



**HAL**  
open science

# Une nouvelle approche d'isotopomique pour identifier les dysrégulations du métabolisme des protéines et des acides aminés lors du développement du syndrome métabolique

Olivier Landry Mantha

► **To cite this version:**

Olivier Landry Mantha. Une nouvelle approche d'isotopomique pour identifier les dysrégulations du métabolisme des protéines et des acides aminés lors du développement du syndrome métabolique. Alimentation et Nutrition. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA009 . tel-02182659

**HAL Id: tel-02182659**

**<https://theses.hal.science/tel-02182659v1>**

Submitted on 10 Feb 2020

**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.

# Une nouvelle approche d'isotopomique pour identifier les dysrégulations du métabolisme des protéines et des acides aminés lors du développement du syndrome métabolique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à AgroParisTech

École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement,  
santé (ABIES),  
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 11 juillet 2018, par

**Olivier Landry Mantha**

Composition du Jury :

Philippe Schmidely Professeur, AgroParisTech (UMR791)	Président
Régis Hankard Professeur-praticien hospitalier, Université de Tours (UMR1069)	Rapporteur
Stéphane Walrand Directeur de recherche, INRA (UMR1019)	Rapporteur
Gonzalo Cantalapiedra-Hijar Chargé de recherche, INRA (UMR1213)	Examineur
Nathalie Poupin Chargée de recherche, INRA (UMR1331)	Examinatrice
Jean-François Huneau Professeur, AgroParisTech (UMR914)	Directeur de thèse
Hélène Fouillet Chargée de recherche, INRA (UMR914)	Co-Encadrante



**Titre :** Une nouvelle approche d'isotopomique pour identifier les dysrégulations du métabolisme des protéines et des acides aminés lors du développement du syndrome métabolique

**Mots clés :** Abondances isotopiques naturelles de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) – métabolisme des protéines et des acides aminés – syndrome métabolique – synthèse protéique –  $\text{D}_2\text{O}$

**Résumé :** Si les différentes composantes du syndrome métabolique (SM) sont susceptibles d'affecter le métabolisme protéique et des acides aminés (AA), les données disponibles sont peu nombreuses et souvent contradictoires, du fait de l'hétérogénéité de présentation de ce syndrome et des limites des approches classiques d'investigation du métabolisme azoté. Ce travail de thèse met à profit une nouvelle approche isotopomique, s'appuyant sur la mesure de l'abondance naturelle des isotopes stables de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) dans les protéines et AA tissulaires pour identifier les altérations du métabolisme protéique survenant lors de l'induction nutritionnelle d'un SM chez le rat. Nos résultats permettent dans un premier temps de valider expérimentalement les prédictions d'un modèle multi-compartimental développé dans le laboratoire et montrant que les  $\delta^{15}\text{N}$  reflètent l'orientation différentielle des AA entre les voies anaboliques (protéosynthèse) et cataboliques (oxydation). Nous avons également montré que sous certaines conditions, les  $\delta^{13}\text{C}$  permettent d'estimer la part des carbones des AA et protéines tissulaires provenant respectivement des protéines, glucides et lipides

alimentaires, renseignant ainsi sur la flexibilité métabolique des individus. Les mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  dans les protéines et AA, seules ou combinées à la mesure des taux de synthèse protéique après administration d'eau deutérée, nous ont ensuite permis de mettre en évidence les modifications du métabolisme protéique et des AA survenant lors de l'exposition périnatale et post-sevrage à un régime gras et sucré, ainsi que celles associées à des différences de sensibilité individuelles à l'induction d'un syndrome métabolique par ce même type de régime. Ces altérations sont tissu-spécifiques et diffèrent selon qu'elles proviennent uniquement de différences de sensibilité individuelle au régime ou qu'elles sont également attribuables à des différences d'équilibre glucido-lipidique dans l'alimentation. L'ensemble de nos résultats montrent que l'apparition d'un SM est associée à des réorientations du métabolisme des AA entre les voies anaboliques et d'oxydation, affectant de façon différente le foie, le muscle, l'intestin et le tissu adipeux, et à une altération de la flexibilité métabolique dans le muscle. Ces travaux ouvrent la voie à des études chez l'Homme, s'appuyant sur les mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  dans des pools accessibles.

**Title :** A new isotopomic approach for identifying the dysregulations of protein and amino acid metabolism during the development of the metabolic syndrome

**Keywords :** Natural isotopic abundances of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) – Protein and amino acid metabolism – Metabolic syndrome – protein synthesis –  $\text{D}_2\text{O}$

**Abstract :** Although the different components of the metabolic syndrome (MS) are likely to affect protein and amino acid (AA) metabolism, the available data are few and often contradictory, due to the heterogeneity of presentation of this syndrome and the limitations of classical approaches to investigate nitrogen metabolism. The present thesis work uses a novel isotopomic approach, based on the measurement of the natural abundance of stable isotopes of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in tissue proteins and AA to identify alterations in protein metabolism occurring during the nutritional induction of MS in rats. Our results allow to validate experimentally the predictions of a multi-compartmental model developed in the laboratory and showing that the  $\delta^{15}\text{N}$  reflects the differential orientation of AA between anabolic (proteosynthesis) and catabolic (oxidation) pathways. We have also shown that under certain conditions, the  $\delta^{13}\text{C}$  can allow to estimate the proportion of carbons in AA and tissue proteins issuing from dietary proteins, carbohydrates and lipids respectively, thus providing information

on the metabolic flexibility of individuals. The measurements of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in proteins and AA, alone or combined with the measurement of protein synthesis rates after administration of deuterated water, then allowed us to highlight the changes in protein and AA metabolism occurring during perinatal and post-weaning exposure to a high-fat high-sugar diet, as well as those associated with individual differences in sensitivity to the induction of a MS by the same kind of diet. These alterations are tissue-specific and differ according to whether they result solely from differences in individual sensitivity to diet or whether they are also attributable to differences in the carbohydrate/lipid balance of the diet. Altogether, our results show that the development of MS is associated with changes in AA metabolic partitioning between the anabolic and oxidative pathways, differently affecting the liver, muscle, intestine and adipose tissue, and with an altered metabolic flexibility in muscle. This work opens the way to human studies, based on the measurements of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in accessible pools.





## REMERCIEMENTS

La présente thèse est le fruit d'un long processus de recherches et de rédaction et n'a pu être réalisée que grâce à un travail d'équipe. Plusieurs personnes font partie de ce parcours et je tiens à souligner leur importante contribution.

Mes premiers remerciements vont à Philippe Schmidely, Régis Hankard, Stéphane Walrand, Gonzalo Cantalapiedra-Hijar et Nathalie Poupin, qui ont généreusement accepté d'être président, rapporteurs ou examinateurs de cette thèse. Merci pour votre précieuse collaboration.

Je souligne en particulier l'apport crucial de Jean-François Huneau, directeur de cette thèse, et d'Hélène Fouillet, co-directrice. Pour la qualité de leur encadrement et pour m'avoir guidé dans la réalisation de cette thèse et dans l'univers fascinant de la recherche, je les remercie. Ils m'ont grandement inspiré et m'ont permis de me dépasser.

Ma reconnaissance et mes remerciements vont également à tous les membres du laboratoire dirigé par Daniel Tomé pour leur accueil chaleureux. Je me sens privilégié d'avoir évolué à leur côté et d'avoir fait partie de leur univers. Au fil des ans, j'ai eu la chance de partager mon bureau avec de nombreux collègues qui ont su égayer mes journées, certaines soirées et pour certains, des sessions d'escalade hebdomadaires. J'en garderai de très bons souvenirs. Je remercie Olga Davidenko, Odile Parizel, Clélia Bianchi, Martin Beaumont, Tristan Chalvon Demersay, Ambre Devaux, Marion Oberli, Simon Benoit, Caroline Desclée de Maredsous, Gabrielle Carlin, Erwan de Gavelle, Chloé Brouzes, Sandra Vidal, Romain Tessier, Florence Guillin et Joanna Morro.

J'aimerais aussi remercier Dominique Hermier, de m'avoir initié à l'expérimentation animale, mais également François Mariotti et Véronique Mathé pour leur contribution à ce projet. Je suis très fier de ce que nous avons accompli au cours de ces dernières années et particulièrement en ce qui a trait à l'utilisation du deutérium pour le traçage des flux métaboliques.

Parmi les personnes qui m'ont accordé leur confiance, je tiens à remercier chaleureusement Catherine Chaumontet, pour nos nombreuses conversations, ses mots d'encouragements, son amitié et ses commentaires fort pertinents lors de la relecture de cette thèse. Je remercie également Christiane Larue-Achagiotis d'avoir égayé le laboratoire de sa présence, d'avoir accepté de partager sa vaste expérience professionnelle, de m'avoir tricoté une écharpe qui me tient bien au chaud et pour la relecture de cette thèse. Catherine et Christiane, merci pour tout.

Mes remerciements s'adressent également à l'école doctorale ABIÉS, et au Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies. Leur appui financier m'a permis de me consacrer pleinement à mes activités de recherche.

Enfin, je tiens à rendre hommage et à remercier mes parents, Raymond Mantha et Lynne Landry, pour leur appui indéfectible et leurs encouragements constants.

# TABLE DES MATIERES

## 1 INTRODUCTION.....11

Partie 1 : Le métabolisme des protéines et des acides aminés : ses modulations et ses dérégulations lors du syndrome métabolique ..... 15

1.1 Les différents flux d'acides aminés dans l'organisme ..... 15

1.1.1 Absorption..... 17

1.1.2 Échanges interorganes et interconversions d'acides aminés..... 18

1.1.3 Utilisation anabolique des acides aminés et renouvellement protéique..... 25

1.1.4 Oxydation des acides aminés et excrétion azotée ..... 29

1.1.5 Régulation nutritionnelle..... 32

1.1.6 Méthodes d'investigation..... 38

1.2 Métabolisme des protéines et des acides aminés lors du syndrome métabolique ..... 43

1.2.1 Le syndrome métabolique ..... 43

1.2.2 Concentrations circulantes d'acides aminés lors du syndrome métabolique ..... 48

1.2.3 Renouvellement protéique lors du syndrome métabolique..... 54

1.2.4 Changement des concentrations d'acides aminés en circulation lors de la restriction énergétique chez la personne en surpoids ou obèse..... 59

Partie 2 : Les variations des abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote : de nouveaux biomarqueurs des régulations nutritionnelles et dérégulations physiopathologiques du métabolisme protéino-énergétique ..... 63

2.1 Nomenclature, méthodes de mesure et fractionnement isotopique ..... 65

2.1.1 Définition et prévalence ..... 65

2.1.2 Nomenclature et méthodes de mesure ..... 65

2.1.3 Effets et fractionnement isotopiques associés au métabolisme protéino-énergétique..... 67

2.2 Variabilité des abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote dans les organismes et les aliments..... 75

2.2.1 Existence d'une discrimination isotopique entre les individus et leur régime ..... 75

2.2.2 Rapport  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  dans les organismes et les aliments : Fixation de l'azote et réseau trophique ..... 79

2.2.3 Rapport  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  dans les organismes et les aliments : Fixation du carbone et alimentation..... 83

2.3 Variabilité des abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote entre les tissus et au sein des tissus..... 87

2.3.1 Variations intertissulaires des rapports  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ..... 87

2.3.2 Variations intratissulaires des rapports $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dans les acides aminés .....	93
2.4 Variations d'abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques .....	102
2.4.1 La qualité de l'apport protéique influe sur le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .....	103
2.4.2 L'apport protéino-énergétique influe sur le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .....	105
2.4.3 Variations du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ lors de conditions nutritionnelles et physiopathologiques.....	108
2.5 Interprétation des variations tissulaires d'abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote .....	113
2.5.1 Chaque tissu possède une fenêtre d'intégration temporelle qui lui est propre .....	113
2.5.2 Le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ des protéines tissulaires signe l'orientation préférentielle des acides aminés vers l'anabolisme et le catabolisme .....	118
2.5.3 Le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des protéines tissulaires signe l'utilisation des macronutriments alimentaires pour la synthèse d'acides aminés .....	124
Justification et objectifs.....	128
Justification des travaux.....	128
Objectifs.....	129
<b>2 ARTICLES SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>133</b>
Étude 1 : Early changes in tissue amino acid metabolism and nutrient routing in rats fed a high-fat diet: evidence from natural isotope abundances as biomarkers.....	135
Étude 2 : $\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$ of proteins and amino acids are isotopic biomarkers of the metabolic orientations induced by energy restriction in obese rat .....	153
Étude 3 : Le métabolisme protéique splanchnique et périphérique est différemment affecté chez un modèle rat de syndrome métabolique induit par l'alimentation.....	192
<b>3 DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>249</b>
3.1 Approches et articulation des travaux.....	251
3.2 Interprétation des $\Delta^{15}\text{N}$ des protéines tissulaires en termes d'adressage métabolique des AA tissulaires entre leurs voies anaboliques et cataboliques d'utilisation.....	252
3.3 Interprétation des $\delta^{13}\text{C}$ des protéines tissulaires en termes d'adressage métabolique des nutriments vers les protéines tissulaires .....	257
3.4 Identification des altérations tissulaires du métabolisme des protéines et des AA lors de l'exposition à un régime gras et sucré .....	261
3.5 Identification des différences tissulaires de métabolisme des protéines et des AA entre rats résistants ou sensibles au développement nutritionnel du syndrome métabolique.....	263
3.6 Forces et limites de l'approche utilisée.....	265
3.7 Perspectives .....	267

<b>4 CONCLUSION.....</b>	<b>269</b>
<b>5 REFERENCES.....</b>	<b>273</b>
<b>ANNEXE I MESURE DES <math>\Delta^{15}\text{N}</math> ET <math>\Delta^{13}\text{C}</math> PAR SPECTROMETRIE DE MASSE A RATIO ISOTOPIQUE.....</b>	<b>295</b>
<b>ANNEXE II MODELE GENERAL D'INTERPRETATION DES EFFETS ISOTOPIQUES .....</b>	<b>297</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Estimation chez le porc des flux d'absorption, de sécrétion endogène et d'élimination de l'azote.

Figure 2. Schématisation d'échanges interorganes d'acides aminés.

Figure 3. Distribution tissulaire chez l'homme des capacités de transaminase des acides aminés ramifiés et du complexe 3-méthyl-2-oxobutanoate déshydrogénase.

Figure 4. Voies de biosynthèse du squelette carboné des acides aminés composant les protéines.

Figure 5. Flux réversibles et irréversibles possibles d'azote entre les acides aminés.

Figure 6. Molécules intermédiaires auxquelles peut converger le carbone des acides aminés durant leur dégradation.

Figure 7. Méta-analyse des effets de l'insuline sur la synthèse protéique musculaire.

Figure 8. Méta-analyse des effets de l'insuline sur la dégradation protéique musculaire

Figure 9. Effet de l'insuline et des acides aminés sur la synthèse et la dégradation protéique musculaire et splanchnique chez l'homme.

Figure 10. Effet de l'obésité et de l'insulinorésistance sur la concentration plasmatique d'acides aminés ramifiés plasmatiques.

Figure 11. Phénotypes du métabolisme des acides aminés ramifiés lors de l'obésité et de l'insulinorésistance proposés par Lynch et Adams suivant une synthèse de la littérature.

Figure 12. Schéma représentant les protons, les neutrons et les électrons des 2 isotopes stables du carbone et abondance naturelle des isotopes stables de quelques éléments.

Figure 13. Schéma de la spectrométrie de masse à ratio isotopique couplée à un analyseur élémentaire ou de la chromatographie gazeuse.

Figure 14. Réseau métabolique théorique et composition isotopique à l'état stationnaire d'un précurseur et de ses flux d'utilisation au niveau d'un embranchement métabolique.

Figure 15. Distribution des  $\Delta^{15}\text{N}$  et de  $\Delta^{13}\text{C}$  de différentes espèces.

Figure 16.  $\Delta^{15}\text{N}$  et de  $\Delta^{13}\text{C}$  moyens de différentes classes taxinomiques.

Figure 17. Évolution du  $\delta^{15}\text{N}$  dans une chaîne alimentaire marine.

Figure 18. Distribution du  $\delta^{13}\text{C}$  chez les plantes en  $\text{C}_3$  et en  $\text{C}_4$ .

Figure 19. Relation entre la consommation de sucre réelle et prédite en se basant sur le  $\delta^{15}\text{N}$  et le  $\delta^{13}\text{C}$  des globules rouges et relation entre le  $\delta^{13}\text{C}$  de l'alanine dans les globules rouges et la consommation de boissons sucrées chez des adultes Yupiks vivant dans le sud-ouest de l'Alaska.

Figure 20. Enrichissement en  $^{15}\text{N}$  dans les chaînes alimentaires dans un acide aminé non-transaminant, la phénylalanine, et d'un acide aminé transaminant, l'acide glutamique.

Figure 21.  $\Delta^{15}\text{N}$  de différents acides aminés lors d'études contrôlées chez plusieurs espèces de consommateurs tertiaires classées.

Figure 22.  $\Delta^{15}\text{N}$  d'acides aminés dans les protéines plasmatiques de rats soumis à différents niveaux d'apport protéique.

Figure 23.  $\Delta^{13}\text{C}$  d'acides aminés musculaires chez des poissons soumis à des régimes de compositions diverses.

Figure 24. Variations du poids et du  $\delta^{15}\text{N}$  de l'urine chez un mâle Bonobo en restriction protéino-énergétique et progressivement renourri.

Figure 25. Effet d'un jeûne de 4 semaines sur le  $^{15}\text{N}$  du foie et du muscle chez des oies.

Figure 26. Évolution des  $\Delta^{15}\text{N}$  de différents tissus suivant un changement métabolique lié au flux d'azote splanchnique.

Figure 27. Modèle multitissu et multicompartiment d'interprétation des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  en fonction de modulations des flux azoté.

Figure 28. Évolution des  $\Delta^{15}\text{N}$  dans les protéines hépatiques et l'urine en fonction de  $p_{\text{ox}}$ .

Figure 29. Équations originales permettant de déterminer les contributions des macronutriments alimentaires au carbone protéique des tissus.

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Vitesse fractionnaire de synthèse protéique mesurée dans différents tissus chez le rat.

Tableau 2. Critères du syndrome métabolique selon différentes définitions.

Tableau 3. Avantages et inconvénients de différents types de modèles permettant l'étude du syndrome métabolique.

Tableau 4. Effets du diabète de type II et de l'obésité sur les cinétiques protéiques.

Tableau 5. Changement normalisé des concentrations d'acides aminés en circulation lors de 2 essais cliniques de perte de poids induite par l'alimentation.

Tableau 6. Effets isotopiques mesurés lors de réactions spécifiques isolées ou mesurés globalement lors de l'assimilation de composés inorganiques.

Tableau 7.  $\delta^{15}\text{N}$  de différentes sources alimentaires humaines.

Tableau 8.  $\delta^{13}\text{C}$  de différentes sources alimentaires humaines.

Tableau 9.  $\Delta^{13}\text{C}$  et  $\Delta^{15}\text{N}$  de différents tissus mesurés lors d'études chez le rongeur.

Tableau 10. Effets de la restriction alimentaire et du jeûne sur le  $\delta^{13}\text{C}$  de plusieurs espèces.

Tableau 11. Temps de renouvellement isotopique tissulaire provenant de différentes études chez le rongeur.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**$\alpha$**  : effet isotopique

**$\varepsilon$**  : effet isotopique

**$\delta$**  : abondance naturelle relative des isotopes stables du carbone ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) et de l'azote ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) exprimée par rapport à des standards.

**$\Delta$**  : écart de l'abondance naturelle relative des isotopes stables par rapport au régime

**c** : proportion de carbone dans les protéines tissulaires issue des glucides alimentaires

**f** : fraction de produit par rapport à un substrat ou vice-versa

**P** : produit

**p** : proportion de carbone dans les protéines tissulaires issue des protéines alimentaires

**S** : substrat

**TS** : saut trophique

**CoA** : coenzyme A

**BCAT** : transaminase des AA ramifiés

**BCKD** : complexe 3-méthyl-2-oxobutanoate déshydrogénase

**ARNt** : acide ribonucléique de transfert

**mTOR** : cible de la rapamycine chez les mammifères

**mTORC1** : complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères

**GCN2** : *general control nonderepressible 2*

**Rubisco** : ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase

**AA** : acide aminé

**Ala** : alanine

**Arg** : arginine

**Asn** : asparagine

**Asp** : acide aspartique

**Cys** : cystéine

**Gln** : glutamine

**Gly** : glycine

**Glu** : acide glutamique

**His** : histidine

**Ile** : isoleucine

**Leu** : leucine

**Lys** : lysine

**Met** : méthionine

**Pro** : proline

**Ser** : sérine

**Thr** : thréonine

**Tyr** : tyrosine

**Val** : valine



# 1 INTRODUCTION



Ce premier chapitre situe le contexte scientifique et l'objectif de cette thèse. La première partie schématise le métabolisme des protéines et de leurs acides aminés, depuis l'absorption des protéines alimentaires jusqu'à l'excrétion des produits de dégradation, en passant par l'interconversion des acides aminés et leur utilisation pour le renouvellement protéique. Il sera mis en évidence que ce métabolisme semble altéré, mais de façons peu comprises, lors du syndrome métabolique. La deuxième partie vise à démontrer que les abondances naturelles des isotopes stables du carbone et de l'azote apportent des informations complémentaires par rapport aux techniques classiques d'études du métabolisme des protéines et des acides aminés. L'objectif de cette thèse est d'utiliser ces abondances isotopiques naturelles pour mieux comprendre comment le métabolisme des protéines et des acides aminés est altéré lors du développement du syndrome métabolique.



# Partie 1 : Le métabolisme des protéines et des acides aminés : ses modulations et ses dérégulations lors du syndrome métabolique

Les protéines, majoritaire source d'azote alimentaire, ont des rôles physiologiques variés (structure, travail mécanique, transport, catalyse, immunité, médiation, détection...). Elles sont composées de chaînes d'acides aminés (AA) qui servent aussi de médiateurs et sont des précurseurs à la synthèse de produits tels les nucléotides, les lipides et le glucose. Un fonctionnement adéquat du métabolisme azoté est ainsi essentiel au maintien de l'homéostasie. Ce métabolisme est compartimenté entre les AA, leurs substrats et leurs produits et est fortement régionalisé avec des spécificités intertissulaires. L'homéostasie du métabolisme azoté est remise en cause lors de quelques situations pathologiques ou pré-pathologiques, mais de façons assez méconnues. C'est surtout le cas du syndrome métabolique lors duquel les flux d'AA sont perturbés d'une façon peu comprise et non consensuelle.

