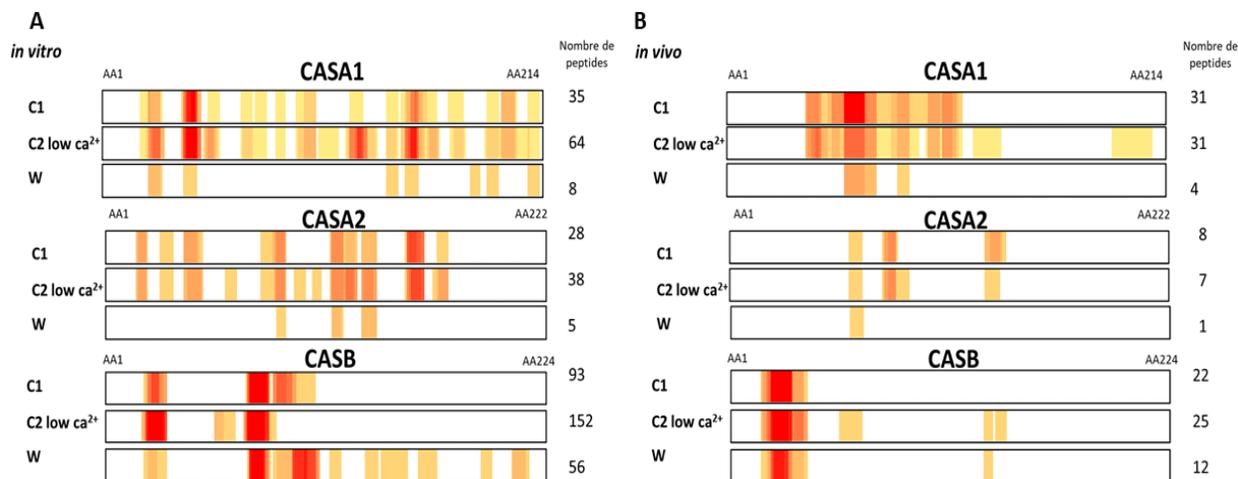


Figure 35. Recouvrements de séquences des principales caséines identifiées, sous forme de carte de chaleur, au cours de la digestion *in vitro* statique en phase intestinale (A) et *in vivo* dans le caecum du rat (B). Les couleurs allant du jaune au rouge expriment la fréquence du peptide identifié, du plus faible au plus élevé. CASA1 : caséine- α_{S1} , CASA2 : caséine- α_{S2} , CASB : caséine- β .

Comme dans le cas du profil de répartition des poids moléculaires, une plus grande quantité de peptides résistants à la digestion a été identifiée *in vitro* par rapport à la digestion *in vivo* chez le rat. Cela s'explique à nouveau par l'action des peptidases de la bordure en brosse et par le phénomène d'absorption qui a eu lieu lors de la digestion *in vivo*. Aussi, certains peptides résistants à la digestion auraient pu être absorbés intacts par les entérocytes [76,77] les rendant indétectables. Même si la comparaison entre les cartes de chaleur obtenues pour les digestions *in vitro* et *in vivo* est difficile, il est tout de même intéressant de noter que certaines zones communes de résistance à la digestion ont été identifiées avec les deux modèles tels que le peptide 40-46 pour la caséine- α_{S1} , le peptide 16-21 pour la caséine- α_{S2} , et le peptide 20-31 pour la caséine- β . Certains points essentiels peuvent aussi expliquer les différences obtenues au niveau des identifications peptidiques *in vitro* et *in vivo*. Tout d'abord, le protocole Infogest appliqué à la digestion *in vitro* des matrices simule la digestion humaine, alors que nos matrices ont été testées *in vivo* chez le rat. Bien que le rat soit un bon modèle de l'Homme, il existe des différences anatomiques importantes au niveau du tube digestif [252]. De plus, les matrices protéiques ont été administrées aux rats dans un repas mixte comprenant des lipides et glucides alors qu'elles

ont été digérées seules lors des digestions *in vitro*. En effet, les cinétiques de digestion peuvent varier selon la composition du repas et entraîner des ratios entre peptides et acides aminés libres différents.

Les études comparant les résultats obtenus au cours des digestions *in vitro* statique et les modèles *in vivo* sont rares mais ont déjà été réalisées chez le porc et chez l'Homme. Chez le porc, les séquences peptidiques identifiées durant la phase gastrique étaient corrélées avec les peptides obtenus à la fin de la phase gastrique de la digestion *in vitro* statique, mais ce n'était pas le cas au niveau intestinal ($R=0,80$ en phase gastrique et $0,57$ en phase intestinale) [221,294]. Les auteurs ont également émis l'hypothèse que la corrélation moins forte entre les deux modèles au niveau intestinal pouvait s'expliquer par l'absorption des nutriments. Par ailleurs, une digestion moins complète *in vitro* est aussi une explication plausible. Chez l'Homme, des régions communes de résistance à la digestion ont été identifiées dans le jéjunum et au cours des phases gastriques et intestinales du protocole de digestion statique Infogest [295]. Ainsi, nos résultats donnent un premier aperçu de la comparabilité des données entre le modèle rat et le modèle de digestion statique Infogest. A notre connaissance, cette étude est la première qui compare les peptidomes intestinaux obtenus via ce protocole avec ceux obtenus chez le rat. Ces résultats sont préliminaires et il serait intéressant de compléter les analyses en effectuant les mêmes identifications peptidiques dans les contenus de tout l'appareil digestif du rat.

L'étude *in vivo* nous a permis de comparer l'assimilation et l'utilisation des différentes matrices (**Article 3**). Dans notre étude, la vitesse de digestion plus rapide des protéines solubles par rapport aux caséines était associée à une incorporation plus élevée de l'azote alimentaire dans les zones splanchniques (foie, muqueuses jéjunales et iléales, protéines plasmatiques) et périphériques (muscles) à la fin de la phase postprandiale. Cette incorporation plus rapide n'a en revanche pas été associée à une augmentation de la synthèse protéique dans le muscle et le foie, ni avec une augmentation du transfert de l'azote alimentaire vers l'urée. Les protéines de lait étant toutes de bonne qualité nutritionnelle, aucun effet sur le taux de synthèse protéique final n'a précédemment été mis en évidence 6 h après le repas, mais le pic maximal de synthèse protéique peut se produire à différents moments en fonction du type de protéine de lait ingéré [179]. Des valeurs de désamination postprandiale variables avaient été précédemment rapportées en

fonction de la taille du repas, de l'apport protéique habituel et du temps après l'ingestion du repas chez le rat [186,296]. Dans notre étude, aucune différence n'a été constatée entre les groupes. Si nous avons évalué la cinétique postprandiale du transfert de l'azote alimentaire vers l'urée, une différence aurait pu probablement être observée, puisque le transfert de l'azote alimentaire vers l'urée était plus rapide pour les protéines solubles et atteignait un pic 2 h après l'ingestion par rapport aux caséines et protéines totales du lait chez l'Homme [178]. Cependant, nos valeurs de désamination, s'étendant de 8 à 11 % en fonction du groupe, étaient plus basses que celles retrouvées dans la littérature. Ainsi, dans l'étude de Lacroix *et al.*, la désamination totale variait de 14 à 21 % en fonction des protéines, avec un transfert de l'azote vers l'urée urinaire équivalent à 10-17 % [186]. Nos valeurs de transfert de l'azote vers l'urée urinaire étaient de l'ordre de 3 % pour tous nos groupes, expliquant le taux de désamination totale plus faible par rapport à l'étude de Lacroix *et al.* Pour extraire les urines, des papiers absorbants ont été rincés avec de l'eau distillée. Il est possible que cet écart au niveau de l'urée urinaire soit dû à une extraction incomplète de l'urine du papier absorbant, ou à une dilution trop importante de l'urine impactant le signal lors des analyses de spectrométrie de masse.

Les caractéristiques majeures des matrices au cours des études *in vitro* et *in vivo* sont récapitulées dans le **Tableau 8**.

Tableau 8. Caractéristiques majeures des matrices au cours des digestions *in vitro* et *in vivo*.

		C1	C2	C2 low Ca ²⁺	C3 ¹	CW	CW2	W
Caséines : protéines solubles		92 : 8	92 : 8	92 : 8	92 : 8	80 : 30	63 : 37	0 : 100
Teneur en calcium (%)		2,6	2,1	1,6	2,6	2,2	1,8	0,3
<i>In vitro</i>	Phase gastrique	Majorité de peptides compris entre 4 et 10 kDa					-	Proportion élevée de peptides > 10 kDa et répartition homogène des peptides de poids intermédiaires
	Phase intestinale	Majorité de peptides compris entre 0,7 et 2 kDa					-	Majorité de peptides entre 0,7 et 2 kDa mais proportion élevée de peptides compris entre 0,3 et 0,7 kDa
<i>In vivo</i>	Digestibilité fécale (%)	93,9 ± 1,2	-	94,4 ± 0,7	-	-	92,1 ± 1,2	94,2 ± 0,7
	Digestibilité caecale² (%)	96,6 ± 0,9	-	96,0 ± 0,6	-	-	92,4 ± 1,4	96,6 ± 1,0
	Synthèse protéique	Foie = Muscle =	-	Foie = Muscle =	-	-	Foie = Muscle =	Foie = Muscle =
	Zone splanchnique³	Foie = Protéines plasma = Duodénum = Jéjunum = Iléon =	-	Foie = Protéines plasma = Duodénum = Jéjunum = Iléon =	-	-	Foie = Protéines plasma = Duodénum = Jéjunum = Iléon =	Foie ↑ Protéines plasmatiques ↑ Duodénum = Jéjunum ↑ Iléon ↑
	Zone périphérique³	Muscle =	-	Muscle =	-	-	Muscle =	Muscle ↑
	Désamination totale	=	-	=	-	-	=	=

= pas de différence entre les groupes ; ↑ Valeur plus élevée de W par rapport à C1, C2 low Ca²⁺ et CW ; ↑ Valeur plus élevée de W par rapport à C1 et C2 low Ca²⁺ ; ↑ Valeur plus élevée de CW par rapport à C1 et C2 low Ca²⁺ ; ¹Réticulée par voie enzymatique ; ²Digestibilité caecale moyenne des AA pondérée en fonction de la composition en AA de la protéine ; ³Transfert de l'azote alimentaire à la fin de la phase postprandiale

3. Effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestion de la caséine

micellaire native

Cette phase du projet de thèse avait pour objectif d'identifier un modèle de rat présentant une diminution de la biodisponibilité des protéines afin de tester ensuite les différentes matrices protéiques laitières dans un modèle le plus discriminant possible. A cet effet, la caséine micellaire native (C1), une protéine dont la bonne qualité nutritionnelle a déjà été démontrée [271] a été évaluée sur les différents modèles de rat. Les facteurs physiologiques sur lesquels nous nous sommes basés pour déterminer un modèle discriminant étaient l'âge et l'adiposité.

À cet égard, différents aspects en relation avec la digestion et l'utilisation de la caséine micellaire ont été examinés sur quatre groupes de rats présentant des âges et des niveaux d'adiposité variables. Les rats inclus dans notre étude étaient des jeunes rats (2 mois) et des rats d'âge moyen (11 mois) avec un niveau d'adiposité normal ou élevé. Nos principaux résultats ont montré que l'âge ralentissait la vidange gastrique de la caséine, augmentait la désamination postprandiale et réduisait le taux de synthèse protéique musculaire, tandis que l'adiposité augmentait légèrement la digestibilité de la caséine et contrebalançait les effets de l'âge sur l'utilisation de l'anabolisme protéique musculaire. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte concernant l'interprétation de nos résultats et sont discutés dans cette section.

Il existe peu d'études comparant directement les effets de l'âge sur la digestibilité des protéines et des acides aminés. En effet, cela s'avère compliqué chez l'Homme âgé en raison de la difficulté technique des méthodes impliquant la pose d'une sonde naso-iléale [190] et à ce jour peu d'études ont été réalisées chez le rat. Une étude comparant la digestibilité fécale de plusieurs sources de protéines chez des rats de 5 semaines et des rats de 20 mois a démontré qu'un âge plus avancé était associé à une baisse significative de la digestibilité fécale, et ce de manière plus importante pour les protéines les moins digestibles [198]. Nous n'avons pas mis en évidence cet effet de l'âge sur la digestibilité de la caséine micellaire pour des rats d'âge moyen. Il est possible qu'un impact de l'âge ait été observé si les rats avaient été plus âgés, puisque les rats de notre étude n'étaient âgés que de 11 mois. En revanche, bien que les rats n'étaient pas très âgés, des effets attribuables à l'âge sur l'utilisation

postprandiale des protéines ont tout de même été constatés dans notre étude, suggérant qu'il existerait des différences entre les rats d'âge moyen et les rats de 2 mois. Par ailleurs, la protéine que nous avons choisie, la caséine, est une protéine très digestible ce qui peut minimiser les différences observables. Ainsi, l'étude de Gilani et Sepehr a montré une diminution de la digestibilité de l'ordre de 3 % pour les sources très digestibles entre les jeunes rats et les rats âgés de 20 mois (99 et 96 % notamment pour la caséine), alors que celle-ci pouvait atteindre 17 % pour certaines sources contenant des facteurs antinutritionnels [198]. De plus, dans une autre étude, des rats de 20 mois présentaient des valeurs de digestibilité vraie de l'azote très élevées malgré leur âge avancé, de l'ordre de 97,6 % et 98,7 % respectivement pour la caséine et les protéines solubles [297]. En confrontant les résultats de ces études aux nôtres, il semble que l'âge n'impacte que légèrement la digestibilité des protéines très digestibles, mais une baisse de digestibilité plus importante pourrait être observée pour les sources moins digestibles, soulignant alors l'importance de la qualité protéique en fonction de l'âge.

Dans notre modèle, nous avons nourri les rats jeunes et d'âge moyen durant 4 semaines avec un régime hyperlipidique type « Western diet » afin d'obtenir des rats présentant une adiposité élevée. Il est difficile de caractériser un modèle d'obésité induite par le régime alimentaire chez le rat car des seuils standards n'ont pas été définis et ils diffèrent selon les études. En effet, les interventions nutritionnelles mises en place dans le but d'induire une obésité chez le rat ont des durées très variables, mais sont souvent relativement longues, de 10 semaines [298] à 20 semaines [299] ou encore de 24 semaines [211]. Dans cette dernière étude, la durée des interventions nutritionnelles a permis d'obtenir des rats qualifiés comme étant à un stade intermédiaire (16 semaines) ou avancé (24 semaines) d'obésité. Dans leur étude, le stade d'obésité était distingué en fonction des pourcentages d'adiposité, le poids entre les deux groupes s'étant stabilisé au bout de la seizième semaine. Dans la littérature, une augmentation de l'adiposité était aussi parfois associée à une augmentation d'environ 10 % du poids corporel par rapport aux groupes témoins [298,300]. Dans notre étude, l'intervention nutritionnelle n'a duré que 4 semaines, n'entraînant pas de différence en termes de poids corporel final. Cette intervention relativement courte a tout de même permis d'obtenir une augmentation de l'adiposité de 45 % pour les jeunes rats et de 50 % pour les

rats d'âge moyen par rapport à leurs homologues d'un même âge, indiquant une discrimination des modèles.

Une des particularités de notre étude est que nous avons évalué l'effet combiné de l'âge et de l'adiposité. Au vu de nos résultats, nous avons conclu qu'un niveau d'adiposité modérément élevé semblait compenser les altérations métaboliques des protéines liées à l'âge, notamment concernant la réduction de la réponse anabolique musculaire. L'âge et l'adiposité élevée ou l'obésité peuvent avoir des effets similaires sur la réponse métabolique, notamment concernant la sécrétion d'insuline ou l'anabolisme musculaire postprandial [301]. Il est en effet connu qu'un âge avancé est associé à une baisse de la synthèse protéique musculaire [203,203,302,303] et cela est souvent lié à l'apparition d'une insulino-résistance chez le sujet âgé [304]. Il en est de même pour l'obésité où un déclin de la réponse anabolique musculaire postprandiale chez l'Homme [305] est associé à une résistance à l'insuline [306]. Dans notre étude, nous avons bien retrouvé ces effets délétères de l'âge sur le métabolisme protéique, mais pas de l'adiposité qui semblait au contraire les contrebalancer. Ce résultat surprenant était toutefois en accord avec l'étude de Masgrau *et al.*, au cours de laquelle avait été observée une augmentation de la synthèse protéique musculaire à un stade intermédiaire de l'obésité [211]. On peut donc supposer qu'un niveau d'adiposité modéré pourrait avoir un effet bénéfique au cours du vieillissement [307], notamment sur le métabolisme protéique. Le rôle stimulateur de l'insuline, parallèlement à une biodisponibilité des acides aminés plasmatiques, sur l'anabolisme musculaire est maintenant bien établi [308]. Ainsi, il serait intéressant d'effectuer des dosages d'insuline afin de déterminer une potentielle association entre un taux d'insuline augmenté et la stimulation de la synthèse protéique musculaire observée au cours de l'étude chez les rats à un stade d'adiposité modéré.

Conclusion

Ces travaux nous ont permis de procéder à une caractérisation nutritionnelle complète de matrices protéiques laitières obtenues à partir de différents procédés technologiques, grâce à différents modèles de digestion *in vitro* et *in vivo*. Cette caractérisation est passée par une première étape de criblage, durant laquelle les profils peptidiques des différentes matrices ont été analysés lors de la digestion *in vitro* statique Infogest. L'assimilation et l'utilisation postprandiale des matrices d'intérêt sélectionnées suite à la phase *in vitro* a ensuite été évaluée chez le rat, après détermination d'un modèle présentant une diminution de l'efficacité digestive. Cette thèse multidisciplinaire est l'aboutissement d'un travail collaboratif impliquant l'expertise complémentaire de trois équipes.

La digestion *in vitro* nous a permis de procéder à une étape de criblage rapide et facile à mettre en place, mais aussi d'évaluer rapidement la dégradation des peptides au cours des différentes phases de la digestion. Ainsi, l'étude *in vitro* a été une première approche permettant de démontrer l'impact du procédé technologique sur la structure des caséines. Cet effet a été démontré par des différences quantitatives et qualitatives obtenues au niveau des profils peptidiques générés lors des différentes phases de la digestion, pour des caséines réticulées et déminéralisées par rapport à des caséines micellaires natives. L'étude des peptidomes à l'aide d'un outil innovant combinant la LC/MS-MS, la bio-informatique et les statistiques, a permis de montrer que la caséine déminéralisée présentait un nombre plus important de peptides résistants à la digestion par rapport à la caséine native, reflétant ainsi l'impact de la structure sur la dégradation des protéines au cours de la digestion *in vitro*.

Les résultats chez le rat ont permis d'obtenir plus de précisions sur le devenir des matrices protéiques après leur ingestion. Nos résultats ont démontré que les changements structuraux liés à la déminéralisation de la caséine n'affectaient pas sa digestibilité et n'avaient donc pas d'impact sur sa qualité nutritionnelle. En revanche, la modification du rapport protéines solubles et caséines a eu une répercussion sur la digestibilité, rendant cette matrice moins digestible que celles constituées uniquement de protéines solubles ou de caséines. Malgré des différences au niveau des cinétiques postprandiales de nos matrices, nos résultats pris dans leur ensemble ont mis en avant une bonne utilisation de toutes ces matrices laitières.

Ce projet de thèse a également permis d'étudier les effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestibilité de la caséine micellaire. Les résultats obtenus ont démontré un potentiel effet protecteur d'une adiposité modérée par rapport aux altérations liées au métabolisme protéique postprandial, comme l'augmentation de la désamination postprandiale des acides aminés liée à l'âge et la diminution de la synthèse des protéines musculaires. Une augmentation de la digestibilité ayant également été observée, une adiposité plus élevée pourrait également avoir participé en partie à contrebalancer cet effet par le biais d'une absorption plus élevée des acides aminés alimentaires disponibles pour une utilisation métabolique.