## 1.1 Les différents flux d'acides aminés dans l'organisme

À l'état d'équilibre protéique, les flux d'absorption et d'excrétion azotés sont égaux. Entre ceux-ci, différents flux d'azote et de carbone soutiennent l'homéostasie chez l'individu sain comme le transfert interorganes d'AA, leur oxydation, leur synthèse et le renouvellement protéique. Tout ceci est finement régulé pour assurer l'intégrité tissulaire et le maintien des fonctions vitales. Le traçage isotopique a eu un apport considérable à nos connaissances sur ces flux et leur régulation nutritionnelle. Il reste toutefois difficile

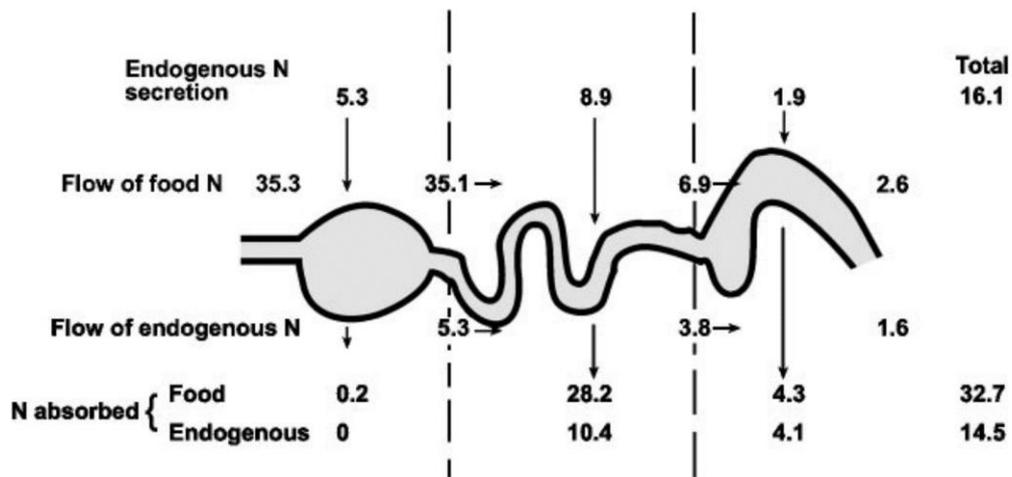


Figure 1. adapté de (1). Estimation chez le porc des flux d'absorption, de sécrétion endogène et d'élimination de l'azote (g/jour).

d'étudier le métabolisme des protéines et des AA d'une façon suffisamment intégrative. Beaucoup de questions demeurent donc sur ses régulations et ses dérégulations notamment lors du syndrome métabolique où des concentrations circulantes élevées de certains AA suggèrent une altération de leur métabolisme (cf section 1.2).

### 1.1.1 Absorption

L'apport azoté se fait majoritairement sous forme de protéines alimentaires. Celles-ci sont tout d'abord partiellement dégradées dans l'estomac sous l'action des pepsines, conduisant à la production de gros polypeptides, d'oligopeptides et minoritairement d'AA libres puisque cette étape a un faible impact en terme d'hydrolyse (2).

La vitesse de vidange gastrique joue un rôle important dans les cinétiques d'absorption de l'azote alimentaire (3) et est sensible à la quantité d'énergie et de protéines ingérées (4, 5) ainsi qu'aux propriétés physicochimiques de ces dernières (6, 7). La précipitation des caséines due au pH gastrique entraîne la formation de particules protéiques solides qui séjournent plus longtemps dans l'estomac que les protéines du lactosérum ou les globulines végétales. Pour ces raisons, on qualifie les caséines de protéines lentes, par opposition aux autres protéines qualifiées de rapides. Les protéines étant très peu absorbées par l'estomac (Figure 1), elles sont vidangées avec leurs produits d'hydrolyse dans l'intestin grêle où elles sont hydrolysées en AA et petits peptides sous l'action des enzymes pancréatiques (trypsine, chymotrypsine, élastase et carboxypeptidases) et des peptidases de la bordure en brosse des entérocytes (2).

L'absorption azotée se fait sous la forme d'AA libres et de di- et tripeptides et implique la participation de transporteurs différenciellement exprimés dans les membranes apicales et basolatérales des entérocytes. Selon une étude faite chez la souris,

l'absorption de peptides contribuerait surtout à l'absorption totale d'AA quand l'apport protéique est important (8).

Dès l'absorption, l'intestin métabolise une grande partie de certains des AA ingérés notamment la Gln, l'Asp et le glutamate (9, 10). Des protéines endogènes sont aussi digérées et proviennent majoritairement de l'épithélium intestinal et des sécrétions hépatiques, peu modulées par l'alimentation, et pancréatiques qui le sont plus (11).

Les protéines alimentaires et endogènes non digérées sont ensuite utilisées par les bactéries du colon pour leurs propres besoins. Le transfert d'azote alimentaire vers le colon dépend surtout de la digestibilité des protéines ingérées. De l'azote endogène est aussi sécrétée dans le colon, notamment sous forme d'urée. Les bactéries peuvent ainsi utiliser cette urée et les AA issus des protéines alimentaires et endogènes. De l'ammoniac et des AA d'origine bactérienne sont in fine excrétés ou absorbés, mais l'importance de cette voie d'absorption est débattue (12).

### 1.1.2 Échanges interorganes et interconversions d'acides aminés

Les échanges interorganes d'AA découlent d'une part, du fait que les tissus sont séquentiellement exposés aux AA alimentaires, et d'autre part, de spécificités métaboliques intertissulaires. Les spécificités métaboliques des tissus engendrent à la fois des disparités liées à la synthèse et la dégradation des AA, à la production d'urée et aux besoins tissulaires spécifiques en certains AA qui découlent de la synthèse de certaines protéines.

L'intestin, en tant que site d'absorption, prélève d'une part, directement des AA alimentaires, et d'autre part, des AA endogènes qui proviennent soit d'une réabsorption ou de la circulation. Le foie, pour sa part, est alimenté par la veine porte en AA ayant transité par l'intestin et est de même irrigué par la circulation systémique. Les organes

splanchniques métabolisent alors une partie importante des AA ingérés (30 à 50% y seraient retenus) particulièrement l'intestin, mais aussi le foie (13-16) régulant de la sorte la disponibilité des AA alimentaires aux autres tissus. Il existe effectivement une complémentarité entre les zones splanchniques et périphériques dans le transfert, la production et l'utilisation de certains AA, généralement schématisée par un faible prélèvement des AA ramifiés par la zone splanchnique et leur utilisation musculaire pour la production d'Ala utilisée pour la néoglucogenèse dans le foie et de la Gln asservissant l'intestin et les reins (Figure 2).

L'intestin prélève une partie des AA alimentaires à des fins de synthèse protéique et de production d'énergie. Plus spécifiquement, des études ont rapporté que la Gln, l'Asp et le glutamate alimentaire seraient grandement oxydés par l'intestin et que de l'Arg, de l'Ala, de la Gly et de la citrulline seraient ensuite produites (9, 10, 17). L'intestin aurait des besoins spécifiques en Thr liés à la production des mucines (18, 19). Des études suggèrent aussi que la flore intestinale pourrait moduler la disponibilité du Trp en circulation (20), lequel est entre autres utilisé par le cerveau pour la synthèse de sérotonine (Figure 2).

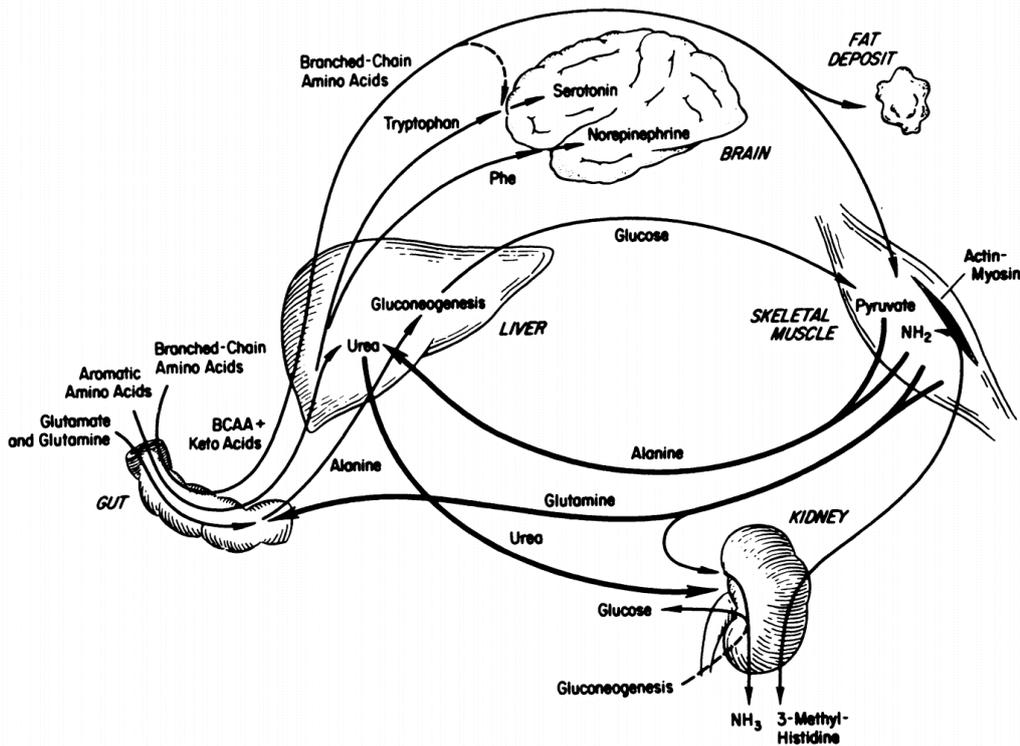


Figure 2. Adapté de (21). Schématisation d'échanges interorganes d'acides aminés.

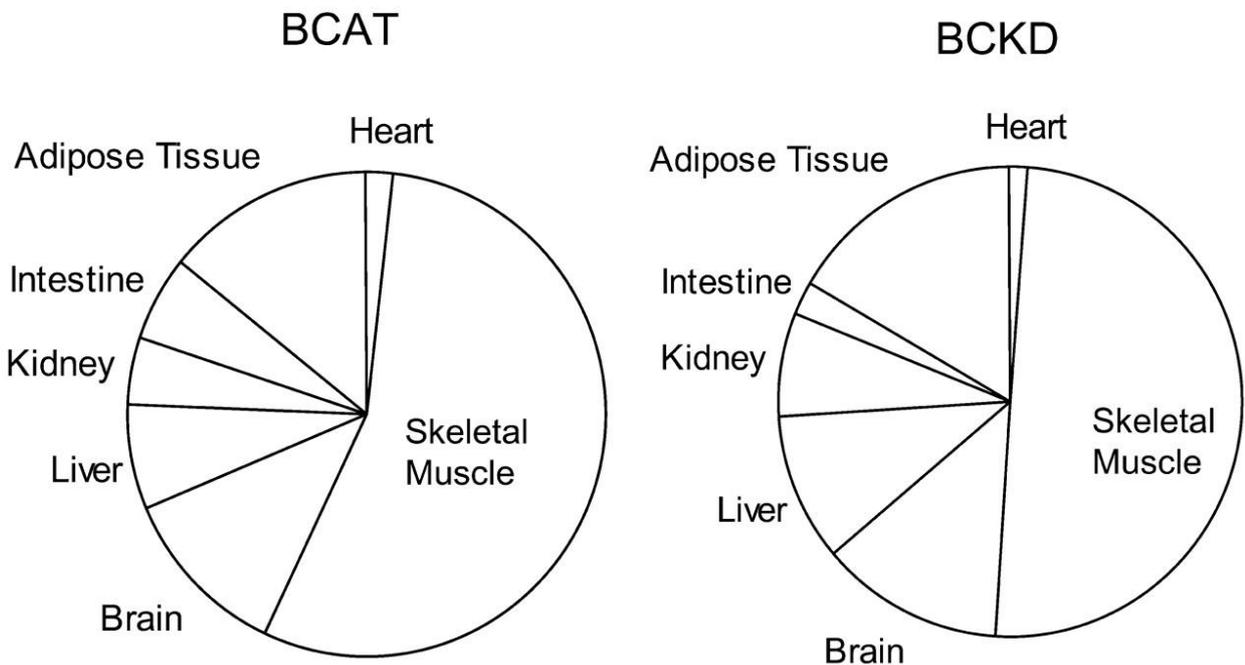


Figure 3. Adapté de (22). Distribution tissulaire chez l'homme des capacités de transaminase des acides aminés ramifiés (BCAT) et du complexe 3-méthyl-2-oxobutanoate déshydrogénase (BCKD). Ces estimations sont basées sur l'activité enzymatique et la masse des tissus.

Le foie, de son côté, en phase post-absorptive, synthétise du glucose avec de la Gln et de l'Ala relarguées par les muscles et probablement aussi par le tissu adipeux (23). Une ségrégation de l'activité de la glutaminase et de la glutamine synthétase entre différentes régions du foie permet de retirer de la circulation la Gln en excès, par exemple après un apport protéique, ou d'en relâcher en circulation en cas de déficit d'autres tissus par exemple lors du jeûne prolongé ou d'une utilisation rénale accrue en cas d'acidose (24). Le foie est le principal site de production d'urée (détaillé à la section 1.1.4). Les organes splanchniques métabolisent relativement peu les AA ramifiés (Ile, Ile et Val), les rendant ainsi plus disponibles pour les tissus périphériques (22).

Le muscle et le tissu adipeux ont justement les plus importants potentiels absolus de catabolisme des AA ramifiés (activité enzymatique x masse du tissu)(Figure 3). Les mécanismes de ce catabolisme sont détaillés davantage à la section 1.1.4. Le glutamate formé de la sorte peut être exporté du tissu ou fournir de l'azote pour la synthèse d'Ala par l'alanine aminotransférase. Le catabolisme des AA ramifiés dans les tissus périphériques est ainsi en phase post-absorptive, d'une part source d'Ala et de cétoacides utilisés pour la néoglucogénèse dans le foie, et d'autre part de Gln utilisée en grande partie par l'intestin ainsi que par les reins (17). Dans le cerveau aussi, le catabolisme des AA ramifiés est source d'azote pour la synthèse de glutamate (25) qui y est utilisé comme neurotransmetteur puis capté par les astrocytes et converti en Gln par la glutamine synthétase et de nouveau en glutamate via la glutaminase après un captage par les neurones. La disponibilité du neurotransmetteur est ainsi maintenue grâce à ce cycle entre le glutamate et la Gln.

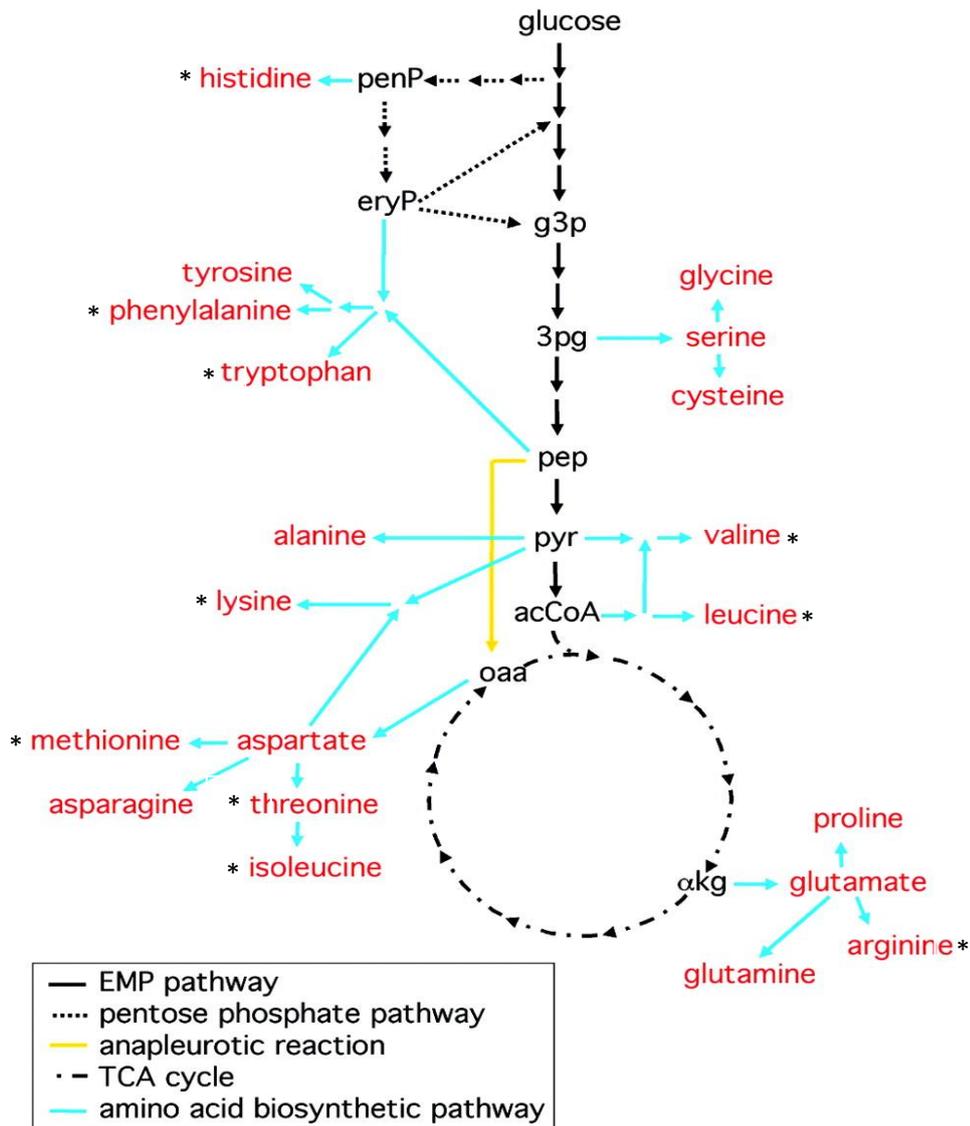


Figure 4. Adapté de (26). Voies de biosynthèse du squelette carboné des acides aminés composant les protéines. Copyright (2002) National Academy of Sciences. \*acides aminés indispensables chez les mammifères et les poissons selon (17).

Les reins, chez l'adulte, utilisent la citrulline notamment produite par l'intestin pour la synthèse d'Arg (27). Les reins sont aussi une source de Ser et de Tyr produite à partir de la Phe (10, 28). Les reins participent de plus à l'équilibre acido-basique, dont le métabolisme protéique est le principal perturbateur, en synthétisant à partir de la Gln de l'ammoniac qui est ensuite excrétée par l'urine et peut être, dans une moindre mesure, métabolisée par le foie (29). Les reins excrètent aussi dans l'urine l'urée produite par le foie par le cycle de l'urée.

Cette utilisation différentielle des AA entre les tissus, démontrée ici par des exemples entre l'utilisation splanchnique et périphérique des AA, met en évidence le rôle de l'alimentation dans la modulation des échanges interorganes d'AA. De plus, l'augmentation des concentrations d'AA ramifiés en circulation lors du syndrome métabolique (30) et leur normalisation durant la perte de poids (31) mettent en avant une perturbation des échanges interorganes d'AA dans ce contexte. Les causes n'en demeurent cependant que peu définies.

Les spécificités intertissulaires du métabolisme du carbone et de l'azote des AA résultent de l'expression différentielle des voies métaboliques. Alors que tous les AA composant les protéines sont présents dans l'alimentation, certains peuvent aussi être synthétisés *de novo*. Un AA est ainsi nutritionnellement indispensable si son squelette carboné ne peut être synthétisé ou s'il ne peut l'être en quantité suffisante pour satisfaire les besoins de l'organisme (17). Cette indispensabilité varie donc en fonction de l'organisme considéré et de son état physiologique. C'est par exemple le cas de l'Arg qui est plus indispensable pour les jeunes que les adultes (17). La figure 4 présente les différentes voies de biosynthèse des 20 AA composant les protéines. Certains de ces AA sont synthétisés à partir de précurseurs à 3 carbones issus de la glycolyse. Les autres sont synthétisés à partir de l'oxaloacétate ou de l' $\alpha$ -kéto-glutarate, 2 intermédiaires à 4 et 5 carbones, respectivement issus du cycle de l'acide citrique. La synthèse des AA est

abordée plus en nuances dans la section 2.3.2. La synthèse des AA implique aussi le métabolisme de l'azote qui est jointe ou enlevée au squelette carboné. La transamination est une importante réaction du métabolisme azoté des AA dans ce contexte. Certains AA sont transaminants, leur squelette carboné pouvant perdre ou recevoir un groupement  $\text{NH}_2$ , alors que d'autres ne le sont pas. Braun et al. (32), ont ainsi proposé de classer les AA en tant que (1) transaminant (2) non-transaminant et indispensable, et (3) non transaminant et non indispensable. La figure 5 démontre les flux réversibles et irréversibles possibles d'azote entre les AA ainsi que les différents types d'enzymes impliquées. On y voit que la Glu est un important carrefour de l'azote des AA.

En plus des échanges interorganes découlant des ces voies de synthèse et de dégradation des AA, des besoins intertissulaires spécifiques en certains AA et des échanges interorganes d'AA peuvent découler de la synthèse de certaines protéines. Par exemple, la synthèse des mucines de l'intestin, qui contiennent beaucoup de Thr, pourrait moduler les besoins intestinaux en Thr (18, 19) et les AA de l'albumine, qui est synthétisée par le foie puis exportée vers la circulation, pourraient être utilisés par d'autres tissus.

### 1.1.3 Utilisation anabolique des acides aminés et renouvellement protéique

Les AA absorbés après la digestion ou synthétisés sont aussi utilisés par les différents tissus pour le maintien de l'homéostasie protéique et énergétique. Les protéines sont en constant renouvellement (environ 300 g/j chez l'homme) via des flux de synthèse et de dégradation équilibrés à l'échelle des tissus et de l'organisme. Ce renouvellement nécessite un apport intracellulaire constant en AA pour compenser les pertes majoritairement liées à leur oxydation (33). Les AA intracellulaires utilisés pour l'anabolisme proviennent donc, d'une part, d'une captation extracellulaire par des transporteurs membranaires, et d'autre part, de la dégradation des protéines intracellulaires qui, tout comme la protéosynthèse, est régulée de façon précise par la disponibilité de ces AA. Des différences entre les flux de protéosynthèse et protéolyse résultent en des gains ou des pertes protéiques durant la croissance ou le jeûne.