La combinaison des données obtenues *in vitro* et *in vivo* a permis de mieux comprendre le lien entre la structure, les propriétés fonctionnelles des matrices et leur utilisation métabolique dans différentes situations physiologiques. D'un point de vue industriel, ces données serviront à définir dans quelles applications nutritionnelles, chaque matrice, selon ses caractéristiques fonctionnelles et nutritionnelles, est la plus adaptée. Ainsi, chaque matrice protéique pourra être proposée pour la fabrication de produits alimentaires en fonction des besoins nutritionnels de populations spécifiques (personnes âgées, personnes en surpoids ou obèses par exemple). De plus, les peptides résistants à la digestion identifiés au cours de cette thèse pourront faire l'objet d'une étude portant sur la caractérisation de leur potentiel bioactif, afin de développer des ingrédients naturels issus du lait présentant des bénéfices sur la santé.

Enfin, cette thèse a permis de constituer une première étude de comparabilité des résultats obtenus en digestion *in vitro* statique et *in vivo* chez le rat. Ces données ayant été obtenues dans le contenu caecal de rat pourront être complétées par l'identification peptidique de l'ensemble des contenus du tube digestif afin d'établir des meilleures corrélations.

Références

- [1] FranceAgriMer 2021. <https://www.franceagrimer.fr/filiere-lait/La-filiere-Lait> (accessed November 30, 2020).
- [2] OECD-FAO Agriculture Outlook. 2019.
- [3] S. Lortal, Boudier JF. La valorisation de la matière première lait, évolution passée et perspectives. *Innovations Agronomiques* 2011;13:1–12.
- [4] Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, et al. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* 2004;87:1641–74. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6).
- [5] Thompson A, Boland M, Singh H, editors. *Milk proteins: from expression to food*. London: Academic; 2009.
- [6] Dupont D, Rémond D. Impact de la structure sur la digestion ; cas des produits laitiers. *Innovations Agronomiques* 2013;33:81–91.
- [7] Phadungath C. Casein micelle structure: a concise review 2005:12.
- [8] Farrell HM, Malin EL, Brown EM, Qi PX. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2006;11:135–47. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.005>.
- [9] Swaisgood HE. Review and Update of Casein Chemistry1, 2. *Journal of Dairy Science* 1993;76:3054–61. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77645-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77645-6).
- [10] Broyard C, Gaucheron F. Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Sci & Technol* 2015;95:831–62. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>.
- [11] de Kruif CG. Supra-aggregates of Casein Micelles as a Prelude to Coagulation. *Journal of Dairy Science* 1998;81:3019–28. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75866-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75866-7).
- [12] Gaucheron F. The minerals of milk. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:473–83. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005030>.
- [13] Fox PF, Brodtkorb A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* 2008;18:677–84. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>.
- [14] Noble RW, Waugh DF. CASEIN MICELLES. FORMATION AND STRUCTURE. I. *J Am Chem Soc* 1965;87:2236–45. <https://doi.org/10.1021/ja01088a025>.
- [15] Dalgleish DG, Corredig M. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu Rev Food Sci Technol* 2012;3:449–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>.
- [16] X. Qi P. Studies of casein micelle structure: the past and the present. *Le Lait* 2007;87:363–83.
- [17] Shimmin PD, Hill RD. An electron microscope study of the internal structure of casein micelles. *Journal of Dairy Research* 1964;31:121–3. <https://doi.org/10.1017/S0022029900017982>.
- [18] Morr CV. Effect of Oxalate and Urea upon Ultracentrifugation Properties of Raw and Heated Skimmilk Casein Micelles1. *Journal of Dairy Science* 1967;50:1744–51. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87710-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87710-5).
- [19] Walstra P. On the Stability of Casein Micelles1. *Journal of Dairy Science* 1990;73:1965–79. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3).

- [20] Horne DS. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2006;11:148–53. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.
- [21] Holt C. Structure and stability of bovine casein micelles. *Adv Protein Chem* 1992;43:63–151. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60554-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60554-9).
- [22] Horne DS. Casein Interactions: Casting Light on the Black Boxes, the Structure in Dairy Products. *International Dairy Journal* 1998;8:171–7. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00040-5).
- [23] O’Kennedy BT. 2 - Caseins. In: Phillips GO, Williams PA, editors. *Handbook of Food Proteins*, Woodhead Publishing; 2011, p. 13–29. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.13>.
- [24] Ribadeau-Dumas B, Grappin R. Milk protein analysis. *Le Lait* 1989;69:357–416.
- [25] Wijayanti HB, Bansal N, Deeth HC. Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014;13:1235–51. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12105>.
- [26] Qian F, Sun J, Cao D, Tuo Y, Jiang S, Mu G. Experimental and Modelling Study of the Denaturation of Milk Protein by Heat Treatment. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2017;37:44–51. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.44>.
- [27] Pelegrine DHG, Gasparetto CA. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology* 2005;38:77–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>.
- [28] Sawyer L. β -Lactoglobulin. In: Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins: Part A / Part B*, Boston, MA: Springer US; 2003, p. 319–86. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_7.
- [29] Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science* 2004;87:785–96. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1).
- [30] Sakurai K, Goto Y. Manipulating monomer-dimer equilibrium of bovine Beta - lactoglobulin by amino acid substitution. *J Biol Chem* 2002;277:25735–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203659200>.
- [31] Crowther JM, Jameson GB, Dobson AJH and RCJ. Structure, Oligomerisation and Interactions of β -Lactoglobulin. *Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects* 2016. <https://doi.org/10.5772/62992>.
- [32] Visser J, Jeurnink ThJM. Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Experimental Thermal and Fluid Science* 1997;14:407–24. [https://doi.org/10.1016/S0894-1777\(96\)00142-2](https://doi.org/10.1016/S0894-1777(96)00142-2).
- [33] Creamer LK, Parry DAD, Malcolm GN. Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983;227:98–105. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90351-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90351-X).
- [34] Pessen H, Purcell JM, Farrell HM. Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1985;828:1–12. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90002-0).
- [35] Permyakov EA, Berliner LJ. α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters* 2000;473:269–74. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01546-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5).

- [36] Relkin P, Launay B, Eynard L. Effect of Sodium and Calcium Addition on Thermal Denaturation of Apo- α -Lactalbumin: a Differential Scanning Calorimetric Study. *Journal of Dairy Science* 1993;76:36–47. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77321-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77321-X).
- [37] Wehbi Z, Pérez M-D, Sánchez L, Pocoví C, Barbana C, Calvo M. Effect of heat treatment on denaturation of bovine alpha-lactalbumin: determination of kinetic and thermodynamic parameters. *J Agric Food Chem* 2005;53:9730–6. <https://doi.org/10.1021/jf050825y>.
- [38] Huang BX, Kim H-Y, Dass C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2004;15:1237–47. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.05.004>.
- [39] Gapper LW, Copestake DEJ, Otter DE, Indyk HE. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem* 2007;389:93–109. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1391-z>.
- [40] Giansanti F, Panella G, Leboffe L, Antonini G. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals (Basel)* 2016;9. <https://doi.org/10.3390/ph9040061>.
- [41] Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A&B*. 3rd ed. Springer US; 2003. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3>.
- [42] Barbano DM. A 100-Year Review: The production of fluid (market) milk. *Journal of Dairy Science* 2017;100:9894–902. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13561>.
- [43] Burke N, Zacharski KA, Southern M, Hogan P, Ryan MP, Adley CC. The Dairy Industry: Process, Monitoring, Standards, and Quality. *Descriptive Food Science* 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80398>.
- [44] Maubois J. Separation, extraction and fractionation of milk protein components. *Le Lait* 1984;64:485–95.
- [45] Snappe J-J, Lepoudere A, Sredzinski N. Protéines laitières. Ref: TIP700WEB - “Agroalimentaire” 2010. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/additifs-et-adjuvants-alimentaires-42426210/proteines-laitieres-f4820/> (accessed January 11, 2021).
- [46] Eykamp W. Chapter 1 Microfiltration and ultrafiltration. In: Noble RD, Stern SA, editors. *Membrane Science and Technology*, vol. 2, Elsevier; 1995, p. 1–43. [https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(06\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(06)80003-3).
- [47] Carter BG, Cheng N, Kapoor R, Meletharayil GH, Drake MA. Invited review: Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk. *Journal of Dairy Science* 2021:S0022030221000126. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18811>.
- [48] Cayot P, Finot P-A, Fouques D, Gueguen T, Lorient D, Meunier J-C, et al. Tome 2: Caractéristiques des différentes sources de protéines alimentaires 1997. <https://docplayer.fr/12122042-Dossier-scientifique-de-l-ifn-n-9-bis-les-proteines.html> (accessed January 20, 2021).
- [49] Lucey J, Singh H. Acid Coagulation of Milk, 2003, p. 1001–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_28.
- [50] Silva NN, Piot M, de Carvalho AF, Violleau F, Fameau A-L, Gaucheron F. pH-induced demineralization of casein micelles modifies their physico-chemical and foaming properties. *Food Hydrocolloids* 2013;32:322–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.004>.