Schématiquement, la synthèse d'une protéine commence dans le noyau des cellules par la transcription d'un gène en ARNm qui, une fois dans le cytoplasme, est lu par des ribosomes où des chaînes peptidiques sont assemblées via l'apport d'AA par leur liaison aux ARNt. Ces chaînes peptidiques se replient et deviennent à terme des protéines dont la fonction peut être modulée par diverses modifications post-traductionnelles. La dégradation des protéines se fait majoritairement via le système ubiquitine-protéasome pour les protéines à courte durée de vie et par le lysosome pour les protéines à durée de vie plus longue, agrégées ou pour les organelles (34). Ce renouvellement protéique résultant du couplage protéosynthèse-protéolyse est coûteux sur le plan énergétique (35). Il se fait à une vitesse très variable, notamment en fonction du type de protéine, mais plus globalement selon les espèces et avec de grandes variations entre les tissus. Par exemple, le renouvellement protéique est beaucoup plus rapide dans le foie et le tube digestif que dans le

Tableau 1. Vitesse fractionnaire de synthèse protéique mesurée dans différents tissus chez le rat.

	Synthèse protéique fractionnaire (%/j)		<i>n</i>	Études
	Moyenne	Étendue		
Foie	70	[35 - 106]	25	(36-60)
Muscle	10	[5-20]	31	(36-43, 45-47, 51-53, 55-57, 59-71)
Reins	53	[29 - 84]	8	(37, 40-42, 44, 46, 51, 56)
Peau	24	[9 - 64]	7	(36, 37, 40, 46, 66, 69, 71)
Intestin†	118	[83 - 218]	18	(37, 40-43, 46-51, 56, 58, 63, 72-75)
Cœur	17	[11 - 20]	8	(41-43, 47, 56, 57, 60, 76)
Albumine	52	[18 - 75]	3	(38, 77, 78)

†Valeurs pour la muqueuse intestinale et le jéjunum.

muscle (Tableau 1)(79). De cette façon, bien que les organes splanchniques comparativement aux muscles représentent une petite fraction de la masse protéique corporelle, ils contribuent de manière importante à son renouvellement total. Ceci illustre encore une fois une spécificité interorganes dans le métabolisme des AA.

L'absorption et les échanges interorganes d'AA ne supportent néanmoins pas seulement la synthèse d'AA et le renouvellement protéique, mais aussi la production d'énergie et d'autres produits carbonés ainsi que l'excrétion de l'azote.

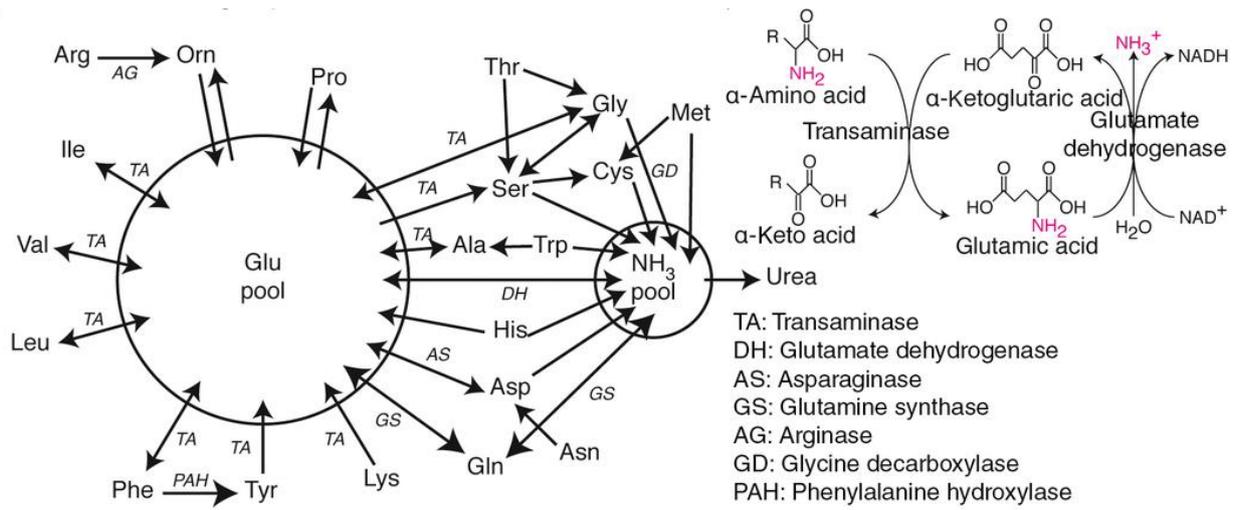


Figure 5. Adapté de (80). Flux réversibles et irréversibles possibles d'azote entre les acides aminés.

#### 1.1.4 Oxydation des acides aminés et excrétion azotée

Le catabolisme des AA se fait globalement en deux temps : par l'oxydation de leurs squelettes carbonés et par l'oxydation déaminative qui génère de l'ammoniac et un cétoacide. L'ammoniac ainsi produit est à terme converti en urée, la forme principale d'excrétion de l'azote. Tout comme pour la synthèse d'AA, leur dégradation se fait en fonction de la batterie enzymatique que possède le tissu, la cellule ou l'organisme considéré (81). Chez les animaux, ceci implique un métabolisme via la coopération entre différents organes.

De même que pour leur synthèse, la dégradation des AA implique aussi le métabolisme de l'azote (Figure 5). Chez les mammifères, la déamination, c'est-à-dire le clivage d'un AA libérant un  $\text{NH}_2$ , se fait de concert avec la conversion de l'ammoniac ainsi produit en urée via le cycle de l'urée. Celui-ci est composé de 5 enzymes : la carbamyl-phosphate synthase-I, l'ornithine carbamoyl transférase, l'arginosuccinate synthase, l'arginosuccinate lyase et l'arginase. De plus, la glutaminase et l'N-acétylglutamate synthase sont essentielles à son fonctionnement *in vivo* (82). Le cycle de l'urée est surtout exprimé dans les hépatocytes périportaux et pourrait l'être dans une moindre mesure dans des entérocytes (83). Cette spécificité métabolique démontre encore une fois l'importante coopération interorgane dans le métabolisme des AA puisque leur azote doit être acheminé au foie pour être ultimement excrété.

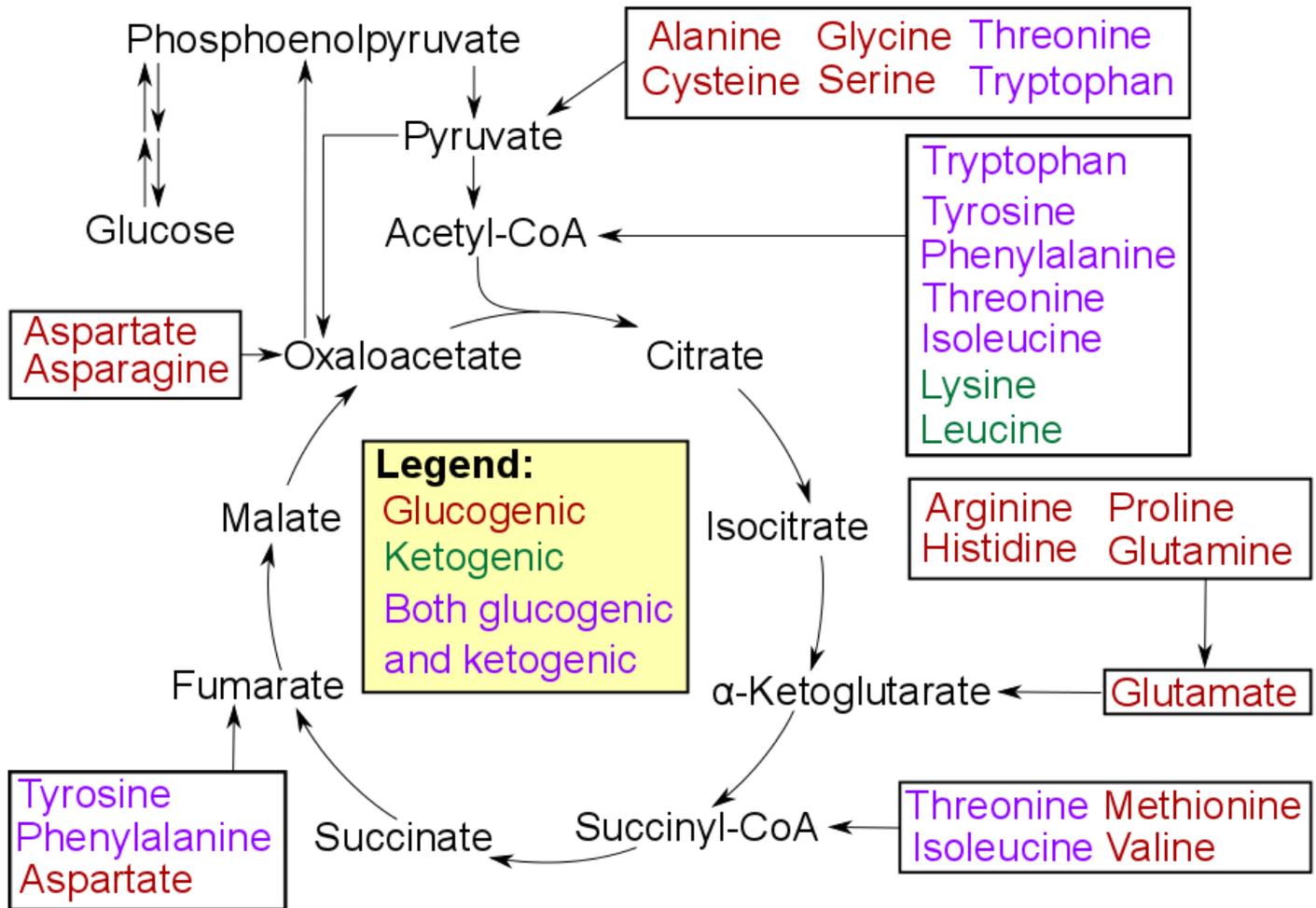


Figure 6. Adapté de (84). Molécules intermédiaires auxquelles peut converger le carbone des acides aminés durant leur dégradation. La classification classique des acides aminés en tant que glyco-géniques et kéto-géniques est indiquée.

Les squelettes carbonés des AA sont dégradés par plusieurs voies métaboliques convergeant vers 6 intermédiaires associés à la glycolyse, la  $\beta$ -oxydation et au cycle de l'acide citrique (Figure 6). Ceci permet une production d'énergie ou une réutilisation anabolique dont des exemples pour les AA ramifiés sont décrits à la section 1.1.2. Dans les cellules en prolifération rapide, la Gln est grandement métabolisée par une version linéaire du cycle de l'acide citrique, la glutaminolyse, une voie métabolique qui serait peu utilisée par la plupart des cellules différenciées (33). L'accent est mis ici sur les AA ramifiés étant donné leur présence accrue en circulation lors du syndrome métabolique (30) et une normalisation des concentrations lors de la perte de poids (31). Les AA ramifiés sont d'abord catabolisés par une transaminase (BCAT) formant un  $\alpha$ -cétoacide et du glutamate. Les  $\alpha$ -cétoacides ainsi formés sont ensuite catabolisés par le complexe 3-méthyl-2-oxobutanoate déshydrogénase (BCKD), l'étape limitante formant les intermédiaires métaboliques décrits à la figure 6. L'acide  $\alpha$ -cétobutyrique formé lors de la dégradation de la Met et aussi de la Thr par la thréonine ammonia-lyase est de même oxydé par la BCKD. La distribution des capacités tissulaires de BCAT et BCKD chez l'homme est présentée à la figure 3. L'important potentiel absolu de catabolisme des AA ramifiés (activité enzymatique x masse du tissu) de certains tissus, dont le muscle, en fait des producteurs d'AA et de cétoacides utilisés par d'autres tissus (cf section 1.1.2).

Alors que le carbone issu de la dégradation des AA est aussi excrété sous forme de CO<sub>2</sub> expiré, l'azote est majoritairement éliminé par voie urinaire (environ 80%), les 20% restants sont éliminés par voie fécale et par desquamation et pertes de phanères (rapport AFSSA et rapport FAO/WHO 1983). L'azote éliminé par voie urinaire l'est très majoritairement sous forme d'urée produite au niveau hépatique (75 à 95% chez le rat (85-88)) et pour une petite partie sous forme d'ammoniac produit par les reins à partir de la Gln (86-89). Lorsque l'apport protéique est adéquat, 20 à 30% de l'urée produite serait transférée vers le côlon et hydrolysée par les bactéries (90-93). L'ammoniac produit

de la sorte peut être utilisé par les bactéries ou réabsorbé, mais les estimations de la réutilisation de l'ammoniac absorbé pour la resynthèse d'urée sont très variables (20 à 70% chez l'homme)(92, 93). L'excrétion urinaire d'urée varie essentiellement en fonction de la quantité de protéines ingérées et de leur profil en AA (85). Au contraire, les pertes fécales y seraient moins sensibles (94, 95), mais peuvent varier selon l'apport en fibres (94, 96, 97). Les pertes fécales, représentant seulement 10 à 25% des pertes azotées totales, sont essentiellement constituées d'azote microbien, car la majorité de l'azote alimentaire ou endogène transitant dans le TGI est absorbé avant l'iléon et seule une petite partie atteint le côlon (les bactéries représenteraient 25 à 54% de la masse sèche fécale totale selon certaines estimations (98)). Les pertes azotées dites « diverses », c'est-à-dire principalement liées à la desquamation, la sudation, les phanères et autres pertes variées, ont été estimées à 1 à 5% des pertes azotées totales chez l'homme (99, 100).

#### 1.1.5 Régulation nutritionnelle

L'utilisation anabolique et catabolique des AA et les échanges interorganes qui en découlent ainsi que le renouvellement protéique varient selon l'état nourri ou post absorptif. L'apport alimentaire engendre, d'une part, un influx tissulaire en AA, et d'autre part, stimule la sécrétion d'insuline. Il en résulte des modulations métaboliques transitoires par rapport à l'état postprandial dont une augmentation de l'oxydation totale des AA (79, 101, 102). À l'état d'équilibre protéique, ces modulations sont contrebalancées par l'état métabolique postabsorptif, résultant en un bilan azoté nul. Le portrait est toutefois plus nuancé dans les détails. En plus de la compartimentation du métabolisme azoté et des échanges interorganes d'AA régis par l'alternance entre l'état nourri et le jeûne, le renouvellement protéique montre des disparités entre tissus dans sa réponse à l'insuline. Ces différences intertissulaires pourraient surtout résulter de la capacité enzymatique absolue des tissus et de la façon dont ils intègrent les signaux

hormonaux et de disponibilité des nutriments, mais beaucoup de questions demeurent quant à leurs origines. Cette section résume donc de façon schématique les effets de l'alimentation sur les échanges interorganes d'AA, leur détection dans le milieu intracellulaire et les effets sur le renouvellement protéique.

Le passage de l'état post absorptif à l'état nourri impacte les échanges interorganes d'AA. Le flux net d'AA se fait surtout de la zone splanchnique vers les tissus périphériques suivant l'apport alimentaire et au contraire de la périphérie, particulièrement du muscle, vers la zone splanchnique en phase postabsorptive et durant le jeûne (103-105). Il y aurait cependant, même après les repas, un constant relargage d'Ala et de Gln du muscle provenant entre autres du métabolisme des AA ramifiés qui échappent largement au métabolisme splanchnique (cf section 1.1.2). La production d'urée augmente aussi transitoirement après les repas (91, 106) et de façon proportionnelle à l'apport protéique (106-108). De plus, autant l'adéquation du profil en AA des protéines alimentaires (104, 109) que la composition en macronutriments du régime (5) semblent moduler les échanges d'AA entre les zones splanchnique et périphérique. À titre d'exemple, alors que des protéines alimentaires de moins bonne qualité augmentent la production d'urée (109), l'addition de sucre aux protéines ingérées la diminue (110).

Dans les tissus, la signalisation de la disponibilité des AA se fait surtout par leurs interactions avec différentes protéines. La protéine kinase mechanistic target of rapamycin (mTOR), bien conservée chez les eucaryotes, est centrale à la régulation de la croissance cellulaire en réponse aux conditions environnementales. Plus particulièrement, son complexe mTORC1 détecte les nutriments, dont les AA, ainsi que les facteurs de croissance comme l'insuline, et régule en réponse la synthèse et la dégradation protéique. Par exemple, pour stimuler la croissance, mTORC1 engendre l'activation de programmes anaboliques telle la translation des ARNm et réprime des programmes cataboliques telle

la dégradation lysosomale (111). Leu et Arg ont des rôles importants dans l'activation de mTORC1, mais leurs effets ne s'expriment pas en l'absence des autres AA (112) et le mécanisme n'est, à ce jour, pas complètement défini (111). Alors que mTORC1 répond à la présence des AA, general control nonderepressible 2 (GCN2), en interagissant avec des ARNt non liés à des AA, répond à un déséquilibre en AA en augmentant leur transport vers le milieu intracellulaire et en réduisant la synthèse protéique (33). Les spécificités intertissulaires de ces voies de détection sont néanmoins peu définies.

Certes, alors que la vitesse de renouvellement protéique résultant de l'équilibre entre protéosynthèse et protéolyse varie grandement entre les tissus (Tableau 1), le renouvellement protéique est aussi régulé tissu-spécifiquement par l'insuline. L'effet de l'insuline sur le métabolisme protéique diffère entre les muscles et la région splanchnique. Dans le foie, elle aurait peu d'effet (113, 114) ou inhiberait la synthèse protéique (115, 116) alors que dans le muscle, elle semble inhiber la dégradation protéique et augmenterait potentiellement la synthèse protéique engendrée par les AA (Figures 7 et 8) (117). Ceci démontre un effet différentiel de l'insuline sur le métabolisme splanchnique et périphérique des AA lié à leur orientation préférentielle vers la synthèse protéique ou le catabolisme. Via les voies de détection cellulaires, les AA ingérés affectent aussi le métabolisme tissulaire pouvant augmenter la synthèse protéique musculaire indépendamment d'un changement d'insulinémie (118). Contrairement à l'insuline, les AA pourraient favoriser l'accrétion protéique à la fois dans la région splanchnique et le muscle (Figure 9)(114) pour lequel de nombreuses études ont montré une augmentation de la synthèse protéique sans effet sur la dégradation protéique (16, 119-125).

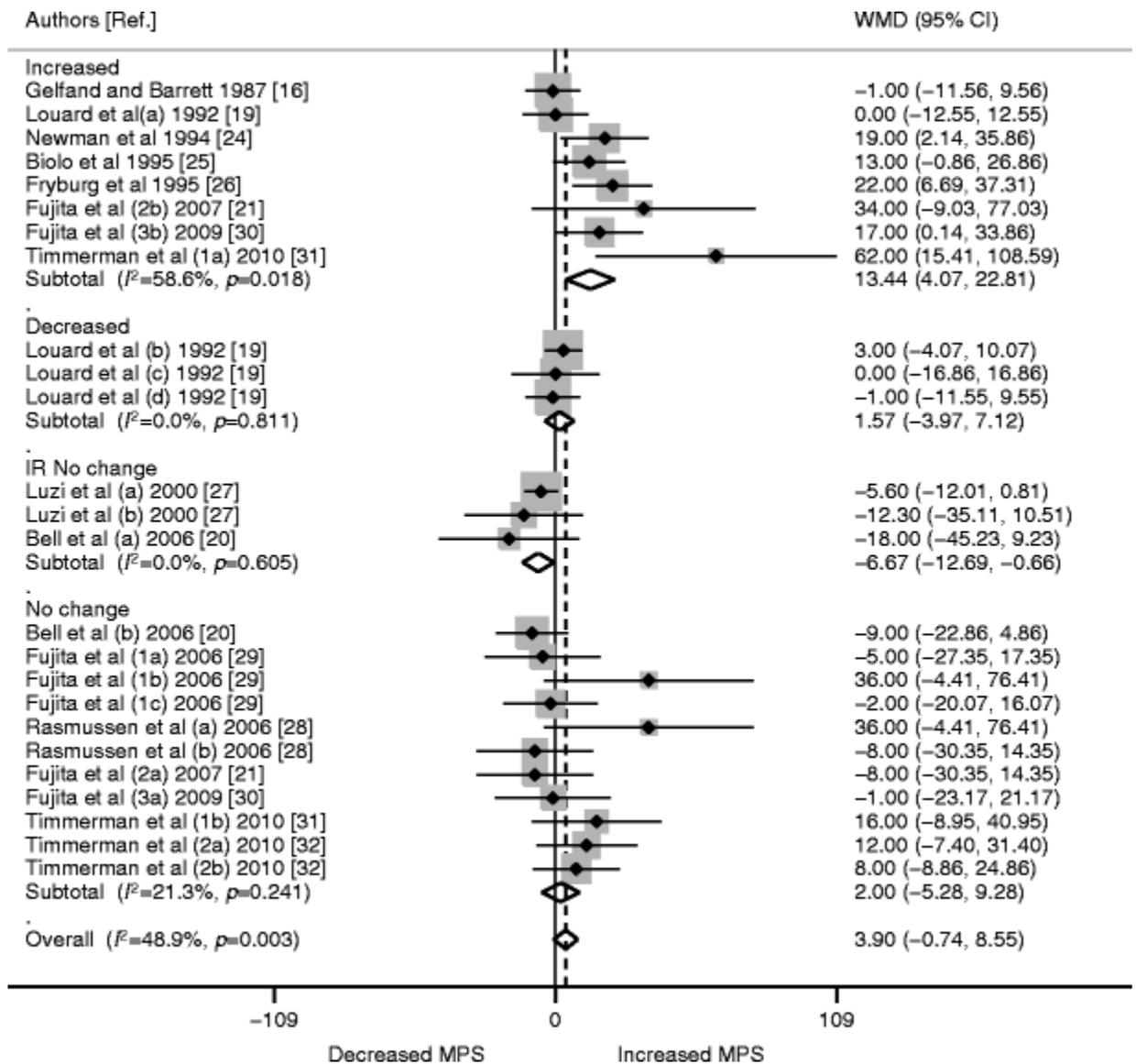


Figure 7. Adapté de (117). Méta-analyse des effets de l'insuline sur la synthèse protéique musculaire (MPS). Aucun effet global n'est observé, mais l'insuline pourrait stimuler la synthèse protéique engendrée par les acides aminés.