- [51] Nogueira, Humblot L, Singh RP, Dieude-Fauvel E, Doumert B, Nasser S, et al. The heterogeneous substructure of casein micelles evidenced by SAXS and NMR in demineralized samples. *Food Hydrocolloids* 2021;117:106653. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106653>.
- [52] Nogueira MH, Ben-Harb S, Schmutz M, Doumert B, Nasser S, Derensy A, et al. Multiscale quantitative characterization of demineralized casein micelles: How the partial excision of nano-clusters leads to the aggregation during rehydration. *Food Hydrocolloids* 2020;105:105778. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105778>.
- [53] Lazzaro F, Saint-Jalmes A, Violleau F, Lopez C, Gaucher-Delmas M, Madec M-N, et al. Gradual disaggregation of the casein micelle improves its emulsifying capacity and decreases the stability of dairy emulsions. *Food Hydrocolloids* 2017;63:189–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.037>.
- [54] Oteng-Pabi SK, Pardin C, Stoica M, Keillor JW. Site-specific protein labelling and immobilization mediated by microbial transglutaminase. *Chem Commun* 2014;50:6604–6. <https://doi.org/10.1039/C4CC00994K>.
- [55] Nogueira MH, Tavares GM, Nogueira Silva NF, Casanova F, Stringheta PC, Gaucheron F, et al. Physico-chemical stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase as a function of acidic pH. *Food Structure* 2019;19:100103. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2018.100103>.
- [56] Coskun AEI. Preparation, structure and stability of sodium caseinate and gelatin micro-particles. *Food Hydrocolloids* 2015:10.
- [57] Dagleish DG, Spagnuolo PA, Douglas Goff H. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* 2004;14:1025–31. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.008>.
- [58] Wang X, Ye A, Lin Q, Han J, Singh H. Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an in vitro dynamic model. *Journal of Dairy Science* 2018;101:6842–52. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14284>.
- [59] Ince Coskun AE, Sağlam D, Venema P, van der Linden E, Scholten E. Preparation, structure and stability of sodium caseinate and gelatin micro-particles. *Food Hydrocolloids* 2015;45:291–300. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.026>.
- [60] Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health*. Cham: Springer International Publishing; 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>.
- [61] Goodman BE. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Adv Physiol Educ* 2010;34:44–53. <https://doi.org/10.1152/advan.00094.2009>.
- [62] Fruton JS. Specificity and Mechanism of Pepsin Action. In: Desnuelle P, Neurath H, Ottesen M, editors. *Structure–Function Relationships of Proteolytic Enzymes*, Academic Press; 1970, p. 222–36. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-211850-0.50022-7>.
- [63] Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1992;55:299S–308S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.1.299s>.
- [64] Santangelo A, Peracchi M, Conte D, Fraquelli M, Porrini M. Physical state of meal affects gastric emptying, cholecystokinin release and satiety. *Br J Nutr* 1998;80:521–7. <https://doi.org/10.1017/s0007114598001615>.
- [65] Weber E, Ehrlein HJ. Relationships between gastric emptying and intestinal absorption of nutrients and energy in mini pigs. *Dig Dis Sci* 1998;43:1141–53. <https://doi.org/10.1023/a:1018874800819>.

- [66] Shimoyama Y, Kusano M, Kawamura O, Zai H, Kuribayashi S, Higuchi T, et al. High-viscosity liquid meal accelerates gastric emptying. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:879–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.00972.x>.
- [67] Kalogeris TJ, Reidelberger RD, Mendel VE. Effect of nutrient density and composition of liquid meals on gastric emptying in feeding rats. *Am J Physiol* 1983;244:R865–871. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1983.244.6.R865>.
- [68] Velehik MG, Reynolds JC, Alavi A. The Effect of Meal Energy Content on Gastric Emptying 1989:5.
- [69] Camilleri M. Gastrointestinal Hormones and Regulation of Gastric Emptying. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2019;26:3–10. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000448>.
- [70] 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. *The Journal of Nutrition* 1999;129:890–5. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.890>.
- [71] Konno T, Kamatari YO, Tanaka N, Kamikubo H, Dobson CM, Nagayama K. A Partially Unfolded Structure of the Alkaline-Denatured State of Pepsin and Its Implication for Stability of the Zymogen-Derived Protein 2000:9.
- [72] Caron J, Domenger D, Dhulster P, Ravallec R, Cudennec B. Protein Digestion-Derived Peptides and the Peripheral Regulation of Food Intake. *Front Endocrinol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00085>.
- [73] Erickson RH, Kim YS. Digestion and absorption of dietary protein. *Annu Rev Med* 1990;41:133–9. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.41.020190.001025>.
- [74] Bhutia, Ganapathy. Protein Digestion and Absorption. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, vol. 2, 2018, p. 1667–92. <https://doi.org/10.1016/B978-012088394-3/50068-4>.
- [75] Foltz M, Meynen EE, Bianco V, van Platerink C, Koning TMMG, Kloek J. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Lactotripeptide-Enriched Milk Beverage Are Absorbed Intact into the Circulation. *The Journal of Nutrition* 2007;137:953–8. <https://doi.org/10.1093/jn/137.4.953>.
- [76] Roberts PR, Burney JD, Black KW, Zaloga GP. Effect of Chain Length on Absorption of Biologically Active Peptides from the Gastrointestinal Tract. *DIG* 1999;60:332–7. <https://doi.org/10.1159/000007679>.
- [77] Gardner. Absorption of Intact Peptides: Studies on Transport of Protein Digests and Dipeptides Across Rat Small Intestine in Vitro. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 1982;67:629–37. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1982.sp002682>.
- [78] Gardner. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annu Rev Nutr* 1988;8:329–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.001553>.
- [79] Kim K-J, Matsukawa Y, Yamahara H, Kalra VK, Lee VHL, Crandall ED. Absorption of intact albumin across rat alveolar epithelial cell monolayers. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003;284:L458–65. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00237.2002>.
- [80] Worthington BS, Enwonwu C. Absorption of intact protein by colonic epithelial cells of the rat. *Am J Dig Dis* 1975;20:750–63. <https://doi.org/10.1007/BF01070833>.
- [81] Heyman M, Ducroc R, Desjeux JF, Morgat JL. Horseradish peroxidase transport across adult rabbit jejunum in vitro. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1982. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1982.242.6.G558>.

- [82] Miner-Williams WM, Stevens BR, Moughan PJ. Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Reviews* 2014;27:308–29. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000225>.
- [83] Vermeirssen V, Camp JV, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition* 2004;92:357–66. <https://doi.org/10.1079/BJN20041189>.
- [84] Daniel H. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 2004;66:361–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149>.
- [85] Steinhardt HJ, Adibi SA. Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyl-dipeptides in human jejunum. *Gastroenterology* 1986;90:577–82. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(86\)91111-x](https://doi.org/10.1016/0016-5085(86)91111-x).
- [86] Ganapathy, Ganapathy ME, Leibach FH. Chapter 10 Intestinal transport of peptides and amino acids. *Current Topics in Membranes*, vol. 50, Academic Press; 2001, p. 379–412. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(00\)50012-X](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(00)50012-X).
- [87] Wang C-Y, Liu S, Xie X-N, Tan Z-R. Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). *Drug Des Devel Ther* 2017;11:3511–7. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S151725>.
- [88] Shiraga T, Miyamoto K, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, et al. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology* 1999;116:354–62. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70132-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70132-0).
- [89] Walker D, Thwaites DT, Simmons NL, Gilbert HJ, Hirst BH. Substrate upregulation of the human small intestinal peptide transporter, hPepT1. *J Physiol* 1998;507:697–706. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.697bs.x>.
- [90] Thamotharan M, Bawani SZ, Zhou X, Adibi SA. Hormonal regulation of oligopeptide transporter Pept-1 in a human intestinal cell line. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1999;276:C821–6. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.4.C821>.
- [91] Sun B-W, Zhao X-C, Wang G-J, Li N, Li J-S. Hormonal regulation of dipeptide transporter (PepT1) in Caco-2 cells with normal and anoxia/reoxygenation management. *World J Gastroenterol* 2003;9:808–12. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i4.808>.
- [92] Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev* 2008;88:249–86. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>.
- [93] Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology* 2000;11:347–56. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00003-6).
- [94] Minkiewicz, Iwaniak, Darewicz. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *IJMS* 2019;20:5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>.
- [95] FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 2004;134:980S–8S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.980S>.
- [96] Turpeinen AM, Kumpu M, Rönneck M, Seppo L, Kautiainen H, Jauhiainen T, et al. Antihypertensive and cholesterol-lowering effects of a spread containing bioactive peptides IPP and VPP and plant sterols. *Journal of Functional Foods* 2009;1:260–5. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.03.001>.
- [97] Cheison SC, Wang Z, Xu SY. Preparation of Whey Protein Hydrolysates Using a Single- and Two-Stage Enzymatic Membrane Reactor and Their Immunological and Antioxidant Properties: Characterization by Multivariate Data Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007.

- [98] Caron J, Cudennec B, Domenger D, Belguesmia Y, Flahaut C, Kouach M, et al. Simulated GI digestion of dietary protein: Release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion. *Food Research International* 2016;89:382–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.033>.
- [99] Theysgeur S, Cudennec B, Deracinois B, Perrin C, Guiller I, Lepoudère A, et al. New Bioactive Peptides Identified from a Tilapia Byproduct Hydrolysate Exerting Effects on DPP-IV Activity and Intestinal Hormones Regulation after Canine Gastrointestinal Simulated Digestion. *Molecules* 2021;26:136. <https://doi.org/10.3390/molecules26010136>.
- [100] Dallas DC, Guerrero A, Parker EA, Robinson RC, Gan J, German JB, et al. Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. *Proteomics* 2015;15:1026–38. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400310>.
- [101] Minkiewicz, Dziuba, Darewicz, Iwaniak, Dziuba, Nałęcz. Food Peptidomics. *Food Technol Biotechnol* 2008;46:1–10.
- [102] Dallas, Sanctuary MR, QU Y, Khajavi SH, Van Zandt AE, Dyandra M, et al. Personalizing Protein Nourishment. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:3313–31. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1117412>.
- [103] Chacko A, Cummings JH. Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effect of physical form of food. *Gut* 1988;29:809–15.
- [104] 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;68:95–107. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.005>.
- [105] Ziegler TR, Fernández-Estívariz C, Gu LH, Bazargan N, Umeakunne K, Wallace TM, et al. Distribution of the H⁺/peptide transporter PepT1 in human intestine: up-regulated expression in the colonic mucosa of patients with short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002;75:922–30. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.5.922>.
- [106] Van der Wielen N, Moughan PJ, Mensink M. Amino Acid Absorption in the Large Intestine of Humans and Porcine Models. *The Journal of Nutrition* 2017;147:1493–8. <https://doi.org/10.3945/jn.117.248187>.
- [107] James PS, Smith MW. Methionine transport by pig colonic mucosa measured during early post-natal development. *J Physiol* 1976;262:151–68.
- [108] Smith MW, James PS. Amino acid transport by the helicoidal colon of the new-born pig. *Biochim Biophys Acta* 1976;419:391–4. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90366-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90366-7).
- [109] Fuller M. Determination of protein and amino acid digestibility in foods including implications of gut microbial amino acid synthesis. *British Journal of Nutrition* 2012;108:S238–46. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002279>.
- [110] Stein TP. Nutrition and Protein Turnover: A Review. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1982;6:444–54. <https://doi.org/10.1177/0148607182006005444>.
- [111] AFSSA. AFSSA Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. 2007.
- [112] Arnal, Benamouzig R, Boirie Y, Cynober L, Dardovet D, Darmaun D, et al. Tome 1: Le métabolisme et les besoins protéiques chez l'homme 1997. <https://docplayer.fr/1495281-Dossier-scientifique-de-l-ifn-n-9-les-proteines.html> (accessed January 20, 2021).