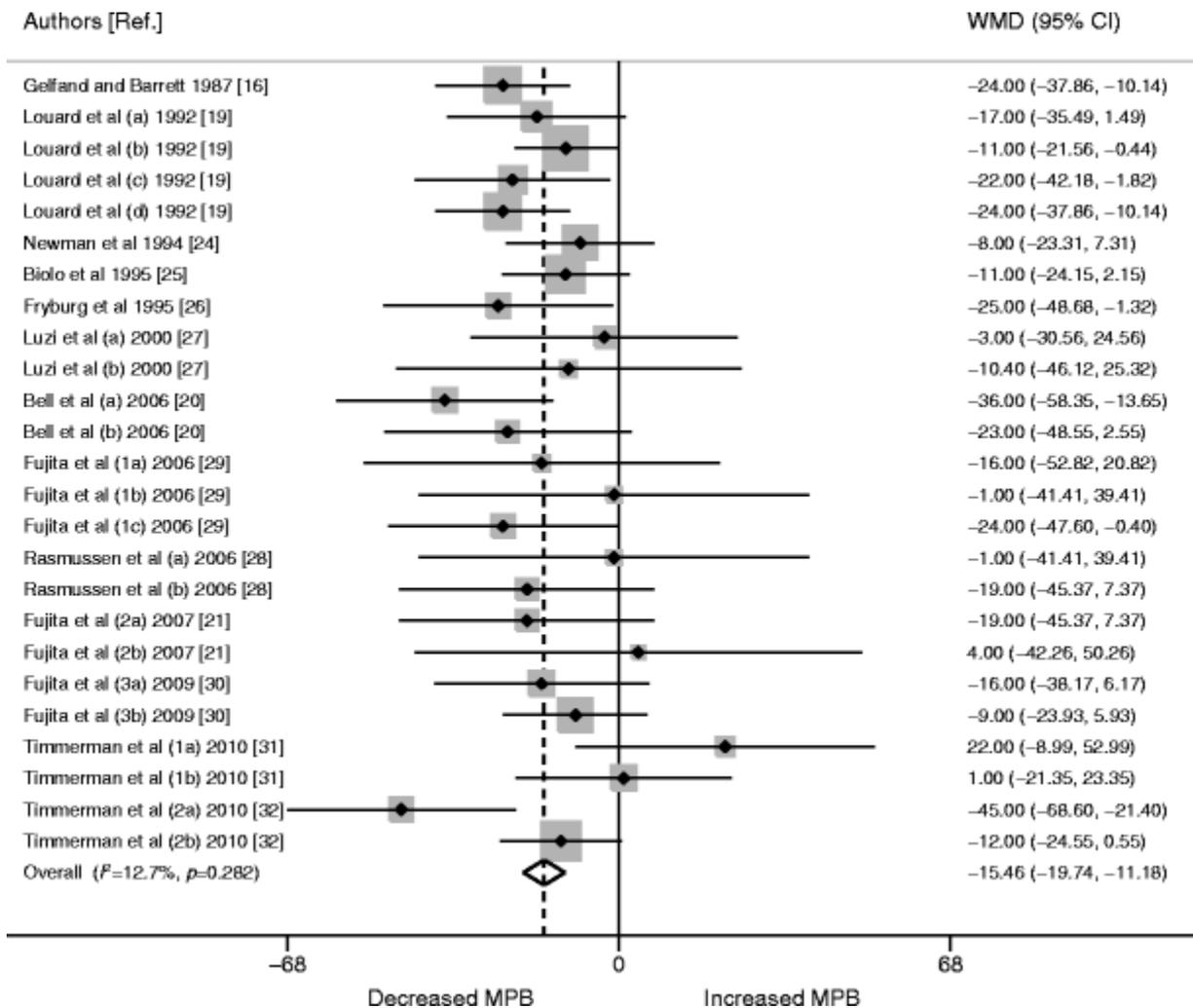


Figure 8. Adapté de (117). Méta-analyse des effets de l'insuline sur la dégradation protéique musculaire (MPB). Une réduction par l'insuline de la dégradation protéique musculaire est observée.

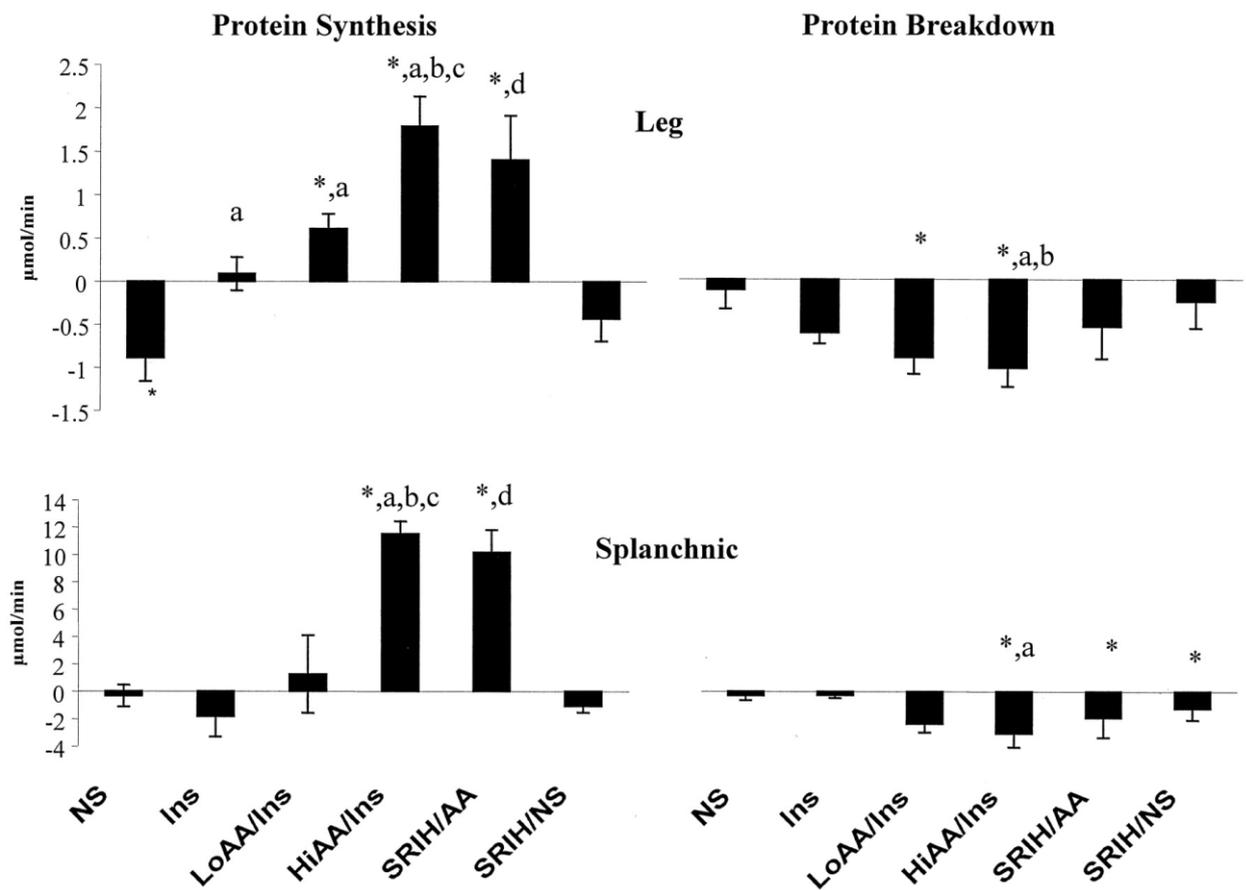


Figure 9. Adapté de (114). Effet de l'insuline et des acides aminés (AA) sur la synthèse et la dégradation protéique musculaire et splanchnique chez l'homme. **NS**, Perfusion de saline; **Ins**, Perfusion d'insuline seule; **LoAA/Ins**, Perfusion d'AA pour maintenir les concentrations plasmatiques durant l'infusion d'insuline; **HiAA/Ins**, Perfusion d'AA à des niveaux physiologiques élevés et perfusion d'insuline; **SRIH/AA**, Perfusion de somatostatine et remplacement d'insuline, de glucagon et d'hormone de croissance avec les AA à des niveaux physiologiques élevés; **SRIH/S**, Perfusion de somatostatine et de saline.

### 1.1.6 Méthodes d'investigation

Les résultats sur les cinétiques d'absorption et du métabolisme des protéines et de leurs AA présentés ci-dessus sont le fruit de diverses techniques. La section qui suit en décrit les grandes lignes avec pour objectif d'identifier en quoi de nouvelles méthodes telles que les variations d'abondances isotopiques naturelles, qui sont présentées dans la 2<sup>e</sup> partie de ce chapitre, pourraient s'avérer utiles.

La mesure de la quantité ou de la concentration d'une substance dans un compartiment métabolique n'est pas toujours très informative sur son utilisation. À titre d'exemple, les sécrétions biliaires et pancréatiques, pouvant d'ailleurs être quantifiées via des canules (126), rendent le contenu total en protéines du tube digestif moins informatif sur l'absorption des protéines alimentaires puisque des protéines endogènes y sont mélangées. Certes, le changement de concentration d'une substance entre une artère irriguant un tissu et une veine le drainant permet de voir si celui-ci en est un producteur ou un consommateur, tel qu'utilisé lors de bilan d'organes en AA (10). Toutefois, ces concentrations sont peu informatives sur les réactions ayant lieu dans les tissus. Bien qu'utiles, les changements de concentration peuvent parfois même être trompeurs (127). Heureusement, le traçage isotopique permet des analyses plus approfondies.

Les premiers travaux mettant en œuvre des traceurs isotopiques ont montré que les composantes corporelles sont dans un état dynamique de synthèse et de dégradation (128). Aujourd'hui, ces techniques permettent effectivement d'étudier le métabolisme plus en détail, mais restent assujetties à certaines limites. Dans l'ensemble, l'objectif est de suivre le devenir métabolique d'une molécule pour comprendre son assimilation et son métabolisme, impliquant souvent des interconversions en divers produits. Par exemple, lors de l'ingestion d'un AA marqué au  $^{15}\text{N}$ , un surplus de  $^{15}\text{N}$  se retrouvera dans tous les composés et les compartiments impliqués dans son métabolisme, depuis la digestion

jusqu'à l'excrétion en passant par la synthèse protéique et les autres AA avec lesquels ont lieu des transaminations. De nombreuses applications découlent donc du traçage isotopique.

Concernant les cinétiques protéiques corps entier, les méthodes utilisées s'appuient sur un modèle à deux compartiments où les AA libres échangent avec les protéines tissulaires durant leur synthèse et leur dégradation, et sont ultimement éliminés sous forme d'urée et de CO<sub>2</sub>. Ces méthodes corps entier ont mis en évidence des changements globaux de déplétion et réplétion protéiques entre les phases postabsorptive et postprandiale (129), mais n'informent pas sur les changements métaboliques à l'échelle des organes, qui peuvent être opposés entre les zones splanchniques et le muscle (130). Des méthodes ciblant spécifiquement le métabolisme d'un organe permettent de pallier cette limitation. Concernant la synthèse protéique, deux approches sont utilisées : d'une part, la perfusion où un apport continu en AA enrichis permettant l'atteinte d'un enrichissement isotopique stable dans le précurseur de la synthèse protéique, et d'autre part, l'administration d'une large dose d'un AA enrichi. Dans les deux cas, la vitesse d'incorporation de l'acide aminé dans les protéines est utilisée pour estimer le taux de synthèse protéique. Le doute premier concernant la perfusion ou l'apport continu est la connaissance de l'enrichissement du vrai précurseur de la synthèse protéique, les AA liés aux ARNt. Leur enrichissement est potentiellement différent de celui des AA libres plus accessibles et utilisés comme pool précurseur dans les calculs. Dans le cas de la méthode de la large dose, se pose en outre la question d'un potentiel effet stimulateur des AA administrés sur la synthèse protéique, qui pourrait conduire à une surestimation du taux de synthèse (131).

Le deutérium (<sup>2</sup>H ou D) administré sous forme d'oxyde de deutérium (D<sub>2</sub>O) permet de limiter l'incertitude concernant l'enrichissement du précurseur puisque son enrichissement en <sup>2</sup>H se fait de façon intracellulaire lors de la synthèse de l'Ala par

transamination (via un échange d'hydrogène avec l'eau lors de la réaction (132)). Dans cette méthode, on mesure le plus souvent la vitesse de synthèse protéique en suivant l'incorporation dans les protéines d'Ala deutérée, produite par la transamination du pyruvate, qui est issu de la glycolyse. Cette technique est polyvalente puisqu'elle permet des mesures sur des périodes assez courtes, ce qui est une force de la technique large dose, ou sur des périodes plus longues et intégrant divers états physiologiques, ce qui est une force de la technique de perfusion. L'administration de D<sub>2</sub>O peut être assimilée à une technique de perfusion corps entier, qui d'ailleurs ne marque pas seulement les AA, mais permet d'étudier les cinétiques de divers composés tels que les lipides et les acides nucléiques.

La vitesse de dégradation des protéines est plus difficile à estimer. Elle peut être déterminée par la vitesse à laquelle les AA provenant de la dégradation protéique diluent l'enrichissement intracellulaire (133) ou par un bilan artério-veineux tissulaire d'AA combiné à leur traçage isotopique (134).

L'apport de ces différentes techniques à notre compréhension du métabolisme est considérable. Néanmoins, leur principale limite repose sur la difficulté de mesurer certains flux et de le faire de façon intégrative pour l'ensemble des molécules et des AA impliqués. Ceci s'explique par le fait que souvent un seul ou quelques AA au maximum sont tracés isotopiquement. De plus, il est fréquent qu'un seul flux telle la synthèse protéique dans un seul organe comme le muscle soit mesuré et cela sans tenir compte de l'oxydation des AA. Ainsi, les variations d'abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote des protéines tissulaires s'avèrent prometteuses pour éclaircir de façon complémentaire la régulation de certains flux métaboliques lors de différentes conditions nutritionnelles et physiopathologiques, comme le syndrome métabolique. Cette technique novatrice est expliquée dans la 2<sup>e</sup> partie de ce chapitre alors que la section qui suit décrit

les altérations connues du métabolisme des protéines et des AA lors du syndrome métabolique.

Tableau 2. Adapté de (135). Critères du syndrome métabolique selon différentes définitions.

	<b>OMS (1998)</b>	<b>GEEI (1999)</b>	<b>PNAEC (2001)</b>	<b>AAEC (2003)</b>	<b>FID (2005)</b>
Résistance à l'insuline	Intolérance au glucose dont diabète de type II ou résistance à l'insuline <b>combinée à 2 des critères suivants</b>	Insuline plasmatique >75e percentile <b>et 2 des critères suivants</b>	Aucune, <b>mais 3 des 5 critères suivants</b>	Intolérance au glucose <b>combinée à 2 des critères suivants selon le jugement clinique</b>	Aucune
Obésité	Hommes : rapport taille/hanche >0,90 Femmes: rapport taille/hanche >0,85 et/ou IMC > 30	Tour de taille >94 cm chez les hommes et 80 cm chez les femmes	Tour de taille >102 cm chez les hommes et 88 cm chez les femmes	IMC ≥25	Augmentation du tour de taille (spécifique à la population) <b>combinée à 2 des critères suivants</b>
Lipides	TG ≥150 mg/dl et/ou HDL-C<35 mg/dl chez les hommes ou <39 mg/dl chez les femmes	TG ≥150 mg/dl et/ou HDL-C<39 mg/dl chez les hommes et les femmes	TG ≥150 mg/dl HDL-C<40 mg/dl chez les hommes ou <50 mg/dl chez les femmes	TG ≥150 mg/dl HDL-C<40 mg/dl chez les hommes ou <50 mg/dl chez les femmes	TG ≥150 mg/dl ou sous traitement HDL-C<40 mg/dl chez les hommes ou <50 mg/dl chez les femmes ou sous traitement
Tension artérielle	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg ou sous traitement	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg systolique ou ≥85 mm Hg diastolique ou sous traitement
Glucose	Intolérance au glucose dont diabète de type II	Intolérance au glucose ou hyperglycémie à jeun	>110 mg/dl incluant le diabète de type II	Intolérance au glucose ou hyperglycémie à jeun	>100 mg/dl incluant le diabète de type II
Autres	Microalbuminurie: excrétion urinaire >20 mg/min ou ratio albumine: créatinine >30 mg/g	Autres caractéristiques de résistance à l'insuline incluant l'historique familial de diabète de type II, la polykystose ovarienne, un mode vie sédentaire, un âge avancé et la susceptibilité ethnique			

**OMS**, Organisation mondiale de la santé; **GEEI**, Groupe européen pour l'étude de l'insulino-résistance; **PNAEC**, Programme national américain d'éducation sur le cholestérol; **AAEC**, Association américaine des endocrinologistes cliniques; **FID**, Fédération internationale du diabète.

## 1.2 Métabolisme des protéines et des acides aminés lors du syndrome métabolique

### 1.2.1 Le syndrome métabolique

La première définition officielle du syndrome métabolique a été donnée en 1998 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dans le but d'identifier les individus à risque accru de maladies cardiovasculaires et de diabète de type II. Selon l'OMS, il y a syndrome métabolique lorsque la résistance à l'insuline est associée à deux autres facteurs de risque parmi l'hypertension, l'obésité abdominale, la dyslipidémie et la microalbuminurie (136). Le Groupe européen pour l'étude de l'insulino-résistance (GEEI) publia peu après une définition similaire n'incluant pas la microalbuminurie. En 2001, le Programme national américain d'éducation sur le cholestérol (PNAEC) proposa une nouvelle définition plus adaptée à la pratique clinique et basée sur l'occurrence simultanée d'au moins 3 facteurs de risques parmi l'obésité viscérale, l'hyperlipidémie, un faible taux de cholestérol HDL, l'hyperglycémie et l'hypertension. Les seuils des critères utilisés par ces définitions et par d'autres postulées par la suite sont détaillés dans le tableau 2. La prévalence du syndrome métabolique telle qu'évaluée au travers de ces critères s'accroît à l'échelle planétaire et représenterait entre 20 et 30% de la population adulte pour la plupart des pays (136, 137). Ainsi, en 2016, 17,5 millions de décès étaient attribuables à des facteurs de risque métabolique, une augmentation de près de 20% en 10 ans (138). Le syndrome métabolique est toutefois hétérogène. Effectivement, il existe potentiellement 16 combinaisons comportant au moins 3 parmi les 5 facteurs de risque utilisés cliniquement, avec des prévalences différentes entre ces combinaisons (139). Cette disparité phénotypique pourrait signer des causes différentes. Celles-ci sont d'ailleurs multiples. L'âge, l'ethnicité et le mode de vie, dont l'inactivité physique

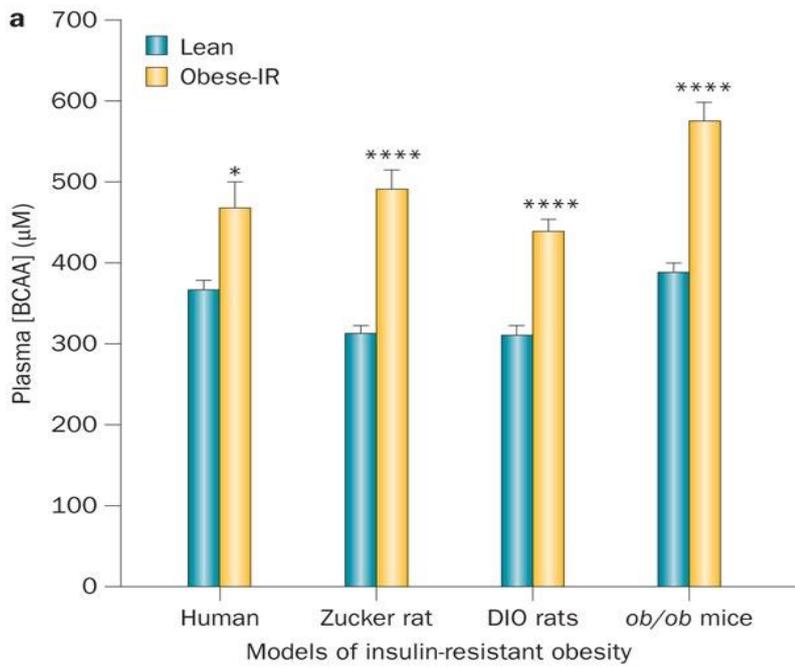


Figure 10. Adapté de (30). Effet de l'obésité et de l'insulinorésistance sur la concentration plasmatique d'acides aminés ramifiés (**BCAA**) plasmatiques. Les modèles Zucker et ob/ob sont des modèles d'obésité héréditaire. **DIO**, Obésité induite par l'alimentation.

et l'alimentation, ont par exemple tous été associés au syndrome métabolique (136). Sur le plan physiopathologique, une insulino-résistance multiorganes associée à une inflammation à bas bruit pourrait conduire à l'apparition des signes cliniques caractéristiques, mais leur origine n'est pas claire. Selon la Fédération internationale du diabète, il y a justement syndrome et non maladie en cas d'incertitude de ce qui cause les symptômes (140). Ainsi donc, cette section décrit tout d'abord comment est étudié le syndrome métabolique pour ensuite tenter d'identifier les altérations du métabolisme des protéines et des AA qui l'accompagne.

Contrairement à l'Homme, il n'existe aucune définition du syndrome métabolique chez l'animal. Les modèles animaux permettent néanmoins l'étude de composantes, notamment biochimiques ou moléculaires, difficiles à étudier chez l'Homme. Il s'agit généralement de modèles d'obésité présentant certains des signes cliniques du syndrome métaboliques, mais pas tous. Ainsi, les rongeurs sont les modèles les plus utilisés, mais ont une pertinence limitée quant aux composantes liées au cholestérol puisqu'ils transportent la majorité de leur cholestérol sous la forme HDL. Au-delà d'interventions pharmacologiques, deux types de modèles animaux ont été utilisés pour étudier le syndrome métabolique ou ses composantes : les modèles génétiques et ceux d'exposition alimentaire à différents régimes. Dans le premier cas, un groupe ayant une prédisposition mono- ou polygénique à l'obésité et à l'insulino-résistance est comparé à un autre groupe non prédisposé soumis au même régime. Dans le second cas, un groupe soumis à un régime déséquilibré est comparé à un groupe dont le régime engendre une moindre dérive métabolique. Dans tous les cas, que ce soit chez l'Homme ou des modèles murins héréditaires ou alimentaires, des concentrations élevées d'AA ramifiés en circulation ont été documentées chez des individus obèses et insulino-résistants (30)(Figure 10). Récemment, les concentrations d'AA circulants ont

Tableau 3. Avantages et inconvénients de différents types de modèles permettant l'étude du syndrome métabolique.