- [113] Ibba M, Stathopoulos C, Söll D. Protein synthesis: Twenty three amino acids and counting. *Current Biology* 2001;11:R563–5. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00344-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00344-X).
- [114] Reeds PJ. Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. *The Journal of Nutrition* 2000;130:1835S-1840S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1835S>.
- [115] Blanco A, Blanco G. Chapter 16 - Amino Acid Metabolism. In: Blanco A, Blanco G, editors. *Medical Biochemistry*, Academic Press; 2017, p. 367–99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00016-1>.
- [116] Bos C, Stoll B, Fouillet H, Gaudichon C, Guan X, Grusak MA, et al. Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2005;288:E436–46. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00263.2004>.
- [117] Burrin DG, Ferrell CL, Eisemann JH, Britton RA, Nienaber JA. Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep*. *British Journal of Nutrition* 1989;62:23–34. <https://doi.org/10.1079/BJN19890005>.
- [118] Stoll B, Henry J, Reeds PJ, Yu H, Jahoor F, Burrin DG. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J Nutr* 1998;128:606–14. <https://doi.org/10.1093/jn/128.3.606>.
- [119] Yen JT, Nienaber JA, Hill DA, Pond WG. Oxygen consumption by portal vein-drained organs and by whole animal in conscious growing swine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989;190:393–8. <https://doi.org/10.3181/00379727-190-42878>.
- [120] Burrin DG, Stoll B. Chapter 7 Splanchnic protein and amino acid metabolism in growing animals. In: Burrin DG, Mersmann HJ, editors. *Biology of Growing Animals*, vol. 3, Elsevier; 2005, p. 157–96. [https://doi.org/10.1016/S1877-1823\(09\)70014-1](https://doi.org/10.1016/S1877-1823(09)70014-1).
- [121] Harper D, Chandler B. Splanchnic circulation. *BJA Education* 2016;16:66–71. <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkv017>.
- [122] Parks DA, Jacobson ED. Physiology of the splanchnic circulation. *Arch Intern Med* 1985;145:1278–81.
- [123] van der Flier LG, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology* 2009;71:241–60. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>.
- [124] Have GAMT, Engelen MPKJ, Luiking YC, Deutz NEP. Absorption Kinetics of Amino Acids, Peptides, and Intact Proteins. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2007;17:S23–36. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.17.s1.s23>.
- [125] Deutz NEP, Bruins MJ, Soeters PB. Infusion of Soy and Casein Protein Meals Affects Interorgan Amino Acid Metabolism and Urea Kinetics Differently in Pigs. *The Journal of Nutrition* 1998;128:2435–45. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2435>.
- [126] Yu YM, Wagner DA, Tredget EE, Walaszewski JA, Burke JF, Young VR. Quantitative role of splanchnic region in leucine metabolism: L-[1-¹³C,¹⁵N]leucine and substrate balance studies. *Am J Physiol* 1990;259:E36–51. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1990.259.1.E36>.
- [127] Hoerr RA, Matthews DE, Bier DM, Young VR. Effects of protein restriction and acute refeeding on leucine and lysine kinetics in young men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1993;264:E567–75. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.4.E567>.
- [128] Wu. Intestinal Mucosal Amino Acid Catabolism. *The Journal of Nutrition* 1998;128:1249–52. <https://doi.org/10.1093/jn/128.8.1249>.

- [129] Matthews DE, Marano MA, Campbell RG. Splanchnic bed utilization of glutamine and glutamic acid in humans. *Am J Physiol* 1993;264:E848-854. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1993.264.6.E848>.
- [130] Windmueller HG. Glutamine Utilization by the Small Intestine. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Ltd; 1982, p. 201–37. <https://doi.org/10.1002/9780470122983.ch6>.
- [131] Liu, Wang H, Liang X, Roberts MS. Chapter 30 - Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiology*, Boston: Academic Press; 2017, p. 391–400. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00030-8>.
- [132] Jungas RL, Halperin ML, Brosnan JT. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiol Rev* 1992;72:419–48. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.2.419>.
- [133] Alamri ZZ. The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* 2018;7:2271–6. <https://doi.org/10.18203/2319-2003.ijbcp20184211>.
- [134] Fouillet, 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. *The Journal of Nutrition* 2002;132:125–33. <https://doi.org/10.1093/jn/132.1.125>.
- [135] Fouillet, Gaudichon C, Mariotti F, Bos C, Huneau J-F, Tomé D. Energy, nutrients modulate the splanchnic sequestration of dietary nitrogen in humans: A compartmental analysis. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2001;281:E248-60. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.281.2.E248>.
- [136] Platell C, Kong S-E, McCauley R, Hall JC. Branched-chain amino acids. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2000;15:706–17. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02205.x>.
- [137] Abumrad NN, Robinson RP, Gooch BR, Lacy WW. The effect of leucine infusion on substrate flux across the human forearm. *J Surg Res* 1982;32:453–63. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(82\)90126-3](https://doi.org/10.1016/0022-4804(82)90126-3).
- [138] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *The Three Roles of RNA in Protein Synthesis*. *Molecular Cell Biology* 4th Edition 2000.
- [139] Souba WW, Pacitti AJ. How amino acids get into cells: mechanisms, models, menus, and mediators. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1992;16:569–78. <https://doi.org/10.1177/0148607192016006569>.
- [140] Gumà A, Testar X, Palacín M, Zorzano A. Insulin-stimulated alpha-(methyl)aminoisobutyric acid uptake in skeletal muscle. Evidence for a short-term activation of uptake independent of Na⁺ electrochemical gradient and protein synthesis. *Biochem J* 1988;253:625–9.
- [141] Fujita S, Rasmussen BB, Cadenas JG, Grady JJ, Volpi E. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E745–54. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00271.2005>.
- [142] Fukagawa NK, Minaker KL, Young VR, Matthews DE, Bier DM, Rowe JW. Leucine metabolism in aging humans: effect of insulin and substrate availability. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1989;256:E288–94. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1989.256.2.E288>.

- [143] Fukagawa NK, Minaker KL, Rowe JW, Matthews DE, Bier DM, Young VR. Glucose and amino acid metabolism in aging man: Differential effects of insulin. *Metabolism* 1988;37:371–7. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(88\)90138-2](https://doi.org/10.1016/0026-0495(88)90138-2).
- [144] Mosoni L, Mirand PP, Houlier ML, Arnal M. Age-related changes in protein synthesis measured in vivo in rat liver and gastrocnemius muscle. *Mechanisms of Ageing and Development* 1993;68:209–20. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(93\)90152-H](https://doi.org/10.1016/0047-6374(93)90152-H).
- [145] Fryburg DA, Jahn LA, Hill SA, Oliveras DM, Barrett EJ. Insulin and insulin-like growth factor-I enhance human skeletal muscle protein anabolism during hyperaminoacidemia by different mechanisms. *J Clin Invest* 1995;96:1722–9. <https://doi.org/10.1172/JCI118217>.
- [146] Gelfand RA, Barrett EJ. Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J Clin Invest* 1987;80:1–6. <https://doi.org/10.1172/JCI113033>.
- [147] Smith OL. Insulin inhibits protein degradation in skeletal muscles of eviscerated fasted rats. *Metabolism* 1988;37:976–81. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(88\)90156-4](https://doi.org/10.1016/0026-0495(88)90156-4).
- [148] 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;552:315–24. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.050674>.
- [149] Nygren J, Nair KS. Differential Regulation of Protein Dynamics in Splanchnic and Skeletal Muscle Beds by Insulin and Amino Acids in Healthy Human Subjects. *Diabetes* 2003;52:1377–85. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.6.1377>.
- [150] Busquets S, Alvarez B, López-Soriano FJ, Argilés JM. Branched-chain amino acids: A role in skeletal muscle proteolysis in catabolic states? *Journal of Cellular Physiology* 2002;191:283–9. <https://doi.org/10.1002/jcp.10097>.
- [151] Dardevet D, Sornet C, Balage M, Grizard J. Stimulation of In Vitro Rat Muscle Protein Synthesis by Leucine Decreases with Age. *The Journal of Nutrition* 2000;130:2630–5. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2630>.
- [152] 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. *The Journal of Nutrition* 2000;130:2413–9. <https://doi.org/10.1093/jn/130.10.2413>.
- [153] Nagasawa T, Kido T, Yoshizawa F, Ito Y, Nishizawa N. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *J Nutr Biochem* 2002;13:121–7. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(01\)00209-1](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(01)00209-1).
- [154] Kimball SR, Jefferson LS. Signaling Pathways and Molecular Mechanisms through which Branched-Chain Amino Acids Mediate Translational Control of Protein Synthesis. *The Journal of Nutrition* 2006;136:227S–231S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.1.227S>.
- [155] Suryawan A, Orellana RA, Fiorotto ML, Davis TA. Leucine acts as a nutrient signal to stimulate protein synthesis in neonatal pigs. *J Anim Sci* 2011;89:2004–16. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3400>.
- [156] Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 2000;267:6321–30. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01719.x>.
- [157] Proud CG. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* 2002;269:5338–49. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03292.x>.

- [158] Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC. A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics* 2000;154:787–801.
- [159] FAO. Dietary protein quality evaluation in human nutrition: Report of an FAO Expert Consultation, 31 March - 2 April 2011, Auckland, New Zealand. Rome, Italy: FAO; 2013.
- [160] Tomé D. Digestibility Issues of Vegetable versus Animal Proteins: Protein and Amino Acid Requirements—Functional Aspects. *Food Nutr Bull* 2013;34:272–4. <https://doi.org/10.1177/156482651303400225>.
- [161] Gilani G, Cockell K, Sepehr E. Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods. *Journal of AOAC International* 2005;88:967–87. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.3.967>.
- [162] Carbonaro M, Maselli P, Nucara A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: a Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study. *Amino Acids* 2012;43:911–21. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1151-4>.
- [163] Luiking YC, Deutz NEP, Jäkel M, Soeters PB. Casein and Soy Protein Meals Differentially Affect Whole-Body and Splanchnic Protein Metabolism in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition* 2005;135:1080–7. <https://doi.org/10.1093/jn/135.5.1080>.
- [164] 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. *The Journal of Nutrition* 2003;133:1308–15. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1308>.
- [165] van Vliet S, Burd NA, van Loon LJ. The Skeletal Muscle Anabolic Response to Plant-versus Animal-Based Protein Consumption. *The Journal of Nutrition* 2015;145:1981–91. <https://doi.org/10.3945/jn.114.204305>.
- [166] 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. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2008;87:1702–14. <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.6.1702>.
- [167] Yvon M, VAN HILLE I, PÉLISSIER J-P, GUILLOTEAU P, TOULLEC R. In vivo milk digestion in the calf abomasum. II. Milk and whey proteolysis. *Reproduction Nutrition Développement* 1984;24:835–43.
- [168] Hodgkinson AJ, Wallace OAM, Boggs I, Broadhurst M, Prosser CG. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. *Food Chemistry* 2018;245:275–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.028>.
- [169] Mandalari G, Adel-Patient K, Barkholt V, Baro C, Bennett L, Bublin M, et al. In vitro digestibility of β -casein and β -lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: A multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2009;55:372–81. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.08.010>.
- [170] Miralles B, Del Barrio R, Cueva C, Recio I, Amigo L. Dynamic gastric digestion of a commercial whey protein concentrate[†]. *J Sci Food Agric* 2018;98:1873–9. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8668>.
- [171] Dupont D, Tomé D. Milk proteins: Digestion and absorption in the gastrointestinal tract. *Milk Proteins*, Elsevier; 2020, p. 701–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00020-7>.
- [172] Inglingstad RA, Devold TG, Eriksen EK, Holm H, Jacobsen M, Liland KH, et al. Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human

- milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Sci Technol* 2010;90:549–63. <https://doi.org/10.1051/dst/2010018>.
- [173] Malaki Nik A, Wright AJ, Corredig M. Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *Journal of Colloid and Interface Science* 2010;344:372–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.006>.
- [174] Boutrou R, Gaudichon C, Dupont D, Jardin J, Airinei G, Marsset-Baglieri A, et al. Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2013;97:1314–23. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.055202>.
- [175] Mahé S, Benamouzig R, Gaudichon C, Huneau JF, De Cruz I, Rautureau J, et al. Nitrogen movements in the upper jejunum lumen in humans fed low amounts of casein or beta-lactoglobulin. *Gastroenterol Clin Biol* 1995;19:20–6.
- [176] Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrère B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14930–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>.
- [177] Tomé D, Debabbi H. Physiological Effects of Milk Protein Components. *International Dairy Journal* 1998;8:383–92. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00061-2).
- [178] Lacroix M, Bos C, Léonil J, Airinei G, Luengo C, Daré S, 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. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.5.1070>.
- [179] Kanda A, Nakayama K, Sanbongi C, Nagata M, Ikegami S, Itoh H. Effects of Whey, Caseinate, or Milk Protein Ingestion on Muscle Protein Synthesis after Exercise. *Nutrients* 2016;8:339. <https://doi.org/10.3390/nu8060339>.
- [180] Sarwar G. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score Method Overestimates Quality of Proteins Containing Antinutritional Factors and of Poorly Digestible Proteins Supplemented with Limiting Amino Acids in Rats. *The Journal of Nutrition* 1997;127:758–64. <https://doi.org/10.1093/jn/127.5.758>.
- [181] Dalgleish DG. Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J Agric Food Chem* 1990;38:1995–9. <https://doi.org/10.1021/jf00101a001>.
- [182] Van Boekel MAJS. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* 1998;62:403–14. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00075-2).
- [183] Seiquer I, Díaz-Alguacil J, Delgado-Andrade C, López-Frías M, Muñoz Hoyos A, Galdó G, et al. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1082–8. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.1082>.
- [184] Rérat A, Calmes R, Vaissade P, Finot P-A. Nutritional and metabolic consequences of the early Maillard reaction of heat treated milk in the pig. *Eur J Nutr* 2002;41:1–11. <https://doi.org/10.1007/s003940200000>.
- [185] de Vrese M, Frik R, Roos N, Hagemester H. Protein-bound D-amino acids, and to a lesser extent lysinoalanine, decrease true ileal protein digestibility in minipigs as determined with (15)N-labeling. *J Nutr* 2000;130:2026–31. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2026>.
- [186] Lacroix M, Bos Cécile, Airinei Gheorge, Fauquant Jacques, Tomé Daniel, Gaudichon Claire. Heat markers and quality indexes of industrially heat-treated [15N] milk protein measured in rats. *J Agric Food Chem* 2006;54:1508–17. <https://doi.org/10.1021/jf051304d>.
- [187] Huppertz T, Lambers TT. Influence of micellar calcium phosphate on in vitro gastric coagulation and digestion of milk proteins in infant formula model systems.

- [188] Halabi A, Croguennec T, Bouhallab S, Dupont D, Deglaire A. Modification of protein structures by altering the whey protein profile and heat treatment affects *in vitro* static digestion of model infant milk formulas. *Food Funct* 2020;11:6933–45. <https://doi.org/10.1039/D0FO01362E>.
- [189] Harper EJ. Changing Perspectives on Aging and Energy Requirements: Aging and Digestive Function in Humans, Dogs and Cats. *The Journal of Nutrition* 1998;128:2632S–2635S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.12.2632S>.
- [190] Rémond D, Shahar DR, Gille D, Pinto P, Kachal J, Peyron M-A, et al. Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget* 2015;6:13858–98.
- [191] Evans M, Triggs E, Cheung M, Broe G, Creasey H. Gastric Emptying Rate in the Elderly: Implications for Drug Therapy. *Journal of the American Geriatrics Society* 1981;29:201–5. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1981.tb01766.x>.
- [192] Horowitz M, Maddern GJ, Chatterton BE, Collins PJ, Harding PE, Shearman DJC. Changes in Gastric Emptying Rates with Age. *Clinical Science* 1984;67:213–8. <https://doi.org/10.1042/cs0670213>.
- [193] Horiuchi A, Tanaka N, Sakai R, Kawamata Y. Effect of Age and Elemental Diets on Gastric Emptying in Rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology Research* 2014;3:1340–3. <https://doi.org/10.17554/j.issn.2224-3992.2014.03.462>.
- [194] Smits GJM, Lefebvre RA. Influence of aging on gastric emptying of liquids, small intestine transit, and fecal output in rats. *Experimental Gerontology* 1996;31:589–96. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(96\)00029-0](https://doi.org/10.1016/0531-5565(96)00029-0).
- [195] Milan AM, D’Souza RF, Pundir S, Pileggi CA, Barnett MPG, Markworth JF, et al. Older adults have delayed amino acid absorption after a high protein mixed breakfast meal. *J Nutr Health Aging* 2015;19:839–45. <https://doi.org/10.1007/s12603-015-0500-5>.
- [196] Chambon-Savanovitch C, Felgines C, Walrand S, Raul F, Zarrabian S, Meunier M-T, et al. A Pancreatic Extract–Enriched Diet Improves the Nutritional Status of Aged Rats. *The Journal of Nutrition* 2001;131:813–9. <https://doi.org/10.1093/jn/131.3.813>.
- [197] Sarwar Gilani, 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 Suppl 2:S315–332. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002371>.
- [198] Gilani GS, Sepehr E. Protein digestibility and quality in products containing antinutritional factors are adversely affected by old age in rats. *J Nutr* 2003;133:220–5. <https://doi.org/10.1093/jn/133.1.220>.
- [199] Boirie Y, Gachon P, Beaufrère B. Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* 1997;65:489–95. <https://doi.org/10.1093/ajcn/65.2.489>.
- [200] Jourdan, Cynober L, Moinard C, Blanc MC, Neveux N, De Bandt JP, et al. Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats: *in vivo* and *ex vivo* experiments using a model of isolated perfused liver. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2008;294:R748–55. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00291.2007>.

- [201] Jourdan, Deutz NEP, Cynober L, Aussel C. Features, Causes and Consequences of Splanchnic Sequestration of Amino Acid in Old Rats. *PLoS One* 2011;6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027002>.
- [202] Jourdan, Deutz NEP, Cynober L, Aussel C. Consequences of age-related splanchnic sequestration of leucine on interorgan glutamine metabolism in old rats. *Journal of Applied Physiology* 2013;115:229–34. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01230.2012>.
- [203] Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Grizard J. Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J Nutr* 2002;132:95–100. <https://doi.org/10.1093/jn/132.1.95>.
- [204] Berrazaga I, Micard V, Gueugneau M, Walrand S. The Role of the Anabolic Properties of Plant- versus Animal-Based Protein Sources in Supporting Muscle Mass Maintenance: A Critical Review. *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11081825>.
- [205] Tosetti C, Corinaldesi R, Stanghellini V, Pasquali R, Corbelli C, Zoccoli G, et al. Gastric emptying of solids in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:200–5.
- [206] Wright RA, Krinsky S, Fleeman C, Trujillo J, Teague E. Gastric emptying and obesity. *Gastroenterology* 1983;84:747–51.
- [207] Xing J, Chen JDZ. Alterations of Gastrointestinal Motility in Obesity. *Obesity Research* 2004;12:1723–32. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.213>.
- [208] Teixeira TFS, Collado MC, Ferreira CLLF, Bressan J, Peluzio M do CG. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutrition Research* 2012;32:637–47. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.07.003>.
- [209] Do TTH, Hindlet P, Waligora-Dupriet A-J, Kapel N, Neveux N, Mignon V, et al. Disturbed intestinal nitrogen homeostasis in a mouse model of high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306:E668-680. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00437.2013>.
- [210] Estornell E, Cabo-Soler J, Barber T. Protein synthesis is stimulated in nutritionally obese rats. *The Journal of Nutrition* 1995;125:1309–15. <https://doi.org/10.1093/jn/125.5.1309>.
- [211] Masgrau A, Mishellany-Dutour A, Murakami H, Beaufrère A-M, Walrand S, Giraudet C, et al. Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *J Physiol* 2012;590:5199–210. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.238576>.
- [212] Ferrannini Ele, Natali Andrea, Capaldo Brunella, Lehtovirta Mikko, Jacob Stefan, Yki-Järvinen for the European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) Hannele. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia, and Blood Pressure. *Hypertension* 1997;30:1144–9. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.30.5.1144>.
- [213] Chevalier S, Burgos SA, Morais JA, Gougeon R, Bassil M, Lamarche M, et al. Protein and glucose metabolic responses to hyperinsulinemia, hyperglycemia, and hyperaminoacidemia in obese men. *Obesity (Silver Spring)* 2015;23:351–8. <https://doi.org/10.1002/oby.20943>.
- [214] She P, Olson KC, Kadota Y, Inukai A, Shimomura Y, Hoppel CL, et al. Leucine and Protein Metabolism in Obese Zucker Rats. *PLoS One* 2013;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059443>.
- [215] Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, et al. A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans

- and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab* 2009;9:311–26. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.02.002>.
- [216] Katsanos CS, Mandarino LJ. Protein Metabolism in Human Obesity: A Shift in Focus From Whole-Body to Skeletal Muscle. *Obesity* 2011;19:469–75. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.290>.
- [217] Park SW, Goodpaster BH, Lee JS, Kuller LH, Boudreau R, de Rekeneire N, et al. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1993–7. <https://doi.org/10.2337/dc09-0264>.
- [218] Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology* 2012;30:591–600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>.
- [219] Ménard O, Dupont D. Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innovations Agronomiques* 2014;36:27–41.
- [220] Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 2011;125:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.036>.
- [221] Egger L, Schlegel P, Baumann C, Stoffers H, Guggisberg D, Brügger C, et al. Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. *Food Research International* 2017;102:567–74. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.047>.
- [222] Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 2014;5:1113–24. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
- [223] Egger L, Ménard O, Delgado-Andrade C, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International* 2016;88:217–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>.
- [224] Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 2019;14:991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
- [225] Zielińska E, Baraniak B, Karaś M. Identification of antioxidant and anti-inflammatory peptides obtained by simulated gastrointestinal digestion of three edible insects species (*Gryllobates sigillatus*, *Tenebrio molitor*, *Schistocerca gregaria*). *International Journal of Food Science & Technology* 2018;53:2542–51. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13848>.
- [226] Aiello G, Ferruzza S, Ranaldi G, Sambuy Y, Arnoldi A, Vistoli G, et al. Behavior of three hypocholesterolemic peptides from soy protein in an intestinal model based on differentiated Caco-2 cell. *Journal of Functional Foods* 2018;45:363–70. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.023>.
- [227] Domenger D, Cudennec B, Kouach M, Touche V, Landry C, Lesage J, et al. Food-Derived Hemorphins Cross Intestinal and Blood–Brain Barriers In Vitro. *Front Endocrinol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00159>.
- [228] Li S, Wang J, Wei H, Yang Y, Bu D, Zhang L, et al. Identification of Bovine Casein Phosphorylation Using Titanium Dioxide Enrichment in Combination with Nano Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Integrative Agriculture* 2012;11:439–45. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60029-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60029-X).

- [229] Zhang Q, Tong X, Qi B, Wang Z, Li Y, Sui X, et al. Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport. *Journal of Functional Foods* 2018;42:298–305. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.01.017>.
- [230] Mackie A, Mulet-Cabero A-I, Torcello-Gómez A. Simulating human digestion: developing our knowledge to create healthier and more sustainable foods. *Food & Function* 2020;11:9397–431. <https://doi.org/10.1039/D0FO01981J>.
- [231] Salles N. Basic Mechanisms of the Aging Gastrointestinal Tract. *Dig Dis* 2007;25:112–7. <https://doi.org/10.1159/000099474>.
- [232] Tharakan A, Norton IT, Fryer PJ, Bakalis S. Mass transfer and nutrient absorption in a simulated model of small intestine. *J Food Sci* 2010;75:E339-346. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01659.x>.
- [233] Wright ND, Kong F, Williams BS, Fortner L. A human duodenum model (HDM) to study transport and digestion of intestinal contents. *Journal of Food Engineering* 2016;171:129–36. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.013>.
- [234] Bourlieu C, Ménard O, De La Chevasnerie A, Sams L, Rousseau F, Madec M-N, et al. The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chem* 2015;182:224–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.001>.
- [235] van den Braak CCM, Klebach M, Abrahamse E, Minor M, Hofman Z, Knol J, et al. A novel protein mixture containing vegetable proteins renders enteral nutrition products non-coagulating after in vitro gastric digestion. *Clin Nutr* 2013;32:765–71. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.11.016>.
- [236] Liu W, Fu D, Zhang X, Chai J, Tian S, Han J. Development and validation of a new artificial gastric digestive system. *Food Research International* 2019;122:183–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.015>.
- [237] van Aken G, Bomhof E, Zoet F, Verbeek M, Oosterveld A. Differences in in vitro gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocolloids* 2011;25:781–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.016>.
- [238] Levi CS, Lesmes U. Bi-compartmental elderly or adult dynamic digestion models applied to interrogate protein digestibility. *Food Funct* 2014;5:2402–9. <https://doi.org/10.1039/c4fo00478g>.
- [239] Shani Levi C, Tal S, Lesmes U. Comparative performance of milk proteins and their emulsions under dynamic in vitro adult and infant gastric digestion. *Food Hydrocolloids* 2013;32:349–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.01.017>.
- [240] Mulet-Cabero A-I, Egger L, Portmann R, Ménard O, Marze S, Minekus M, et al. A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct* 2020;11:1702–20. <https://doi.org/10.1039/C9FO01293A>.
- [241] 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;129:890–5. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.890>.
- [242] 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;129:1992–7. <https://doi.org/10.1093/jn/129.11.1992>.

- [243] 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;145:2221–8. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216838>.
- [244] 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;70:1046–58. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.6.1046>.
- [245] 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;135:404–9. <https://doi.org/10.1093/jn/135.3.404>.
- [246] Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2011;4:53–61.
- [247] Gibson JA, Sladen GE, Dawson AM. Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *Br J Nutr* 1976;35:61–5. <https://doi.org/10.1079/bjn19760009>.
- [248] Vince A, O’Grady F, Dawson AM. The development of ileostomy flora. *J Infect Dis* 1973;128:638–41. <https://doi.org/10.1093/infdis/128.5.638>.
- [249] Devi S, Varkey A, Sheshshayee MS, Preston T, Kurpad AV. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. *Am J Clin Nutr* 2018;107:984–91. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy062>.
- [250] 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;108:980–7. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy178>.
- [251] 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;110:873–82. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz159>.
- [252] DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol* 2001;39:209–28. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00136-8](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00136-8).
- [253] Kararli TT. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 1995;16:351–80. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510160502>.
- [254] Moughan PJ, Smith WC, Kies AK, James KAC. Comparison of the ileal digestibility of amino acids in ground barley for the growing rat and pig. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 1987;30:59–66. <https://doi.org/10.1080/00288233.1987.10430478>.
- [255] 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. *British Journal of Nutrition* 1992;68:729–39. <https://doi.org/10.1079/BJN19920129>.
- [256] Mroz Z, Bakker GC, 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;74:403–12. <https://doi.org/10.2527/1996.742403x>.
- [257] 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. *Molecular Nutrition & Food Research* 2018;62:1700570. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700570>.
- [258] 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. *The Journal of Nutrition* 2020;150:450–7. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz279>.
- [259] Guilloateau P, Zabielski R, Hammon HM, Metges CC. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutrition Research Reviews* 2010;23:4–22. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000077>.
- [260] Berrocoso JD, Rojas OJ, Liu Y, Shoulders J, González-Vega JC, Stein HH. Energy concentration and amino acid digestibility in high-protein canola meal, conventional canola meal, and soybean meal fed to growing pigs. *J Anim Sci* 2015;93:2208–17. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8528>.
- [261] Libao-Mercado AJ, Yin Y, van Eys J, de Lange CFM. True ileal amino acid digestibility and endogenous ileal amino acid losses in growing pigs fed wheat shorts- or casein-based diets. *J Anim Sci* 2006;84:1351–61. <https://doi.org/10.2527/2006.8461351x>.
- [262] Deglaire, Moughan. Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. *British Journal of Nutrition* 2012;108:S273–81. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002346>.
- [263] 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. *British Journal of Nutrition* 1994;71:29–42. <https://doi.org/10.1079/BJN19940108>.
- [264] Cotten B, Ragland D, Thomson JE, Adeola O. Amino acid digestibility of plant protein feed ingredients for growing pigs. *J Anim Sci* 2016;94:1073–82. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9662>.
- [265] Moughan PJ, Souffrant WB, Hodgkinson SM. Physiological approaches to determining gut endogenous amino acid flows in the mammal. *Arch Tierernahr* 1998;51:237–52. <https://doi.org/10.1080/17450399809381922>.
- [266] Rutherford SM, Fanning AC, Miller BJ, Moughan PJ. Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition* 2015;145:372–9. <https://doi.org/10.3945/jn.114.195438>.
- [267] Moughan PJ, Rutherford SM. Gut luminal endogenous protein: Implications for the determination of ileal amino acid digestibility in humans. *British Journal of Nutrition* 2012;108:S258–63. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002474>.
- [268] Egger L, Ménard O, Baumann C, Duerr D, Schlegel P, Stoll P, et al. Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data. *Food Research International* 2019;118:32–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.049>.
- [269] Rozan P, Lamghari R, Linder M, Villaume C, Fanni J, Parmentier M, et al. In Vivo and in Vitro Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes †. *J Agric Food Chem* 1997;45:1762–9. <https://doi.org/10.1021/jf960723v>.
- [270] Cho JH, Kim IH. Evaluation of the Apparent Ileal Digestibility (AID) of Protein and Amino Acids in Nursery Diets by In vitro and In vivo Methods. *Asian Australas J Anim Sci* 2011;24:1007–10. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10435>.