	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Génétiques	Développement rapide des signes cliniques	Couteux
Monogéniques		Moins réaliste étiologiquement
Polygéniques	Plus réaliste étiologiquement	
Alimentaires	Moins couteux Plus réaliste étiologiquement	Développement plus lent des signes cliniques Effets potentiellement variables selon la composition du régime
Hybrides (alimentaires x polygéniques)	Probablement le plus réaliste étiologiquement	Peu exploré Complexité potentielle à identifier les variables causales

même permis de prédire le risque sur 4 ans de diabète, de syndrome métabolique, de dyslipidémie ainsi que d'hypertension (141). La controverse demeure néanmoins concernant l'origine de cette altération des concentrations, mais celle-ci suggère un métabolisme altéré et cela probablement chez tout l'éventail de phénotypes qui constituent le syndrome métabolique. Des changements de l'oxydation des AA et des flux de synthèse et de dégradation protéiques de différents tissus sont susceptibles d'être en cause.

Une différence majeure entre les modèles génétiques et ceux d'exposition alimentaire est le temps nécessaire au développement du syndrome métabolique qui se manifeste beaucoup plus vite chez les modèles génétiques. L'interaction entre le génome et le régime a aussi été bien démontrée chez la souris où certaines souches sont sensibles au régime gras alors que d'autres ne le sont pas (142). En l'occurrence, une approche plutôt hybride existe avec des rats enclins à l'obésité ou à la dérive métabolique, mais cela de façon variable selon la composition du régime puisqu'une fraction seulement des individus sensibles au gras sont aussi sensibles aux glucides (143, 144). On parle ici de modèle sensible/résistant (ou prone/resistant en anglais). Les avantages et les inconvénients de ces différents types de modèles sont présentés dans le tableau 3. Des modèles murins monogéniques impliquant la leptine ou son récepteur ont fréquemment été utilisés pour l'étude du syndrome métabolique ou de ses composantes (145). Cette approche se heurte néanmoins à la rareté de telles mutations dans la population humaine. Les modèles murins polygéniques ayant aussi été développés (146) pourraient ainsi permettre de mieux cibler l'ensemble de l'éventail métabolique de ce syndrome.

Au-delà de prédispositions génétiques ou autres, consommer plus que les besoins résulte en un gain de poids et cela indépendamment de la composition en macronutriments du régime. Les glucides et les protéines excédentaires peuvent être transformés en lipides notamment par le foie puis stockés dans le tissu adipeux. C'est particulièrement vrai pour

le fructose alimentaire, dont la conversion en acide gras est plus efficace que celle du glucose, et qui est fréquemment inclus dans les régimes d'induction d'obésité et d'insulino-résistance (145). Ces interconversions métaboliques vers les acides gras sont toutefois moins efficaces que le stockage direct des acides gras alimentaires. Les régimes riches en gras sont d'ailleurs les plus utilisés pour l'étude du syndrome métabolique ou de ses composantes induits par l'alimentation. Les effets sur la glycémie des régimes inducteurs d'obésité et de résistance à l'insuline par rapport à des régimes plus équilibrés sont par contre conflictuels selon les études (147). Une limite de l'approche basée sur des régimes d'induction est le risque de confusion entre les effets résultants des dérives prépathologiques (obésité, insulino-résistance) et ceux simplement liés aux adaptations métaboliques résultant des différences de composition entre le régime témoin et le régime d'induction. Cette limite peut être contournée en utilisant des modèles animaux basés sur la différence de sensibilité au régime au sein d'une population liée à son hétérogénéité, qu'elle soit génétique, comportementale ou microbienne tel le modèle sensible/résistant décrit précédemment.

Les modèles d'exposition alimentaire à un régime déséquilibré ont donc l'avantage d'être plus réalistes étiologiquement que les modèles génétiques, surtout que les modèles monogéniques. Ils sont par contre encombrés d'une apparition plus tardive des signes cliniques du syndrome métabolique. Les modèles hybrides sont probablement les plus réalistes étiologiquement.

### 1.2.2 Concentrations circulantes d'acides aminés lors du syndrome métabolique

De nombreuses études ont documenté des concentrations circulantes élevées d'AA ramifiés lors du syndrome métabolique et du diabète de type II (148-158)(Figure 10). Dans une moindre mesure, le même phénomène a été observé pour la Met, la Cys, la Phe et la Tyr (151, 154, 155, 159, 160). De telles concentrations d'AA ont même été liées

au risque futur de développer le syndrome métabolique et le diabète de type II (141, 161, 162). Il a d'ailleurs été démontré qu'un test oral de tolérance au glucose (163-166), un repas (157) ou une perfusion d'insuline (158, 167, 168) diminuent moins les concentrations circulantes d'AA ramifiés lors du syndrome métabolique. Cette augmentation des concentrations d'AA en circulation lors du syndrome métabolique pourrait potentiellement résulter d'un apport alimentaire plus élevé, d'une moindre oxydation, d'une moindre utilisation pour la protéosynthèse ou d'une protéolyse accrue.

Concernant l'apport alimentaire, les concentrations circulantes d'AA étant mesurées à jeun, l'apport alimentaire récent serait peu susceptible d'affecter les mesures (160). Par ailleurs, un apport alimentaire élevé ou une supplémentation en AA ramifiés a, au contraire, été négativement associé à l'obésité (169-173). Il semble donc peu probable que les concentrations élevées d'AA en circulation lors du syndrome métabolique soient liées à l'apport alimentaire.

Concernant la protéosynthèse et la protéolyse, les études du muscle ont globalement démontré que l'insuline pourrait stimuler la synthèse protéique engendrée par les AA et inhibe la protéolyse (117). La résistance périphérique à l'insuline lors du syndrome métabolique est donc susceptible d'augmenter les concentrations circulantes d'AA ramifiés lors du syndrome métabolique. Cependant, puisque les concentrations élevées d'AA sont mises en évidence à jeun, lorsque l'insulinémie est minimale comparativement à l'état nourri, la synthèse protéique serait peu susceptible d'être en cause (160). Tout de même, bien que le peu d'études connues soit inconstantes (détaillées dans la section suivante), une moindre inhibition postprandiale de la protéolyse corps entier et une moindre stimulation de la synthèse protéique musculaire ont été observées chez l'obèse insulino-résistant (174).

Outre la synthèse et la dégradation protéique, une modulation de l'oxydation des AA ramifiés est tout aussi susceptible d'accroître leurs concentrations circulantes lors du

syndrome métabolique (Figure 10). Par ailleurs, les AA soufrés Cys et Met pourraient être associés à l'obésité et à la résistance à l'insuline (160) par le même mécanisme, puisque l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique formé lors de la dégradation de la Met est aussi oxydé via la BCKD. Les rôles potentiels de différents tissus dans le phénomène sont présentés ci-après.

Le tissu adipeux sous-cutané est le tissu pour lequel il est possible d'affirmer avec le plus de certitude que le métabolisme des AA ramifiés est impacté, plus précisément réduit, lors de l'obésité et de la résistance à l'insuline (30). Après la chirurgie bariatrique, qui diminue rapidement l'adiposité, l'observation d'une baisse des concentrations circulantes d'AA ramifiés couplée à une expression accrue de BCKD dans le tissu adipeux conforte le rôle de ce tissu (30, 160). Lors de du syndrome métabolique, un influx élevé de lipides vers le tissu adipeux, sa résistance à l'insuline, ou sa prolifération pourraient limiter son besoin de cataboliser les AA ramifiés, qui ont d'ailleurs démontré pouvoir significativement contribuer à l'acétyl-CoA lipogénique chez des adipocytes différenciés en culture (175). En revanche, chez le rat Zucker obèse, l'administration d'un mélange d'AA enrichi en  $^{14}\text{C}$  a révélé que leurs squelettes carbonés étaient moins incorporés dans les protéines de la carcasse, mais l'étaient plus dans les lipides (176) indiquant une contribution accrue des AA à la lipogénèse. Une oxydation accrue des AA au niveau corps entier fût aussi démontrée, mais cela seulement durant la phase de croissance rapide des rats Zucker obèses (176). En somme, l'implication et le contexte métabolique global de ce catabolisme réduit des AA ramifiés dans le tissu adipeux lors du syndrome métabolique restent peu définis.

Ensuite, le catabolisme des AA ramifiés lors de la résistance à l'insuline semble être de même diminué dans le foie chez les modèles génétiques, mais pourrait y être augmenté chez les modèles d'exposition alimentaire. Ceci suggère l'existence potentielle d'au moins 2 phénotypes du métabolisme des AA ramifiés lors de la résistance à l'insuline

(30) (Figure 11). Lynch et Adams (30) ont proposé ce deuxième phénotype associé à l'exposition alimentaire suivant l'observation d'une activité hépatique accrue de BCKD chez des rats exposés à un régime riche en gras comparativement à un régime riche en glucides (177). Le même groupe a ensuite démontré que l'ingestion d'acides gras à chaînes moyennes stimule l'activité hépatique de BCKD (178). Dans le même contexte, d'autres, avec un traçage au  $^{14}\text{C}$ , ont toutefois préalablement démontré une oxydation réduite des AA ramifiés dans le foie et accrue dans le muscle (179). Ceci indique que le carbone de ces AA ramifiés pourrait être utilisé de façon anabolique par le foie suivant l'ingestion d'acides gras à chaînes moyennes. La question est donc de savoir si les enzymes catabolisant les AA ramifiés sont des marqueurs idéaux, puisqu'elles n'indiquent en rien le devenir de leur carbone, qui par la suite peut être complètement oxydé ou utilisé de façon anabolique (Figures 4 et 6). Ces résultats suggèrent aussi qu'une augmentation de l'activité hépatique de BCKD chez les modèles d'exposition alimentaire à un régime gras (Figure 11), pourrait résulter d'un effet de l'ingestion d'acides gras sans être liée au développement de la résistance à l'insuline. Par ailleurs, toujours en ce qui concerne le foie, une hypothèse stipule qu'une forte transamination, notamment via l'alanine et l'aspartate aminotransférase, précéderait le développement de la stéatose hépatique associée au syndrome métabolique (180). Un lien avec la BCAT peut facilement être fait puisque la Glu agit comme récepteur ou donneur d'azote lors des trois réactions catalysées par ces enzymes.

Au niveau musculaire, bien qu'une moindre activité de BCKD ait été observée chez le rat Zucker obèse (30), l'effet de l'obésité et de la résistance à l'insuline sur le catabolisme des AA ramifiés est peu clair (160). Dans ce contexte, deux modèles ont été postulés en vue de lier le métabolisme musculaire des AA ramifiés à l'oxydation décrie des lipides lors de

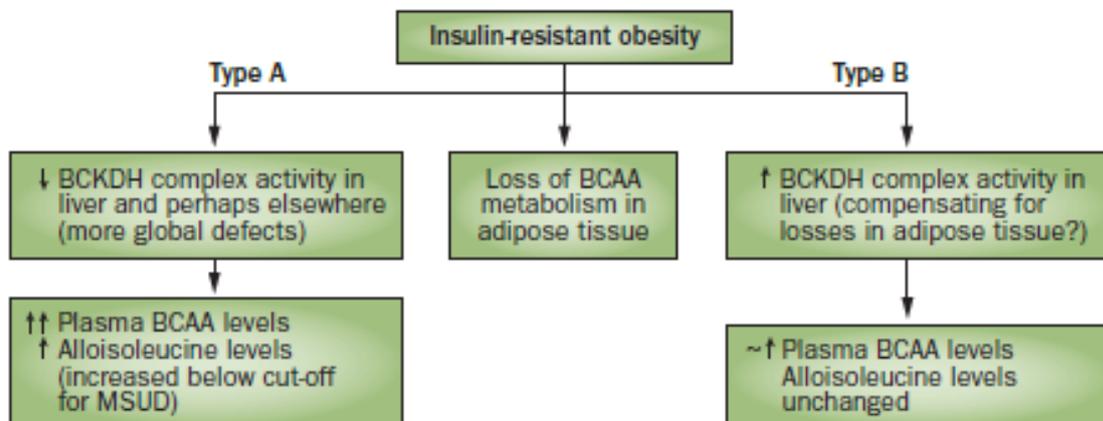


Figure 11. Phénotypes du métabolisme des acides aminés ramifiés lors de l'obésité et de l'insulinorésistance proposés par Lynch et Adams (30) suivant une synthèse de la littérature. Le type A représente les modèles de prédisposition et le type B les modèles d'exposition alimentaire. Il est à noter que le foie n'était pas le seul tissu affecté chez le rat Zucker prédisposé à l'obésité.

la résistance à l'insuline. Newgard (181) a proposé que l'augmentation des AA ramifiés circulants stimule leur oxydation dans certains tissus, dont le muscle. Ce catabolisme produit des intermédiaires du cycle de l'acide citrique (Figure 6), ce qui diminuerait l'oxydation des lipides et du glucose et causerait de la résistance à l'insuline. Au contraire, Adams (160) a proposé qu'un catabolisme réduit des AA ramifiés lors de la résistance à l'insuline diminue le flux d'intermédiaires du cycle de l'acide citrique et nuit ainsi à l'oxydation des lipides. Ce second modèle est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le catabolisme des AA ramifiés sert à la synthèse de glycérol, via la phosphoénolpyruvate carboxykinase, permettant une synthèse de triglycérides et une oxydation subséquente accrue des acides gras (182). Cependant, les liens entre le métabolisme des AA ramifiés et celui des lipides restent à être clairement définis. Certes, l'incorporation accrue des AA dans les lipides et décruée dans les protéines chez le rat Zucker obèse (176) suggère que l'efficacité musculaire d'utilisation des protéines alimentaires, qui est réduite chez ce modèle de syndrome métabolique, est inversement liée au flux de carbone des AA vers le cycle de l'acide citrique ou l'acétyl-CoA (Figure 6). Il est à noter cependant qu'une prise alimentaire et donc une ingestion d'AA plus importante des rats Zucker obèses pourrait aussi jouer un rôle dans le phénomène (183) puisque le squelette carboné des AA alimentaires excédentaires est orienté vers le cycle de l'acide citrique (184).

Pour conclure, il semble assez bien établi au niveau enzymatique que le catabolisme des AA ramifiés est réduit dans le tissu adipeux lors du syndrome métabolique, une caractéristique des adipocytes en prolifération (175). Les implications métaboliques et les rôles potentiels d'autres tissus comme le muscle et le foie sont moins bien établis.

### 1.2.3 Renouvellement protéique lors du syndrome métabolique

Puisque l'insuline régule le renouvellement protéique, l'insulinorésistance lors du syndrome métabolique est susceptible d'affecter les cinétiques de synthèse et de dégradation protéiques et ainsi les concentrations d'AA circulants. Les études pertinentes relativement peu nombreuses chez l'homme ont été réalisées pour évaluer l'effet de l'obésité ou du diabète de type II sur les cinétiques protéiques et sont synthétisées dans le tableau 4. Au-delà des concentrations d'AA circulants pouvant différer chez l'obèse lors de la stimulation par l'insuline (185, 186) et différemment impacter le métabolisme, les différences de composition corporelle rendent les cinétiques protéiques corps entier plus difficilement interprétables. Effectivement, les études à l'état basal, ont rapporté chez l'obèse soit une dégradation protéique corps entier accrue (152, 187, 188) ou inchangée (174, 185, 186, 189, 190) en même temps qu'une synthèse protéique accrue (187), réduite (174) ou inchangée (185, 186). Certes, Katsanos et Mandarino (191) ont indiqué qu'à l'état basal, les cinétiques protéiques corps entier chez l'obèse seraient généralement plus faibles relativement à la masse corporelle de par l'adiposité conséquente, mais plus élevées en valeur absolue ou relativement à la masse maigre. Cette dernière conclusion est intéressante, puisque les études du muscle chez l'homme et l'animal décrites ci-dessous semblent indiquer le contraire. Ainsi, le muscle et les organes splanchniques, puisqu'ils semblent répondre différemment à l'insuline, gagneraient à être discriminés lors de telles études. Une étude chez des diabétiques de type 1 a montré que l'insuline décroît la synthèse protéique corps entier par un effet sur la région splanchnique, alors que la dégradation protéique était diminuée à la fois dans les zones splanchnique et périphérique lors de clamps hyperinsulinémiques euglycémiques (116). De façon tout aussi intéressante dans le contexte, la dégradation protéique corps entier chez l'obèse, mesurée par l'incorporation du  $^{13}\text{C}$  de la Leu dans l'acide

Tableau 4. Effets du diabète de type II et de l'obésité (5 dernières études sous les pointillés) sur les cinétiques protéiques.

Postabsorptif		Postprandial				Méthode	Sexe	Études
Corp entier		Corps entier		Muscle				
S	D	S	SS	ID	SS			
↑	↑						H	(192)
	=						F	(193)
=							H	(194)
=	=	=					H/F	(195)
	↑						H/F	(196)
=	=		=	=		Clamp hyper I et perf. AA	H/F	(197)
	=			=		Repas mixte	H/F	(14)
	=			=		Clamp hyper I et iso-AA	H	(198)
			↓ <sup>a</sup>	=		Clamp hyper I et iso-AA	H/F	(199)
			=	=	=	Boisson de glucides et protéines	H/F	(200)
=	=						F	(185)
↑	↑		↓	=		Clamp hyper I	F	(187)
↓	=	↓	=	↓	↓ <sup>d</sup>	Clamp hyper I et hyper AA	H	(174)
=	=		=	↓ <sup>b</sup>		Clamp hyper AA vs hyper I	H/F	(186)
	↑		↓ <sup>c</sup>			Clamp hyper I	F	(189)

**S**, synthèse protéique; **D**, dégradation protéique; **SS**, stimulation de la synthèse protéique; **ID**, inhibition de la dégradation protéique; **I**, insuline; **AA**, acides aminés; <sup>a</sup>, chez les hommes seulement; <sup>b</sup>, pour l'insuline seulement; <sup>c</sup>, pour l'obésité abdominale, mais pas gynoïde; <sup>d</sup>, dans la fraction mitochondriale seulement.

$\alpha$ -cétoisocaproïque, s'est avérée moins inhibée par l'insuline lors de l'obésité abdominale que de l'obésité gynoïde (189). Chez le diabétique de type II, la plupart des études relatent une absence d'effet sur les cinétiques protéiques corps entier, bien que deux études rapportent une protéolyse postabsorptive plus faible et qu'une autre étude montre une absence de stimulation de la synthèse protéique par l'insuline (Tableau 4).

Moins de données sont disponibles sur les cinétiques protéiques musculaires humaines. Chez des femmes obèses et insulino-résistantes, un bilan artériovoineux après 22 h de jeûne a démontré une synthèse protéique plus faible dans l'avant-bras et le tissu adipeux sous-cutané comparativement à celle de témoins sains (190). Une approche similaire a récemment démontré que synthèse et dégradation protéique musculaire sont plus faibles chez l'obèse et moins diminuées lors du jeûne (201). Utilisant cette fois l'incorporation de  $^{13}\text{C}$ -leucine dans les protéines de biopsies musculaires lors de clamps euglycémiques hyperinsulinémiques et isoaminoacidémiques, Guillet et al. (174) ont noté une synthèse protéique postabsorptive plus faible chez des hommes obèses insulino-résistants. De plus, cette synthèse protéique était seulement stimulée en postprandial chez les témoins sains et seulement dans la fraction mitochondriale du muscle. Chez des obèses âgés, des biopsies musculaires ont aussi révélé une synthèse protéique postabsorptive non affectée par la restriction énergétique (202), mais augmentée par 3 mois d'entraînement physique sans effet à l'état postprandial (203). Chez le diabétique de type II, le peu d'études disponibles n'ont pas relaté d'effet sur la synthèse protéique musculaire postprandiale et postabsorptive (Tableau 4). Le métabolisme protéique musculaire a certes été plus étudié chez l'animal obèse et insulino-résistant que chez l'homme.

Plus facilement contrôlables au niveau de l'exposition alimentaire et de la diversité génétique, les études chez l'animal ont pareillement montré des résultats conflictuels, mais ils confortent tout de même certaines hypothèses et amènent des pistes d'explication. De prime abord, que ce soit chez le rongeur, le porc ou le poulet, la

prédisposition génétique au gain de poids et d'adiposité est associée à une moindre efficacité d'accrétion musculaire des protéines alimentaires (183). Comme le métabolisme protéique splanchnique semble répondre différemment à l'insuline, la question se pose logiquement à savoir s'il répond de même différemment lors de sa résistance. Fillios et Saito ont effectivement démontré une synthèse protéique hépatique accrue chez le rat Zucker obèse (204). De plus, Reeds et al. (130) ont mesuré la synthèse protéique du muscle, du foie et de l'intestin chez des rats Zucker obèses 18 et 25 jours après la naissance et ces mesures confirment bien que le métabolisme protéique splanchnique et musculaire répondent différemment chez ce modèle monogénique. Plus précisément, alors que la synthèse protéique fractionnaire était plus faible à 18 et à 25 jours dans le muscle chez les rats Zucker obèses, la synthèse protéique absolue (ou aussi le % de protéines synthétisées par rapport au niveau corps entier) était réduite dans le muscle, mais élevée dans le foie et l'intestin. Dans l'ensemble, les résultats chez les modèles génétiques semblent donc assez équivoques sur le fait que l'accrétion protéique musculaire est réduite lors de la résistance à l'insuline et confirment que les organes splanchniques répondent différemment chez ces modèles.

Chez les modèles animaux d'exposition alimentaire, les résultats apparaissent plus contradictoires. Alors qu'un régime obésogène chez le rat Wistar a stimulé la synthèse protéique dans le muscle et le cœur ainsi que dans le foie et l'intestin (42), une absence d'effet a été montrée pour le muscle et le foie (205), et une synthèse protéique musculaire stimulée (206), diminuée (207) ou inchangée (208). Tel que précédemment mentionné, le temps d'exposition au régime lors des mesures est probablement responsable de ces disparités chez les modèles d'exposition alimentaire. En effet, il a récemment été démontré chez le rat soumis à un régime gras que le fort gain initial de tissu adipeux s'accompagne de surcroît d'un gain de masse musculaire, potentiellement pour soutenir cette adiposité importante, et que la synthèse protéique ainsi que la masse

musculaire ne diminuent que plus tard quand aussi s'accumulent les lipides intramusculaires (207). En outre, les substrats alimentaires inégalement présents dans le régime d'induction du syndrome métabolique vs le régime contrôle, peuvent différemment affecter le métabolisme protéique d'une façon potentiellement non liée au développement de la résistance à l'insuline. À titre d'exemple, des régimes de compositions variées ont été capables d'affecter la synthèse protéique intestinale chez le rat de façons différentes (209). Globalement, les études sur le muscle chez l'animal semblent tout de même appuyer les études humaines démontrant une plus faible stimulation postprandiale de la synthèse protéique lors du syndrome métabolique (Tableau 4).

Pour conclure, les modèles animaux d'obésité génétique indiquent une accréation protéique diminuée dans le muscle et accrue dans les organes splanchniques lors de la résistance à l'insuline, ce qui du moins pour le muscle conforte certaines études humaines. Les modèles animaux d'exposition alimentaire ont de leur côté engendré des résultats peu consensuels vraisemblablement liés au développement moins précoce du syndrome métabolique chez ces derniers. Le peu de connaissance des rôles joués par différents tissus et ces résultats peu consensuels rendent donc difficile la possibilité de faire un lien entre les cinétiques protéiques et les changements de concentrations d'AA en circulation lors du syndrome métabolique.

#### 1.2.4 Changement des concentrations d'acides aminés en circulation lors de la restriction énergétique chez la personne en surpoids ou obèse

Réduire l'apport énergétique est une stratégie ayant fait ses preuves pour réduire l'adiposité et améliorer l'état métabolique lors du surpoids. Chez le rat Zucker obèse, très utilisé comme modèle d'obésité génétique et de résistance à l'insuline, 24 h de jeûne réduisent les concentrations d'AA ramifiés en circulation (210). Bien que moins d'études chez l'Homme aient évalué les changements de ces concentrations dans le contexte de la perte de poids, leur diminution a été démontrée ainsi qu'un lien avec l'amélioration de la résistance à l'insuline et cela, que la perte de poids soit induite par l'alimentation ou la chirurgie bariatrique (211). Une étude récente se basant sur 2 essais cliniques de perte de poids induite par l'alimentation a indiqué une réduction des concentrations d'AA circulants et confirmé le lien avec l'amélioration de la résistance à l'insuline (Tableau 5)(31). Bien que la teneur en protéines du régime semblait influencer la concentration de certains AA durant de la perte de poids, les causes de cette réduction des concentrations sont peu définies, tout comme pour l'accumulation d'AA en circulation lors de l'obésité et de la résistance à l'insuline.

Devant ces multiples questions concernant le métabolisme des protéines et des AA lors du syndrome métabolique, la 2<sup>e</sup> partie de ce chapitre démontre pourquoi les variations naturelles d'abondances isotopiques du carbone et de l'azote sont informatives.

Tableau 5. Adapté de (31). Changement normalisé des concentrations d'acides aminés en circulation lors de 2 essais cliniques de perte de poids induite par l'alimentation (essais cliniques *POUND LOST* et *DIRECT*).

Acides aminés	Modèle combinant les 2 valeurs		6 mois		2 ans	
	$\beta \pm SE$	<i>P</i>	$\beta \pm SE$	<i>P</i>	$\beta \pm SE$	<i>P</i>
<i>POUNDS LOST</i>						
Alanine	0.04 ± 0.005	<10 <sup>-20</sup>	0.05 ± 0.01	6.2 × 10 <sup>-18</sup>	0.03 ± 0.01	2.0 × 10 <sup>-10</sup>
Tyrosine	0.04 ± 0.004	<10 <sup>-20</sup>	0.05 ± 0.01	8.0 × 10 <sup>-18</sup>	0.03 ± 0.01	5.8 × 10 <sup>-10</sup>
Proline	0.02 ± 0.004	2.0 × 10 <sup>-7</sup>	0.03 ± 0.01	2.9 × 10 <sup>-5</sup>	0.02 ± 0.01	2.5 × 10 <sup>-5</sup>
Leucine/isoleucine	0.02 ± 0.005	5.0 × 10 <sup>-7</sup>	0.03 ± 0.01	1.2 × 10 <sup>-8</sup>	0.02 ± 0.01	3.8 × 10 <sup>-3</sup>
Sarcosine	0.02 ± 0.005	9.8 × 10 <sup>-7</sup>	0.02 ± 0.01	5.8 × 10 <sup>-4</sup>	0.03 ± 0.01	4.8 × 10 <sup>-6</sup>
Valine	0.02 ± 0.005	6.2 × 10 <sup>-6</sup>	0.03 ± 0.01	3.3 × 10 <sup>-6</sup>	0.01 ± 0.01	0.02
Phénylalanine	0.02 ± 0.005	2.3 × 10 <sup>-5</sup>	0.03 ± 0.01	6.7 × 10 <sup>-7</sup>	0.01 ± 0.01	9.0 × 10 <sup>-3</sup>
Hydroxyproline	0.02 ± 0.004	6.1 × 10 <sup>-5</sup>	0.02 ± 0.01	4.7 × 10 <sup>-5</sup>	0.01 ± 0.01	9.1 × 10 <sup>-3</sup>
Méthionine	0.02 ± 0.005	3.8 × 10 <sup>-4</sup>	0.01 ± 0.01	0.02	0.02 ± 0.01	7.0 × 10 <sup>-3</sup>
<i>DIRECT</i>						
Alanine	0.05 ± 0.010	2.4 × 10 <sup>-6</sup>	0.07 ± 0.01	7.2 × 10 <sup>-6</sup>	0.02 ± 0.01	0.14
Tyrosine	0.04 ± 0.008	7.8 × 10 <sup>-8</sup>	0.05 ± 0.01	5.3 × 10 <sup>-6</sup>	0.03 ± 0.01	2.5 × 10 <sup>-3</sup>
Leucine/isoleucine	0.04 ± 0.010	1.4 × 10 <sup>-4</sup>	0.04 ± 0.01	5.5 × 10 <sup>-3</sup>	0.03 ± 0.01	0.02
Sarcosine	0.05 ± 0.012	7.4 × 10 <sup>-5</sup>	0.05 ± 0.01	1.1 × 10 <sup>-3</sup>	0.04 ± 0.01	7.8 × 10 <sup>-4</sup>
Phénylalanine	0.03 ± 0.008	3.7 × 10 <sup>-4</sup>	0.04 ± 0.01	2.0 × 10 <sup>-3</sup>	0.02 ± 0.01	0.03
Hydroxyproline	0.06 ± 0.014	7.1 × 10 <sup>-5</sup>	0.07 ± 0.02	2.3 × 10 <sup>-3</sup>	0.02 ± 0.02	0.15
Méthionine	0.05 ± 0.010	1.9 × 10 <sup>-3</sup>	0.05 ± 0.01	1.4 × 10 <sup>-4</sup>	0.002 ± 0.01	0.85

$\beta$  représente le changement standardisé du log de la concentration par kg de perte de poids corporel.

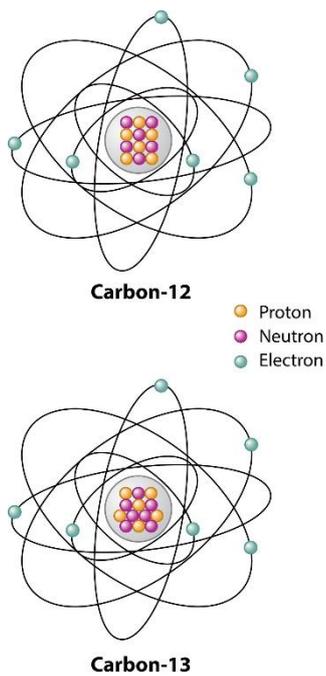




## Partie 2 : Les variations des abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote : de nouveaux biomarqueurs des régulations nutritionnelles et dérégulations physiopathologiques du métabolisme protéino-énergétique

Des composés artificiellement enrichis en  $^{13}\text{C}$  et en  $^{15}\text{N}$  sont largement utilisés en nutrition et physiologie pour estimer des flux métaboliques (cf section 1.1.6). Le  $^{13}\text{C}$  et le  $^{15}\text{N}$  sont toutefois naturellement présents dans l'organisme en faibles quantités susceptibles de varier selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques. En effet, bien que les abondances corporelles du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{15}\text{N}$  dépendent largement de l'alimentation, raison de leurs vastes utilisations en écologie pour la retracer, elles varient aussi selon les tissus et les organismes, et plus largement selon l'organisation du métabolisme du fait d'un fractionnement des isotopes dans les réactions métaboliques. Les mécanismes sous-jacents ne sont cependant que très peu explorés, mais ces variations naturelles de compositions isotopiques constituent un outil pouvant pallier certaines limites des traceurs artificiellement enrichis et permettant d'approcher les régulations métaboliques sous des angles nouveaux.

Dans cette partie, après avoir défini la notation classiquement utilisée et le phénomène de fractionnement isotopique, l'existence d'une divergence isotopique du carbone et de l'azote entre les individus et leur régime et entre les différents tissus sera démontrée. Il sera ensuite mis en évidence que ces abondances isotopiques peuvent varier lors de différentes conditions nutritionnelles ou physiopathologiques impliquant des réorganisations métaboliques et que ces variations isotopiques sont interprétables en ce sens par modélisation mécanistique.



Element	Stable isotopes	Abundance (%)*
Hydrogen	$^1\text{H}$ (H)	99.985
	$^2\text{H}$ (D)**	0.015
Carbon	$^{12}\text{C}$	98.892
	$^{13}\text{C}$	1.108
Nitrogen	$^{14}\text{N}$	99.635
	$^{15}\text{N}$	0.365
Oxygen	$^{16}\text{O}$	99.759
	$^{17}\text{O}$	0.037
	$^{18}\text{O}$	0.204
Sulfur	$^{32}\text{S}$	95.0
	$^{33}\text{S}$	0.75
	$^{34}\text{S}$	4.21
	$^{36}\text{S}$	0.014

\*Abundance does not always sum to 100% because radioisotopes are omitted from this table

\*\*D = deuterium,  $^2\text{H}$ : $^1\text{H}$  is often given as D:H

**R** O'Brien DM. 2015.  
Annu. Rev. Nutr. 35:565–94

Figure 12. Adapté de (212). Schéma représentant les protons, les neutrons et les électrons des 2 isotopes stables du carbone ( $^{12}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$ ) et abondance naturelle des isotopes stables de quelques éléments.

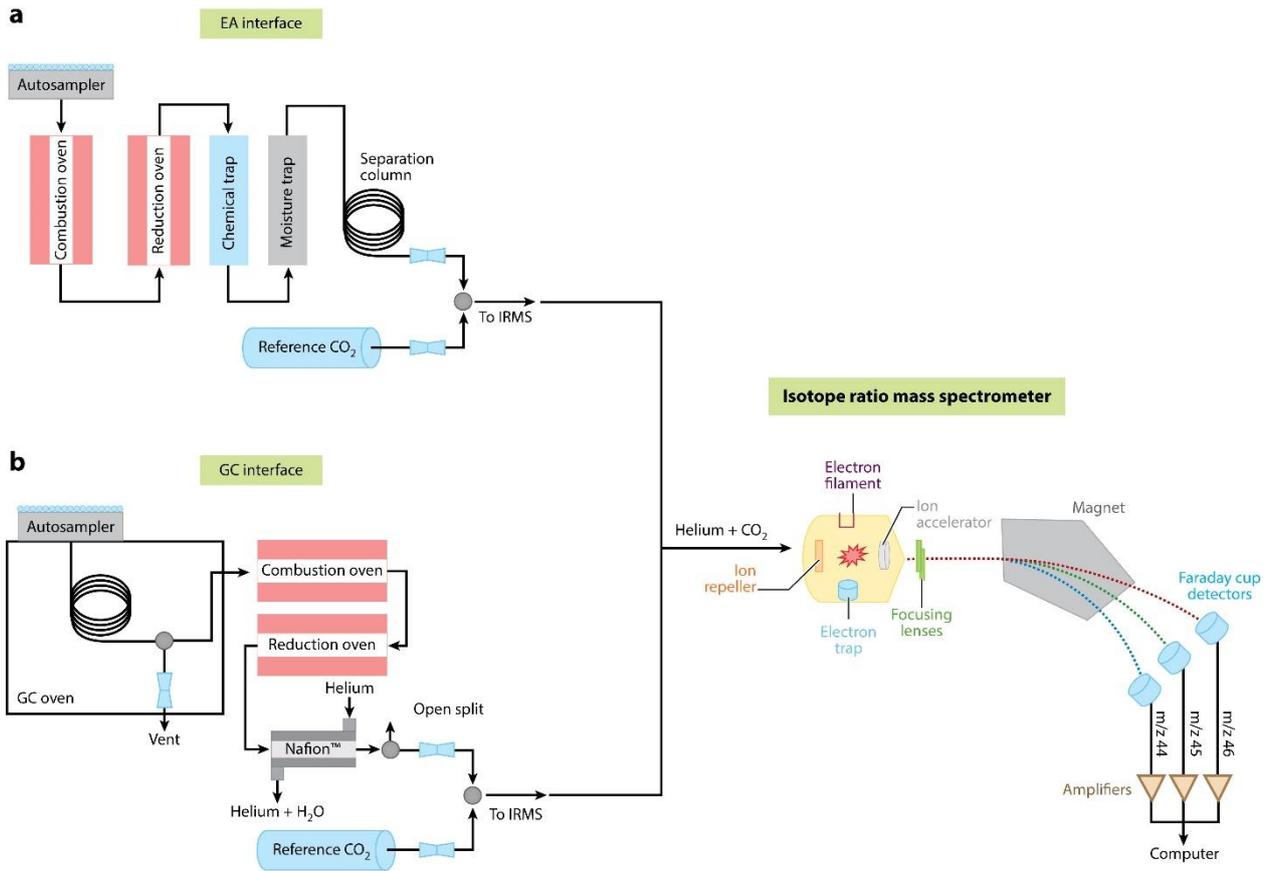
## 2.1 Nomenclature, méthodes de mesure et fractionnement isotopique

### 2.1.1 Définition et prévalence

Les éléments de la classification périodique se différencient par leur numéro atomique correspondant au nombre de protons présents dans le noyau. Pour un même élément, il peut exister plusieurs isotopes qui se différencient par le nombre de neutrons associés aux protons du noyau. Ainsi, dans le cas du carbone (6 protons), il existe naturellement 2 isotopes stables, le carbone 12 possédant 6 neutrons ( $^{12}\text{C}$ , l'isotope léger) et le carbone 13 possédant 7 neutrons ( $^{13}\text{C}$ , l'isotope lourd) (Figure 12). Pour l'azote (7 protons), il existe deux isotopes stables : l'azote 14 avec 7 neutrons ( $^{14}\text{N}$ , l'isotope léger) et l'azote 15 avec 8 neutrons ( $^{15}\text{N}$ , l'isotope lourd). Les isotopes lourds  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  sont naturellement moins abondants que les isotopes légers  $^{12}\text{C}$  et  $^{14}\text{N}$  qui représentent respectivement 98.9 et 99.6 % du carbone et de l'azote terrestre (Figure 12).

### 2.1.2 Nomenclature et méthodes de mesure

L'abondance des isotopes stables dans un composé est définie par le rapport entre l'isotope lourd et le léger ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  pour le carbone et  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  pour l'azote). Les isotopes légers étant très majoritaires, les différences de ratio isotopique pour le carbone ou l'azote ne sont détectables qu'au niveau des 3<sup>ème</sup> ou 4<sup>ème</sup> décimales, et on exprime le plus souvent les abondances isotopiques naturelles d'un échantillon sous la forme d'un enrichissement isotopique ( $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$ ), défini comme la différence relative de teneur en isotope lourd par rapport à un standard de référence, exprimé en pour mille (‰) :



O'Brien DM. 2015.  
 Annu. Rev. Nutr. 35:565–94

Figure 13. Adapté de (212). Schéma de la spectrométrie de masse à ratio isotopique couplée à un analyseur élémentaire (a) ou de la chromatographie gazeuse (b)(cf annexe III).

$$\delta^{15}N = \frac{\left(\frac{^{15}N}{^{14}N}\right)_{\text{échantillon}} - \left(\frac{^{15}N}{^{14}N}\right)_{\text{standard}}}{\left(\frac{^{15}N}{^{14}N}\right)_{\text{standard}}} \times 10^3$$

$$\delta^{13}C = \frac{\left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{\text{échantillon}} - \left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{\text{standard}}}{\left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{\text{standard}}} \times 10^3$$

Dans le cas de l'azote, le standard est l' $N_2$  atmosphérique. La teneur en  $^{15}N$  des échantillons biologiques étant supérieure à celle de l' $N_2$  atmosphérique, les valeurs de  $\delta^{15}N$  de ces échantillons sont positives. Pour le carbone, le standard de référence est un rostre fossile de bélemnite (Vienna Pee Dee Belemnite) dont la teneur en  $^{13}C$  est supérieure à celle des échantillons biologiques contemporains. Pour cette raison, les valeurs de  $\delta^{13}C$  des échantillons biologiques sont négatives.  $\delta^{15}N$  et  $\delta^{13}C$  sont classiquement mesurés par spectrométrie de masse à ratio isotopique (Figure 13) tel que décrit plus en détail à l'annexe III.

### 2.1.3 Effets et fractionnement isotopiques associés au métabolisme protéino-énergétique

Du fait de leur différence de masse, les différents isotopes du carbone et de l'azote peuvent subir un fractionnement au cours de réactions biochimiques. Ce fractionnement fait référence à l'accumulation préférentielle d'un isotope d'un côté de la réaction et à l'accumulation de l'autre ou des autres isotopes de l'autre côté. L'origine de ce fractionnement tient à la différence des forces des liaisons chimiques impliquant les isotopes légers ou lourds. Les isotopes lourds ont des fréquences de vibration plus faibles que les isotopes légers dans les liaisons chimiques et de ce fait une plus grande énergie

est nécessaire pour constituer ou rompre une liaison avec un isotope lourd. Les (légères) différences de vitesse de réaction entre les isotopes légers et lourds sont appelées **effets isotopiques**. Pour une réaction réversible ou bidirectionnelle, l'effet isotopique est dit d'équilibre. Dans le cas d'une réaction unidirectionnelle, l'effet isotopique est dit cinétique. Dans une réaction réversible à l'équilibre, l'isotope lourd aura tendance à se concentrer dans la molécule lui offrant la liaison la plus forte alors que l'isotope léger est généralement concentré dans le produit lors d'une réaction unidirectionnelle (213). L'effet isotopique d'une réaction réversible peut donc varier et être plutôt cinétique lorsqu'un des côtés de la réaction est favorisé et être différent et même de sens opposé lorsque la réaction tend vers l'équilibre. La dissolution du CO<sub>2</sub> en bicarbonate est un exemple qui, lorsque la réaction tend vers l'équilibre, favorise l'accumulation de l'isotope lourd (<sup>13</sup>C) dans le produit. De façon cinétique, la transamination via l'aspartate aminotransférase favorise l'utilisation de l'azote léger (<sup>14</sup>N)(214) et c'est la même chose au niveau du carbone pour la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA par le complexe pyruvate déshydrogénase qui préférera le <sup>12</sup>C (215). Ces exemples démontrent des effets isotopiques cinétiques sur des réactions biochimiques classiques du métabolisme des glucides, des lipides et des AA.

Globalement, les réactions dans les organismes vivants sont unidirectionnelles ou irréversibles, bien que certaines réactions dans les réseaux métaboliques soient réversibles, dans le sens où de la matière est absorbée par les organismes et différents produits in fine excrétés. Ceci donne donc lieu dans l'ensemble à des effets isotopiques cinétiques caractérisés par les paramètres  $\alpha$  et  $\varepsilon$  qui sont fonction des compositions isotopiques d'un substrat ( $\delta_s$ ) et de son produit ( $\delta_p$ ):

$$\alpha = \frac{(\delta_s + 10^3)}{(\delta_p + 10^3)}$$

$$\varepsilon = (\alpha - 1)10^3$$

Le tableau 6 démontre des exemples d'effets isotopiques mesurés d'une part lors de réactions métaboliques spécifiques et d'autre part lors de l'assimilation de composés inorganiques par des producteurs primaires. Il y est démontré que les réactions métaboliques ont globalement des effets isotopiques cinétiques favorisant l'utilisation des isotopes légers. C'est le cas notamment pour des réactions impliquées dans le métabolisme du carbone tel l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase, et la fixation du CO<sub>2</sub> par la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco). L'assimilation de CO<sub>2</sub> par les plantes photosynthétiques se fait d'ailleurs via la Rubisco qui est responsable de la déplétion en <sup>13</sup>C lors de la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique (<sup>13</sup>C CO<sub>2</sub> atmosphérique = -7 ‰). Les plantes utilisant directement cette enzyme sont dites en C<sub>3</sub> puisque les produits de la réaction contiennent 3 carbones. Les plantes en C<sub>4</sub> quant à elles fixent le CO<sub>2</sub> dissout en bicarbonate via la phosphoénolpyruvate carboxylase qui a un effet isotopique cinétique plus petit que l'effet isotopique d'équilibre inverse de la dissolution du CO<sub>2</sub>. L'oxaloacétate formée de cette façon alimente la Rubisco et est donc plus riche en <sup>13</sup>C (Tableau 6). Ces différents effets isotopiques du carbone sont importants pour comprendre la variabilité isotopique dans l'alimentation décrite à la section suivante ainsi que les différences de δ<sup>13</sup>C entre les glucides, les lipides et les protéines dans les organismes.

Tableau 6. Effets isotopiques mesurés lors de réactions spécifiques isolées ou globalement lors de l'assimilation de composés inorganiques.

	$\epsilon$ (‰)	Études
<b>Réactions spécifiques</b>		
	Azote	
Aspartate aminotransférase	-1,7 à -8,2	(216)
Glutamine synthétase	-8 à -12,5	(216)
Glutamate déshydrogénase	-9,8 à -18	(216)
Alanine déshydrogénase	12,4 à -12,4	(216)
Carbamyl-phosphate synthétase	-15,7 à -21,7	(217)
Peptidyltransférase	-10 à -14	(218, 219)
Hydrolyse de liaisons peptidiques	-2,5 à -10	(220, 221)
	Carbone	
Pyruvate déshydrogénase	-3,1 à -25,4	(215)
Rubisco	-22 à -30	(222)
Phosphoénolpyruvate carboxylase	-2	(222)
<b>Assimilation de composés inorganiques</b>		
	Azote	
$\text{NO}_3^-$	0 à -24	(223)
$\text{NH}_4^-$	0 à -27	(223)
$\text{N}_2$	1 à -3	(223)
	Carbone	
$\text{CO}_2$ (photosynthèse en $\text{C}_3$ )	-10 à -22	(222)
$\text{CO}_2$ (photosynthèse en $\text{C}_4$ )	-2 à -15	(222)

Rubisco; ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase.