- [271] Deglaire A, Bos C, Tomé D, Moughan PJ. Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human. *Br J Nutr* 2009;102:1752–9. <https://doi.org/10.1017/S0007114509991267>.
- [272] Minekus M. The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 37–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_5.
- [273] Fekete S, Beck A, Veuthey J-L, Guillardme D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014;101:161–73. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.04.011>.
- [274] Qannari EM, Wakeling I, Courcoux P, MacFie HJH. Defining the underlying sensory dimensions. *Food Quality and Preference* 2000;11:151–4. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(99\)00069-5](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(99)00069-5).
- [275] Qannari EM, Courcoux P, Vigneau E. Common components and specific weights analysis performed on preference data. *Food Quality and Preference* 2001;12:365–8. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(01\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(01)00026-X).
- [276] Vdoviaková K, Petrovová E, Maloveská M, Krešáková L, Teleky J, Elias MZJ, et al. Surgical Anatomy of the Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. *Gastroenterology Research and Practice* 2015. <https://doi.org/10.1155/2016/2632368>.
- [277] Libao-Mercado AJ, Columbus D, Lange CFM de. Influence of a flooding dose of valine on key indicators of metabolic status in the growing pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2015;99:100–6. <https://doi.org/10.1111/jpn.12202>.
- [278] 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. <http://WwwThesesFr2020>. <http://www.theses.fr/s165451> (accessed March 5, 2021).
- [279] Emwas A-H, Al-Talla Z, Yang Y, Kharbatia N. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)* 2015;1277:91–112. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_8.
- [280] Atallah N, Deracinois B, Boulier A, Baniel A, Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Ravallec R, et al. In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol. *Foods* 2020;9:1580. <https://doi.org/10.3390/foods9111580>.
- [281] Qiao Y, Gumpertz M, Kempen TV. Stability of a Pancreatic Enzyme Cocktail During in Vitro Protein Digestibility Assays. *Journal of Food Biochemistry* 2005;29:205–20. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00003.x>.
- [282] 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. *Animal Feed Science and Technology* 2001;89:49–58. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00237-6).
- [283] 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 pigs. *J Anim Sci* 2012;90:4414–20. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4801>.
- [284] 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 bran. *J Anim Sci* 2018;96:2817–25. <https://doi.org/10.1093/jas/sky153>.

- [285] Uysal M, Gül SS, Karaman S, Tas U, Sapmaz HI, Uysal F, et al. Caecum location in laboratory rats and mice: an anatomical and radiological study. *Lab Anim* 2017;51:245–55. <https://doi.org/10.1177/0023677216658916>.
- [286] Rutherford SM, Moughan PJ. The digestible amino acid composition of several milk proteins: application of a new bioassay. *J Dairy Sci* 1998;81:909–17. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75650-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75650-4).
- [287] Nogueira Silva N, Saint-Jalmes A, DE CARVALHO AF, Gaucheron F. Development of Casein Microgels from Cross-Linking of Casein Micelles by Genipin. *Langmuir* 2014;30:10167–10175. <https://doi.org/10.1021/la502274b>.
- [288] Nogueira Silva NF, Bahri A, Guyomarc’h F, Beaucher E, Gaucheron F. AFM study of casein micelles cross-linked by genipin: effects of acid pH and citrate. *Dairy Science & Technology* 2015;95:75–86. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0199-9>.
- [289] Tsioulpas A, Lewis MJ, Grandison AS. Effect of minerals on casein micelle stability of cows’ milk. *J Dairy Res* 2007;74:167–73. <https://doi.org/10.1017/S0022029906002330>.
- [290] Zhao LL, Wang XL, Tian Q, Mao XY. Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science* 2016;99:7768–75. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10794>.
- [291] Picariello G, Miralles B, Mamone G, Sánchez-Rivera L, Recio I, Addeo F, et al. Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Mol Nutr Food Res* 2015;59:948–56. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400856>.
- [292] De Cicco M, Mamone G, Di Stasio L, Ferranti P, Addeo F, Picariello G. Hidden “Digestome”: Current Analytical Approaches Provide Incomplete Peptide Inventories of Food Digests. *J Agric Food Chem* 2019;67:7775–82. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02342>.
- [293] Tang JE, Moore DR, Kujbida GW, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *J Appl Physiol* (1985) 2009;107:987–92. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00076.2009>.
- [294] Egger L, Ménard O, Baumann C, Duerr D, Schlegel P, Stoll P, et al. Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data. *Food Research International* 2019;118:32–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.049>.
- [295] Sanchón J, Fernández-Tomé S, Miralles B, Hernández-Ledesma B, Tomé D, Gaudichon C, et al. Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food Chemistry* 2018;239:486–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.134>.
- [296] Morens C, Gaudichon C, Metges CC, Fromentin G, Baglieri A, Even PC, et al. A High-Protein Meal Exceeds Anabolic and Catabolic Capacities in Rats Adapted to a Normal Protein Diet. *The Journal of Nutrition* 2000;130:2312–21. <https://doi.org/10.1093/jn/130.9.2312>.
- [297] Berrazaga I, Salles J, Laleg K, Guillet C, Patrac V, Giraudet C, et al. Anabolic Properties of Mixed Wheat-Legume Pasta Products in Old Rats: Impact on Whole-Body Protein Retention and Skeletal Muscle Protein Synthesis. *Nutrients* 2020;12:1596. <https://doi.org/10.3390/nu12061596>.
- [298] Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D’Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003;133:1081–7. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1081>.

- [299] Boozer CN, Schoenbach G, Atkinson RL. Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1995. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.268.4.E546>.
- [300] Chevalier L, Bos C, Azzout-Marniche D, Fromentin G, Mosoni L, Hafnaoui N, et al. Energy restriction only slightly influences protein metabolism in obese rats, whatever the level of protein and its source in the diet. *Int J Obes* 2013;37:263–71. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.19>.
- [301] Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:819–29. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70034-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70034-8).
- [302] Markofski MM, Dickinson JM, Drummond MJ, Fry CS, Fujita S, Gundermann DM, et al. Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women. *Exp Gerontol* 2015;65:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.02.015>.
- [303] Wall BT, Gorissen SH, Pennings B, Koopman R, Groen BBL, Verdijk LB, et al. Aging Is Accompanied by a Blunted Muscle Protein Synthetic Response to Protein Ingestion. *PLoS One* 2015;10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140903>.
- [304] Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, Mittendorfer B, Roy M, Rowe VL, et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J* 2006;20:768–9. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4607fje>.
- [305] Beals JW, Burd NA, Moore DR, van Vliet S. Obesity Alters the Muscle Protein Synthetic Response to Nutrition and Exercise. *Front Nutr* 2019;6. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00087>.
- [306] Guillet C, Masgrau A, Walrand S, Boirie Y. Impaired protein metabolism: interlinks between obesity, insulin resistance and inflammation. *Obesity Reviews* 2012;13:51–7. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01037.x>.
- [307] Pes GM, Licheri G, Soro S, Longo NP, Salis R, Tomassini G, et al. Overweight: A Protective Factor against Comorbidity in the Elderly. *IJERPH* 2019;16:3656. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193656>.
- [308] Wolfe RR. Effects of insulin on muscle tissue. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2000;3:67–71.

Titre : Caractérisation nutritionnelle, en modèles *in vitro* et *in vivo* de protéines lactières d'assemblages moléculaires différents

Mots clés : Digestibilité, *in vitro*, *in vivo*, protéines lactières, matrices alimentaires

Résumé :

L'industrie laitière a énormément progressé dans l'extraction d'ingrédients laitiers à haute valeur ajoutée. Or, il existe peu de données reliant l'impact des procédés sur la structure des protéines et la façon dont elles sont digérées puis assimilées. Cette thèse avait donc pour but de mieux connaître les relations entre les structures induites par les procédés pour obtenir différentes matrices protéiques lactières et leur comportement au cours de la digestion. Les objectifs de nos travaux étaient: 1) évaluer l'impact des procédés sur les matrices protéiques au cours de la digestion *in vitro* statique pour sélectionner celles présentant les profils peptidiques les plus hétérogènes; 2) identifier un modèle de rat discriminant en termes d'efficacité digestive en étudiant les effets de l'âge et de l'adiposité sur la digestion; 3) étudier la digestion et l'utilisation postprandiale des matrices sélectionnées sur la base de l'étude de digestion *in vitro*, sur le modèle de rat le plus discriminant.

Différents profils peptidiques ont été obtenus pour la caséine déminéralisée par rapport à la caséine micellaire native en *in vitro*. En *in vivo*, un niveau d'adiposité plus élevé entraînait une augmentation des valeurs de digestibilité des protéines (94 % pour les jeunes rats avec une adiposité normale et 96 % pour les rats plus âgés avec une adiposité élevée) et semblait compenser les modifications métaboliques postprandiales des protéines associées à un âge plus avancé. Les matrices ont ensuite été étudiées chez le jeune rat avec une adiposité normale. Cette étude a révélé que la structure de la matrice protéique avait un impact sur la digestibilité des protéines avec notamment une baisse de digestibilité pour la matrice composée d'un assemblage de caséines et de protéines solubles. Enfin, l'ensemble de ces travaux montre la complémentarité des méthodes *in vitro* et *in vivo* dans la caractérisation nutritionnelle de matrices.

Title: *In vitro* and *in vivo* nutritional characterization of milk proteins with different molecular arrangements

Keywords: Digestibility, *in vitro*, *in vivo*, milk proteins, food matrices

Abstract: The dairy industry has made great progress in the extraction of high value dairy ingredients. However, there is little scientific data on the impact of industrial processes on the structure of proteins and their digestibility and postprandial metabolism. The aim was thus to better understand the relationship between the structure induced by the processes applied to obtain different milk protein matrices and their behavior during digestion. The objectives were: 1) to evaluate the impact of processes on milk matrices during static *in vitro* digestion to select those with the most heterogeneous peptide profiles; 2) to identify a discriminating rat model in terms of digestive efficiency by studying the effects of age and adiposity on digestion; 3) to study the digestion and postprandial utilization of the selected matrices, in respect to *in vitro* digestion results, on the most

discriminating rat model. Different peptide profiles were obtained for demineralized casein versus native micellar casein *in vitro*. *In vivo*, a higher level of adiposity resulted in an increase in protein digestibility values (94% for young rats with normal adiposity and 96% for older rats with high adiposity) and appeared to compensate for the postprandial protein metabolic changes associated with older age. Matrices were then studied *in vivo* on young rats with normal adiposity. This study revealed that the structure of the protein matrix had an impact on protein digestibility, with a decrease in digestibility for the matrix that contained an assembly of caseins and whey proteins. Finally, this work shows the complementarity of *in vitro* and *in vivo* methods in the nutritional characterization of matrices.