Concernant l'azote, des réactions comme le transfert d'un groupement amine par l'aspartate aminotransférase, ou d'un  $\text{NH}_4^+$  par la glutamine synthétase, la glutamate déshydrogénase et la carbamylphosphate synthétase ont aussi été sujettes à des effets isotopiques *in vitro*. Dans ce contexte, l'assimilation de formes inorganiques ( $\text{N}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) par les organismes autotrophes est justement réalisée sous forme de  $\text{NH}_4^+$  par la glutamate déshydrogénase et la glutamine synthétase suivant la réduction des  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NH}_3$  par des réductases et du  $\text{N}_2$  par la nitrogénase (223). L'effet isotopique global mesuré indique ainsi une déplétion en  $^{15}\text{N}$  dans les producteurs primaires comparativement à la matière organique qu'ils utilisent (Tableau 6). De plus, bien que des effets isotopiques aient été observés lors de la formation de liens peptidiques (Tableau 6), la liaison des AA aux ARNt n'implique pas leur azote et une fois cette étape franchie, les AA sont de façon irréversible destinés à la synthèse protéique. Or, un effet isotopique lors de la synthèse protéique serait peu probable selon Schoeller (224). Poupin et al. (225) ont cependant identifié par modélisation un fractionnement isotopique favorisant l'accumulation de  $^{15}\text{N}$  dans les protéines lors du renouvellement protéique ce qui est en accord avec des calculs *ab initio* d'un effet isotopique inverse de la peptidyl transférase (226). Concernant la protéolyse, un effet isotopique a aussi été associé à l'hydrolyse de liaisons peptidiques *in vitro* (Tableau 6). Il faut cependant aussi, pour qu'un effet isotopique se manifeste dans une protéine lors de sa dégradation, que celle-ci ne puisse être que partiellement dégradée, demeurer fonctionnelle et faire partie du pool protéique. Ceci est d'ailleurs vrai pour n'importe quelle réaction : un effet isotopique ne résultera en un fractionnement isotopique que si la réaction est incomplète.

Ainsi, *in vivo*, l'apport constant de substrats par l'alimentation permet la manifestation d'effets isotopiques. Cependant, les réactions s'enchaînent et s'intriquent en réseaux desquels elles sont souvent indissociables. Les réactions et leurs effets isotopiques

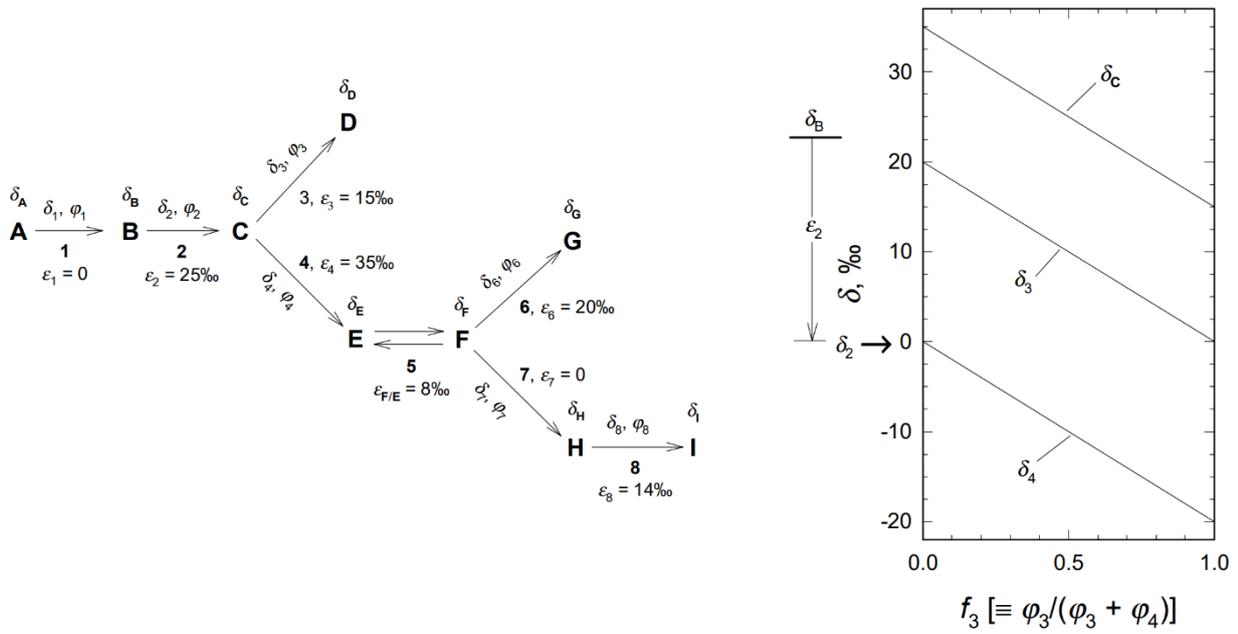


Figure 14. Adapté de (222). Réseau métabolique théorique et composition isotopique à l'état stationnaire d'un précurseur et de ses flux d'utilisation au niveau d'un embranchement métabolique. Les compartiments sont représentés par des lettres et les réactions par des chiffres.  $\delta$ ; composition isotopique,  $\varepsilon$ ; effet isotopique,  $\varphi$ ; flux.

sont donc souvent étudiés de façon agrégée. Le modèle général permettant l'interprétation des effets isotopiques est décrit plus en détail à l'annexe II. De tels principes, ont permis le développement d'un modèle multitissu et multicompartiment d'interprétation de modulations nutritionnelles ou physiopathologiques des flux complexes de l'azote en fonction des variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires (225). Ce modèle s'appuie sur les travaux théoriques de Hayes (222) démontrant notamment que les compositions isotopiques de substrats et de produits formés par des voies métaboliques concurrentes dépendent de l'importance relative des flux de formation de chacun des produits. La figure 14 schématise ce raisonnement en démontrant que les compositions isotopiques d'un substrat C et de deux produits D et E formés par des voies concurrentes dépendent, à l'état stationnaire, de la proportion relative de C transférée dans chacune des voies et des effets isotopiques sur celles-ci. Ce raisonnement permet de lier les proportions d'AA tissulaires destinées à la synthèse protéique versus à l'oxydation aux variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des AA, des protéines et de l'urée (225)(cf section 2.4.2).

Les effets isotopiques dans les réactions biochimiques (Tableau 6) sont à l'origine des différences de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  entre les organismes et leurs régimes alimentaires – appelé **saut trophique** –, et des différences de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  observées entre les aliments d'origine variée (aliments d'origine marine vs terrestre, plantes en  $\text{C}_3$  vs  $\text{C}_4$ , légumineuses vs céréales, etc.). La section qui suit décrit ces variations de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  dans différents organismes ; premièrement dans un contexte où ils influent sur la composition isotopique d'autres organismes en faisant partie de leur alimentation. Deuxièmement, les variations intertissulaires de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  résultant de différences métaboliques entre les tissus sont décrites. Puis, les divergences isotopiques entre différents composés au sein des tissus sont abordées avec un accent sur les AA.

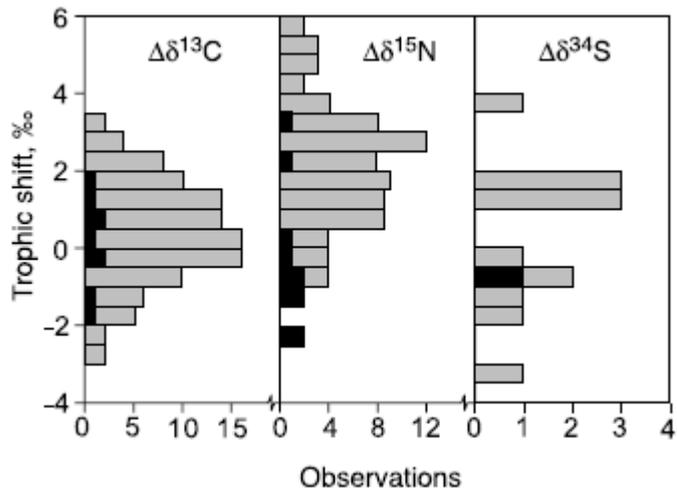


Figure 15. Adapté de (227). Distribution des  $\Delta^{15}\text{N}$  et de  $\Delta^{13}\text{C}$  de différentes espèces.

## 2.2 Variabilité des abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote dans les organismes et les aliments

### 2.2.1 Existence d'une discrimination isotopique entre les individus et leur régime

Chez l'animal, de nombreuses études ont démontré l'existence d'une différence de composition isotopique entre les tissus d'un individu et les constituants de son régime.

Cette différence, appelée discrimination isotopique, est  $\Delta$  :

$$\Delta = \delta_{\text{individu ou tissu}} - \delta_{\text{régime}}$$

Elle résulte d'effets isotopiques lors de l'assimilation et l'utilisation métabolique du carbone et de l'azote. La figure 15 démontre une synthèse de la distribution de valeurs de  $\Delta^{15}\text{N}$  et de  $\Delta^{13}\text{C}$  de différentes espèces et la figure 16 démontre des valeurs moyennes pour différentes classes taxonomiques. On constate qu'en moyenne  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$  sont positifs et que  $\Delta^{15}\text{N}$  est plus élevé que  $\Delta^{13}\text{C}$  (2,8 vs 0,8 ‰, (228)). Au sein d'un organisme, les variations de  $\Delta$  restent faibles comparativement à la variabilité isotopique entre les organismes et existant ainsi dans l'alimentation.

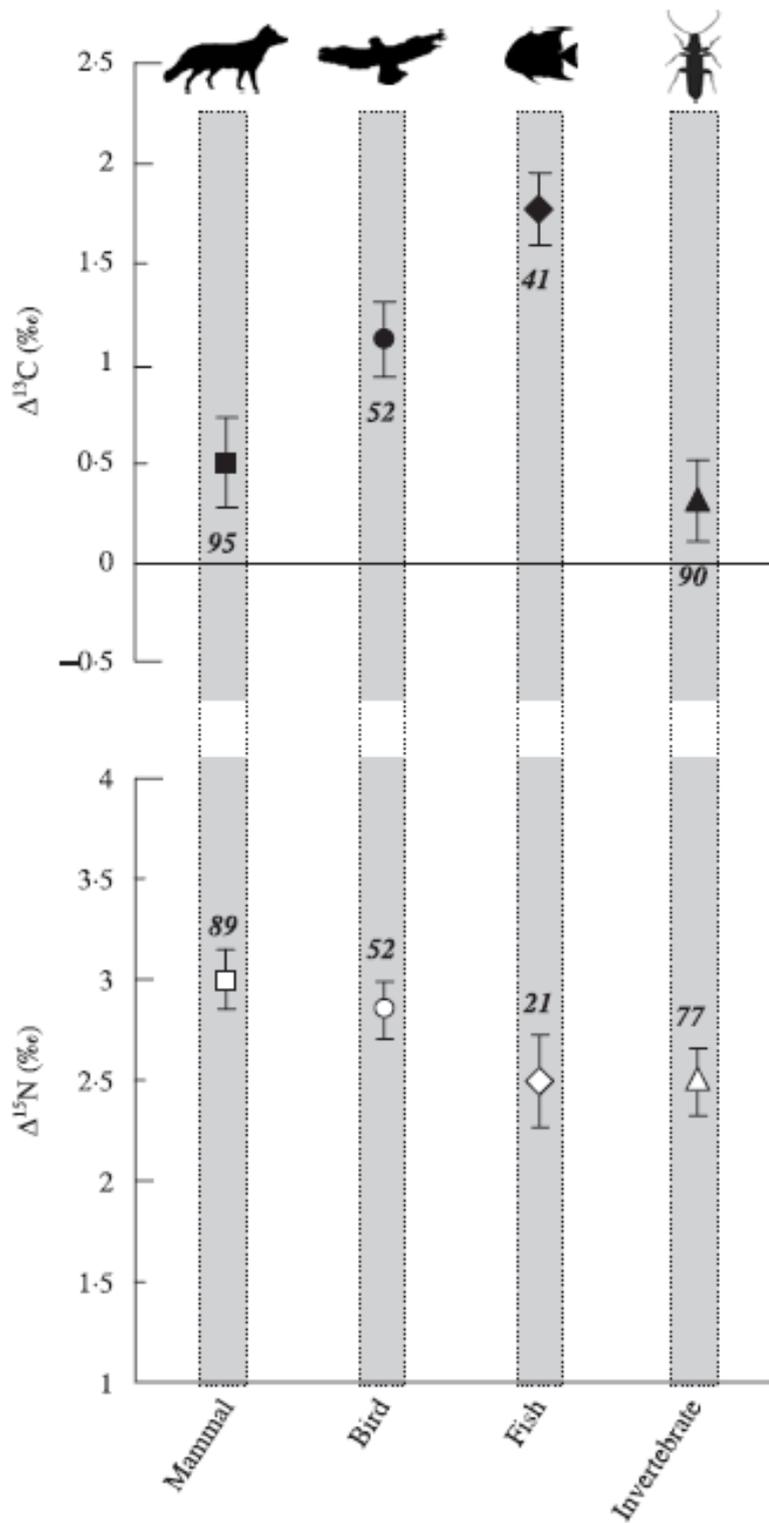


Figure 16. Adapté de (228).  $\Delta^{15}\text{N}$  et de  $\Delta^{13}\text{C}$  moyens de différentes classes taxinomiques.

Le nombre d'individus par classe est indiqué.

Figure 17. Adapté de (212). Évolution du  $\delta^{15}\text{N}$  dans une chaîne alimentaire marine.

Tableau 7. Adapté de (229).  $\delta^{15}\text{N}$  de différentes sources alimentaires humaines.

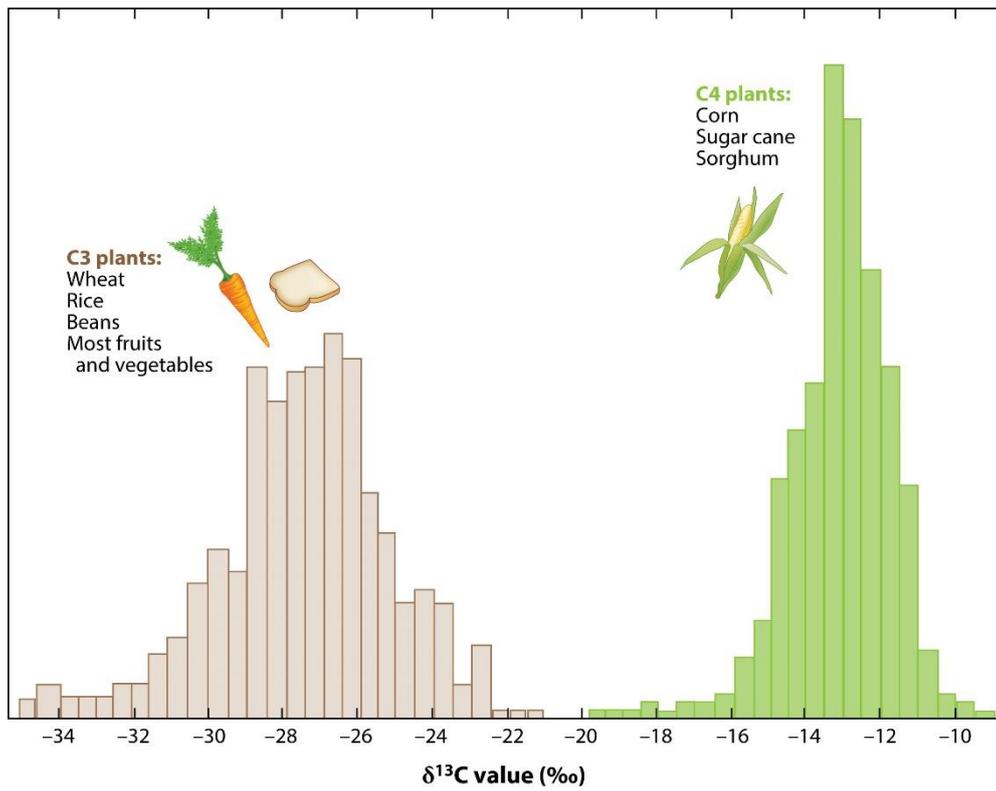
<b>Catégories</b>	<b><math>\delta^{15}\text{N}</math></b>
Végétaux	
Céréales C <sub>3</sub>	3.16
Céréales C <sub>4</sub>	3.34
Légumes	3.13
Légumineuses	1.1
Pommes de terre	3.13
Riz	5.01
Fruits	4.55
Noix	2.8
Cacao	5.72
Levure	1.23
Viande et produits animaux	
Porc	4.52
Poulet	2.83
Boeuf	6.62
Agneau	5.7
Lait et produits laitiers	5.26
Oeufs de poule	5.11
Poissons et fruits de mer	
Poissons	12.39
Fruits de mer	10.41
Pieuvres	12.37

### 2.2.2 Rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans les organismes et les aliments : Fixation de l'azote et réseau trophique

Les effets isotopiques associés à l'utilisation de l'azote du milieu (Tableau 6) ainsi que l'origine de cet azote influencent le  $\delta^{15}\text{N}$  des plantes et des aliments que cet azote compose. Le tableau 7 présente des  $\delta^{15}\text{N}$  mesurés dans différentes sources alimentaires humaines. Les plantes fixant l' $\text{N}_2$  atmosphérique ont des  $\delta^{15}\text{N}$  faibles, proches de 0 ‰ alors que les plantes ne pouvant pas le faire ou le faisant peu ont des  $\delta^{15}\text{N}$  généralement plus élevés et variables selon l'origine des amendements azotés utilisés pour leur production (229, 230). Ainsi, les légumineuses ont un faible  $\delta^{15}\text{N}$  dû à la fixation l' $\text{N}_2$  atmosphérique via une symbiose bactérienne, alors que l'agriculture biologique engendre un  $\delta^{15}\text{N}$  plus élevé, puisque l'engrais utilisé provient de sources animales ou végétales déjà enrichies en  $^{15}\text{N}$  par rapport à la matière inorganique autrement utilisée. Le  $\delta^{15}\text{N}$  plus élevé chez les ruminants comparativement au porc et à la volaille met plutôt l'accent sur une potentielle contribution du métabolisme des bactéries impliquées dans leur digestion (231, 232).

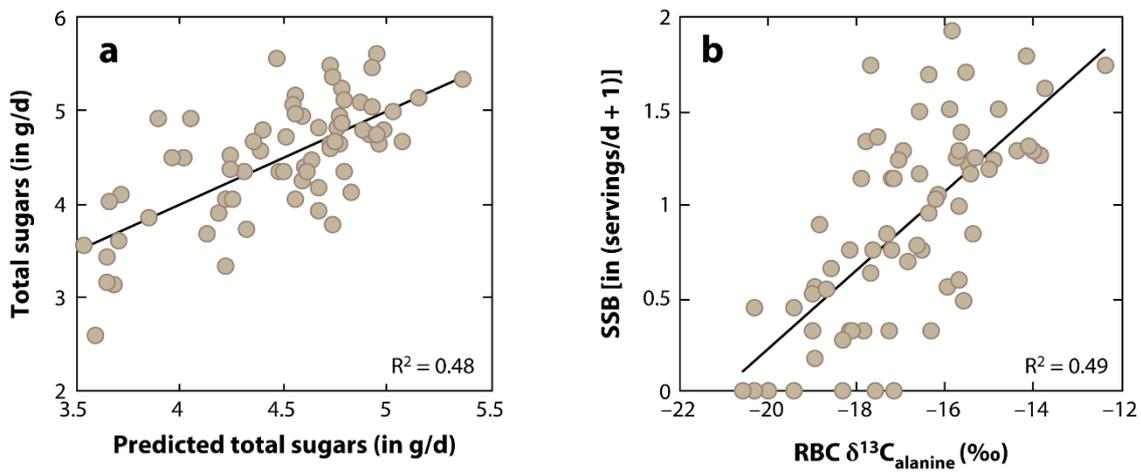
L'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  chez les animaux, comparativement aux plantes qu'ils consomment (Tableau 7), est aussi globalement observé au sein des réseaux trophiques ou des chaînes alimentaires, où chaque niveau est enrichi de 3-4 ‰ par rapport au précédent (Figure 17). Ainsi donc, les herbivores terrestres sont enrichis de 3-4 ‰ par rapport aux plantes qu'ils consomment et les carnivores de même par rapport à leur alimentation. Cette relation a largement été utilisée en écologie pour la reconstruction des réseaux trophiques et pour l'étude des régimes alimentaires des populations. Chez les poissons, l'enrichissement est plus variable et peut être plus élevé du fait de la longueur des chaînes alimentaires, dans lesquelles même de bas niveaux de la chaîne consomment du zooplancton. Beaucoup de poissons de l'alimentation humaine sont carnivores et de la sorte ont des  $\delta^{15}\text{N}$  élevés (Tableau 7). Cet enrichissement en  $^{15}\text{N}$  chez les animaux par

rapport à leur régime ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) résulte d'effets isotopiques lors du métabolisme des protéines et des AA favorisant l'excrétion du  $^{14}\text{N}$  de l'organisme via l'urée et le  $\text{NH}_4^+$  (225, 233). Chez l'homme, cet enrichissement le long des chaînes alimentaires s'est reflété dans la mesure d'un  $\delta^{15}\text{N}$  des cheveux plus faible de 3,7 ‰ chez des végétariens comparativement à des omnivores (234). Une forte corrélation positive entre le  $\delta^{15}\text{N}$  des globules rouges et leurs concentrations en acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque, marqueurs de la consommation de poissons, a aussi été démontrée (235). De plus, la consommation de viande ou de protéines animales a été positivement associée au  $\delta^{15}\text{N}$  des cheveux (236). Dans une autre étude, la consommation de viande et de poissons a été positivement associée au  $\delta^{15}\text{N}$  de l'urine et des excréments (237). Enfin, une étude chez 1178 participants a démontré des associations positives entre le  $\delta^{15}\text{N}$  du sérum et la consommation de poissons, de produits laitiers, de viande et de protéines animales (238).



**AR** O'Brien DM. 2015.  
Annu. Rev. Nutr. 35:565–94

Figure 18. Adapté de (212). Distribution du  $\delta^{13}\text{C}$  chez les plantes en  $\text{C}_3$  et en  $\text{C}_4$ .



**A** O'Brien DM. 2015.  
**R** Annu. Rev. Nutr. 35:565–94

Figure 19. Adapté de (212). Relation entre la consommation de sucre réelle et prédite en se basant sur le  $\delta^{15}\text{N}$  et le  $\delta^{13}\text{C}$  des globules rouges (a) et relation entre le  $\delta^{13}\text{C}$  de l'alanine dans les globules rouges et la consommation de boissons sucrées (SSB) (b) chez des adultes Yupiks vivant dans le sud-ouest de l'Alaska.

### 2.2.3 Rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dans les organismes et les aliments : Fixation du carbone et alimentation

Le  $\delta^{13}\text{C}$  est plus haut dans les plantes en  $\text{C}_4$  qu'en  $\text{C}_3$  (Figure 18) de par la fixation du  $\text{CO}_2$  via des mécanismes aux différents effets isotopiques globaux (Tableau 6). Le  $\delta^{13}\text{C}$  plus élevé dans l'air expiré des Américains comparativement aux Européens s'explique dans ce contexte par un apport plus important de produits issus de plantes en  $\text{C}_4$  (239). Aussi, l'introduction jadis de la culture du maïs, une plante en  $\text{C}_4$ , par les Amérindiens se traduit par une augmentation très nette du  $\delta^{13}\text{C}$  du collagène récupéré sur leurs ossements (230). Une application plus récente consiste à détecter dans un prélèvement biologique la consommation de boissons sucrées ou de sucre ajouté (240). Ceci est possible lorsque le sucre utilisé provient de la canne à sucre et que l'amidon alimentaire provient majoritairement de plantes en  $\text{C}_3$  puisque le sucre de canne, contrairement au sucre de betterave, est synthétisé par la photosynthèse en  $\text{C}_4$  ce qui le rend isotopiquement distinct. À titre d'illustration, la figure 19 présente la relation entre le  $\delta^{13}\text{C}$  de l'Ala des globules rouges et l'apport en boissons sucrées de Yupiks du sud-ouest de l'Alaska. Comme le démontre cette signature du sucre alimentaire dans un acide aminé, il y a des mélanges isotopiques lors des biosynthèses. Pour cette raison et à cause d'effets isotopiques lors de leur métabolisme, le  $\delta^{13}\text{C}$  ne varie pas seulement entre les glucides de différentes origines, mais aussi entre les glucides, les lipides et les AA d'un même organisme. L'effet isotopique de la pyruvate déshydrogénase est fortement responsable du plus faible  $\delta^{13}\text{C}$  dans les acides gras nouvellement synthétisés à partir de l'acétyl-CoA que dans les sucres ou les AA précurseurs du pyruvate (Tableau 6)(215, 241). Les lipides alimentaires ont donc un plus faible  $\delta^{13}\text{C}$  que les glucides et les protéines. Le  $\delta^{13}\text{C}$  des acides gras peut d'ailleurs, entre autres, être informatif sur l'authenticité des huiles commercialisées pour l'alimentation (242).

Chez les hétérotrophes, le  $\delta^{13}\text{C}$  des sources alimentaires, glucides, lipides et AA, ainsi que les flux métaboliques dans l'organisme, peuvent donc influencer le  $\delta^{13}\text{C}$  des produits nouvellement synthétisés. Dans ce contexte, des exemples de valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  de différents aliments de l'alimentation humaine se retrouvent dans le tableau 8 (239, 243, 244). Pour un aliment donné, les  $\delta^{13}\text{C}$  des différents macronutriments le composant ainsi que leurs proportions respectives dictent le  $\delta^{13}\text{C}$  total selon le principe de conservation de la masse ( $\delta^{13}\text{C}_{\text{aliment}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{lipides}} \times L + \delta^{13}\text{C}_{\text{glucides}} \times G + \delta^{13}\text{C}_{\text{protéines}} \times P$ , où L, G et P sont les proportions des macronutriments au carbone dans l'aliment). En plus de refléter la consommation de sucre (Figure 19), le  $\delta^{13}\text{C}$  a été associé à la consommation de certains autres produits. Par exemple, le  $\delta^{13}\text{C}$  du sérum chez les 1178 participants de l'étude EPIC-Norfolk a été associé à la consommation de poissons (238). Dans une autre étude, le  $\delta^{13}\text{C}$  de l'urine et des excréments a été associé à la consommation de viande et de poissons (237). Le  $\delta^{13}\text{C}$  du sérum a aussi été associé à la consommation de protéines et de gras d'origine animale (245) alors que le  $\delta^{13}\text{C}$  des globules rouges a été associé à la consommation de poissons, de mammifères marins et de viande dans une autre étude (246).

Tableau 8. Adapté de (244).  $\delta^{13}\text{C}$  de différentes sources alimentaires humaines.

<b>Aliments</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math></b>
Boeuf	-29,27
Poulet	-26,78
Thon	-17,42
Truite	-21,96
Brocoli	-27,9
Concombre	-37,31
Pain	-27,81
Riz	-27,71
Fèves	-27,29
Sucre de cane	-12,10
Sucre de betterave	-27,00
Pomme	-26,84
Banane	-26,55
Cheddar	-30,38
Lait	-29,38
Beurre	-29,76
Huile d'olive	-29,59

En conclusion, cette section démontre que le  $\delta^{15}\text{N}$  varie entre les sources alimentaires (Tableau 7) en raison (i) de : différents mécanismes fixant l'azote inorganique, (ii) de l'origine de l'azote fixée par les plantes ou ingérée par les animaux, et (iii) de la longueur des chaînes trophiques chez les animaux où chaque niveau est enrichi de 3-4‰ par rapport au précédent. Le  $\delta^{13}\text{C}$  alimentaire semble pouvoir être plus variable que le  $\delta^{15}\text{N}$  (Tableau 7 et 8). Ce  $\delta^{13}\text{C}$  varie entre les aliments selon leur composition en macronutriments et l'origine de ceux-ci puisqu'une grande variabilité de  $\delta^{13}\text{C}$  est présente dans les glucides alimentaires du fait de différents mécanismes fixant le  $\text{CO}_2$  chez les plantes. Également, la synthèse de lipides *de novo* résulte en leur déplétion en  $^{13}\text{C}$  dans les sources alimentaires et les organismes. Cette variabilité de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  se reflète à terme dans les tissus des consommateurs en fonction de leurs choix alimentaires. Les  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  ne varient cependant pas seulement entre les aliments et entre les organismes ou les individus, mais aussi entre différents tissus au sein des organismes, tel que présenté dans la section qui suit.

## 2.3 Variabilité des abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote entre les tissus et au sein des tissus

### 2.3.1 Variations intertissulaires des rapports $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

Dans une méta-analyse, Caut et al. (228) ont rassemblé 268 valeurs de  $\Delta^{15}\text{N}$  et 290 valeurs de  $\Delta^{13}\text{C}$  issues de multiples espèces. Le  $\Delta^{15}\text{N}$  moyen était de 2,8 ‰ et le  $\Delta^{13}\text{C}$  de 0,8 ‰, des valeurs divergeant en moyenne des études précédentes de 0,7 ‰ pour le  $\Delta^{15}\text{N}$  et d'environ 0,4 ‰ pour le  $\Delta^{13}\text{C}$  (227, 247-251). Leur modèle statistique combinant toutes les classes taxinomiques étudiées a démontré un effet significatif du tissu sur les  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$ . Dans cette thèse, seulement les variations intertissulaires chez les rongeurs sont considérées lorsque possible puisqu'il s'agit du modèle utilisé.

Concernant l'azote, notons d'abord que les protéines et leurs AA représentent la très vaste majorité de l'azote tissulaire. Le  $\delta^{15}\text{N}$  diffère peu s'il est mesuré sur l'ensemble d'un tissu ou sur des protéines ayant été extraites indiquant que le  $\delta^{15}\text{N}$  d'un tissu représente essentiellement le  $\delta^{15}\text{N}$  de ses protéines. Les variations intertissulaires de  $\Delta^{15}\text{N}$  ayant été mesurées chez des rongeurs ont notamment été synthétisées dans (225). Les points suivants sont notables dans la littérature :

- 1- Le cerveau et le cœur ont tendance à avoir des  $\Delta^{15}\text{N}$  élevés (252-256).
- 2- Le plasma a tendance à avoir un  $\Delta^{15}\text{N}$  plus élevé que le foie et les autres tissus (252, 254, 257).
- 3- Le foie a tendance à avoir un  $\Delta^{15}\text{N}$  plus élevé que le muscle (255, 258, 259).
- 4- L'intestin semble avoir un faible  $\Delta^{15}\text{N}$  (225, 260).

Étant donné les différences de  $\Delta^{15}\text{N}$  entre les AA, notamment chez le rat (259, 261), mais aussi en général dans les organismes (Figure 21), le  $\Delta^{15}\text{N}$  d'un tissu dépend de 2 facteurs : sa composition en AA et les effets isotopiques lors de leur métabolisme.

La composition en AA résulte de la composition en protéines des tissus et donc de leur fonction. Celle-ci diffère effectivement avec des exemples notables de protéines grandement exprimées dans certains tissus comme l'actine et la myosine du muscle, l'hémoglobine des érythrocytes et les mucines de l'intestin. L'effet de la composition en protéines et en AA sur le  $\Delta^{15}\text{N}$  est cependant probablement faible puisque : **(i)** beaucoup d'AA échangent leur azote via des pools communs (Figure 3) et de façon intertissulaire, **(ii)** les tissus sont composés de nombreuses protéines aux diverses compositions en AA (224) et **(iii)** le  $\delta^{15}\text{N}$  d'un même AA varie entre les tissus (259). Ceci suggère ainsi l'influence des effets isotopiques démontrés *in vitro* lors du transfert de l'azote des AA (216, 262) dans ces variations intertissulaires de  $\Delta^{15}\text{N}$  et le potentiel de leur interprétation mécanistique via les principes et les équations présentés à la section 2.1.3. Au-delà des poils qui sont essentiellement composés d'une protéine, la kératine, l'interprétation des  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$  de matrices facilement accessibles que sont l'urine et les fèces, doit se faire avec précaution, puisque celles-ci ont des compositions macromoléculaires différentes des tissus. Les études ont généralement rapporté une déplétion en  $^{15}\text{N}$  par rapport au régime dans l'urine et plutôt un enrichissement en  $^{15}\text{N}$  dans les fèces (Tableau 9). L'azote urinaire est très majoritairement sous forme d'urée (75 à 95% chez le rat (85-88)) alors que les bactéries représenteraient 25 à 54% de la masse sèche fécale totale selon certaines estimations (98) (cf section 1.1.4). Les fèces contiennent aussi des nutriments non absorbés et des composés endogènes sécrétés dans le tube digestif.

Tableau 9.  $\Delta^{13}\text{C}$  et  $\Delta^{15}\text{N}$  de différents tissus mesurés lors d'études chez le rongeur. L'étendue (min à max) des valeurs engendrées souvent par différents régimes est indiquée.

Tissus	$\Delta^{13}\text{C}$	$\Delta^{15}\text{N}$	Études
Sang	-3,2 à 5,58	2,7 à 3,51	(256, 263, 264)
Sérum	0,6 à 2,6	3,2 à 3,9	(265)
Érythrocytes	0,5 à 2,7	1,7 à 3,2	(265)
Foie	-3,2 à 4,8	1,1 à 4,8	(256, 263, 264) (258, 265)
Muscle	-5,1 à 3	1,4 à 4,6	(256, 258, 263, 265)
Coeur	-2,3 à 1,0	3,8 à 4,4	(256)
Reins	0,8 à 2,6	1,9 à 3,4	(265)
Cerveau	-0,7 à 2,2	5,2 à 6,1	(256)
Tissu adipeux	-5,9 à -1,7	nd	(256)
Contenu gastrique	-0,7 à 0,4	1,1 à 1,9	(266)
Fèces	-5,9 à 0,2	1,2 à 2,3	(260, 266, 267)
Urine	nd	-2,9 à -0,9	(260)
Poils	-1,5 à 6,5	1,7 à 7,1	(258, 263-266)
Collagène*	4,7 à 7,6	2,4 à 5,1	(266)

\*D'autres valeurs de  $\Delta^{13}\text{C}$  du collagène chez le rat et la souris peuvent être retrouvées dans (268).

En ce qui concerne le carbone, l'interprétation des variations intertissulaires de  $\Delta^{13}\text{C}$  dans la littérature est largement différente de celles du  $\Delta^{15}\text{N}$ . Les raisons sont que le carbone compose essentiellement toutes les macromolécules tissulaires et que les lipides ne sont pas toujours extraits des tissus avant la mesure de leur  $\delta^{13}\text{C}$ . Dans ce cas de figure où les lipides sont extraits du tissu, le  $\Delta^{13}\text{C}$  représente majoritairement les protéines et dépendra de l'utilisation respective des macronutriments pour le renouvellement des AA (cf section 2.4.3). Autrement, si les lipides ne sont pas extraits, le  $\Delta^{13}\text{C}$  mesuré sera de surcroît affecté par la teneur en lipides du tissu. Le tableau 9 synthétise les résultats de différentes études ayant mesuré les  $\Delta^{13}\text{C}$  et  $\Delta^{15}\text{N}$  de nombreux tissus chez le rongeur. La comparaison pour un tissu donné de valeurs issues d'études où les lipides n'ont pas été extraits (258, 263, 264) à celles des autres études les ayant extraits, ne permet pas de voir d'effet évident de la présence des lipides tissulaires sur le  $\Delta^{13}\text{C}$ . Caut et al. (228) sont arrivés à la même conclusion dans leur méta-analyse réunissant de nombreuses espèces. L'effet de l'extraction des lipides sur un même prélèvement est cependant obligatoire selon le principe de conservation de la masse puisque lipides et protéines diffèrent en  $\delta^{13}\text{C}$ . L'absence d'effet apparent entre les études indique conséquemment qu'un ou d'autres facteurs influencent généralement plus le  $\delta^{13}\text{C}$  des tissus que leur teneur en lipides. La section 2.4.3 est dédiée à l'interprétation du  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires.

En revanche, cette faible variabilité de  $\Delta^{13}\text{C}$  et de  $\Delta^{15}\text{N}$  dans les tissus de rongeurs soumis à différents régimes (Tableau 9) et entre des espèces métaboliquement distinctes (Figures 15 et 16) relativement aux différences isotopiques entre les aliments présentés à la section précédente (Tableaux 7 et 8), suggère que la composition isotopique du régime peut avoir plus d'impact sur la composition isotopique des tissus que le métabolisme (chez les hétérotrophes). Une approche quantitative serait par contre nécessaire pour valider cette hypothèse. Ensuite, au-delà de ces variations isotopiques entre les tissus, et entre les glucides, les lipides et les protéines au sein des tissus, les AA qui composent les

protéines diffèrent aussi entre eux dans leur composition isotopique. Ce phénomène est abordé dans la section qui suit.

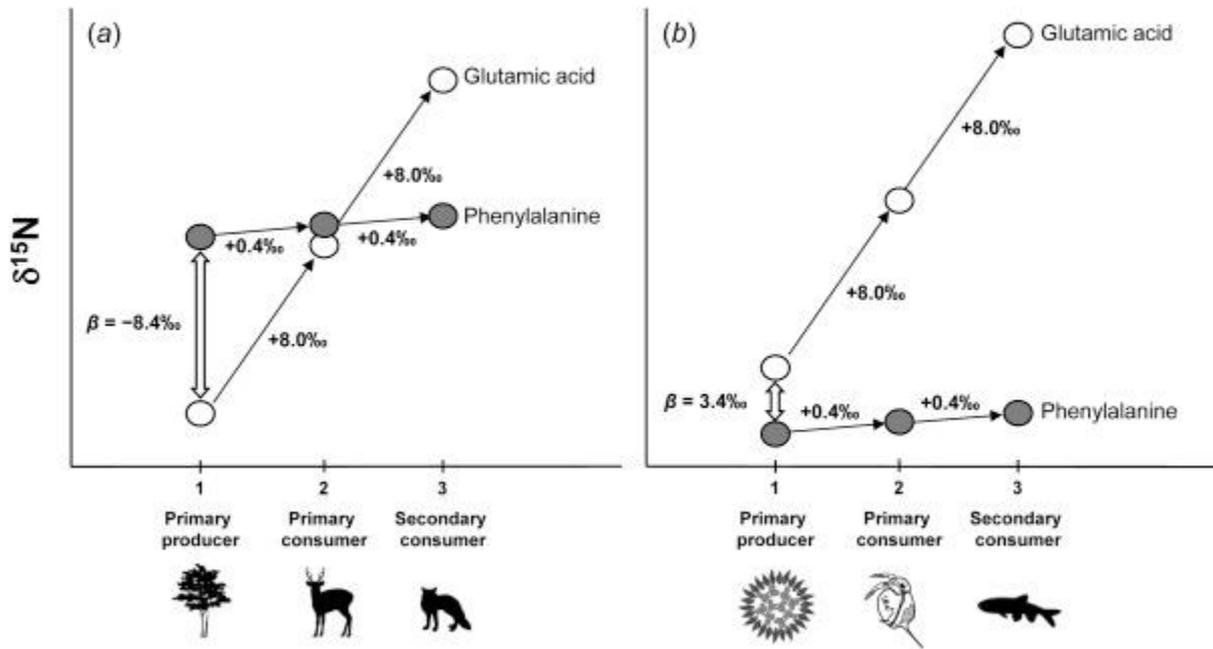


Figure 20. Adapté de (269). Enrichissement en  $^{15}\text{N}$  dans des chaînes alimentaires pour un acide aminé non-transaminant, la phénylalanine, et un acide aminé transaminant, l'acide glutamique.

### 2.3.2 Variations intratissulaires des rapports $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ dans les acides aminés

En raison d'effets isotopiques et de mécanismes précédemment présentés, les  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  diffèrent entre les AA composants les tissus. Chez les animaux, les AA sont classés en tant qu'indispensables et non indispensables selon que leur squelette carboné peut être synthétisé ou non par l'organisme (Figure 4). En ce qui concerne l'azote, les AA sont plutôt dits transaminants ou non-transaminants selon leur capacité d'échanger un  $\text{NH}_2$  (Figure 5).

Les AA transaminants ont un  $\Delta^{15}\text{N}$  plus élevé que les non-transaminants du fait de l'effet isotopique lors de la réaction. En d'autres mots, ces AA transaminants s'enrichissent en  $^{15}\text{N}$  dans les tissus, lorsque le  $^{14}\text{N}$  en est davantage éliminé par voie de transamination ou déamination. La figure 20 schématise l'expression du phénomène au niveau du saut trophique. Elle démontre que l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  entre des niveaux d'une chaîne alimentaire est presque absent pour la Phe, un AA non-transaminant, et au contraire, est important pour la Glu, un AA transaminant. Au sein d'un tissu, les variations de compositions isotopiques entre les AA dépendent du métabolisme du tissu et donc de son équipement enzymatique tel que démontré chez des microorganismes au métabolisme divers (270). Les  $\Delta^{15}\text{N}$  moyens des AA issus de multiples études sur des espèces aux métabolismes divers sont présentés en première analyse puisque peu d'études permettent de comparer le  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA au sein d'un même tissu et de l'influence des conditions expérimentales, notamment de la composition du régime. L'objectif est de tirer des conclusions générales sur le fractionnement isotopique de l'azote des AA.

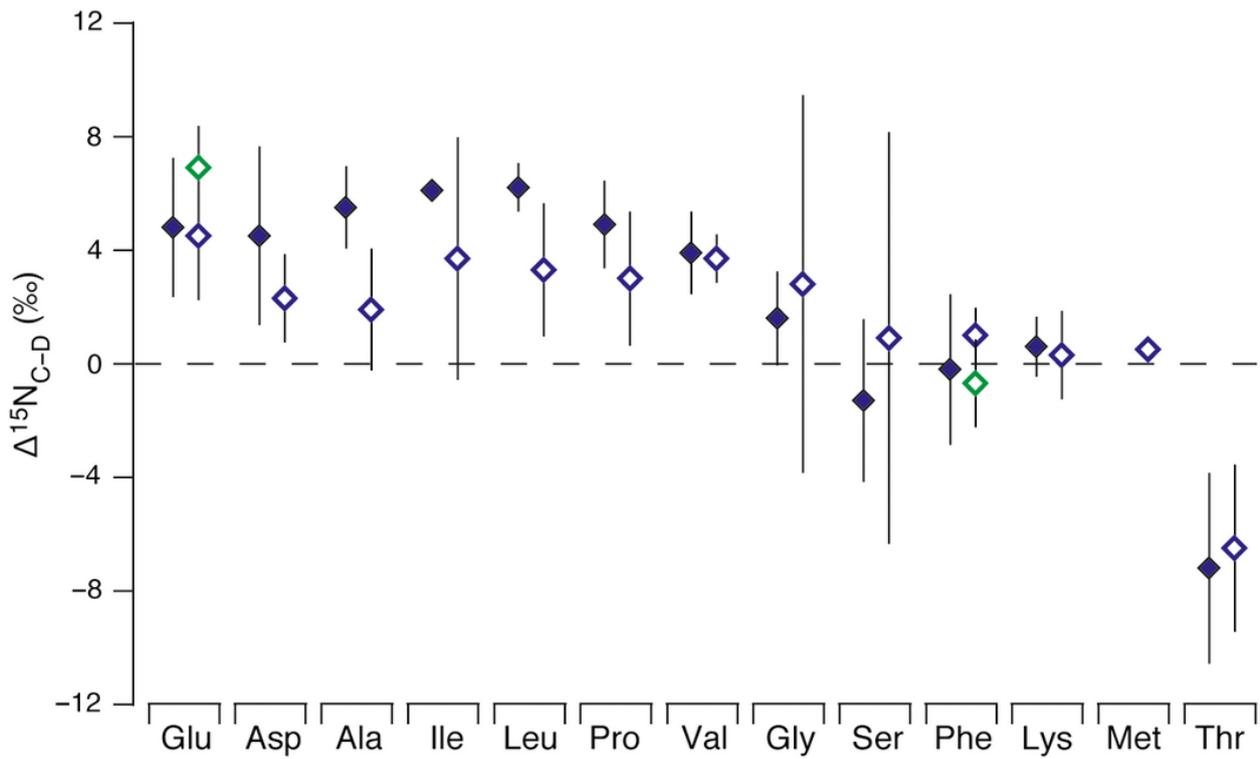


Figure 21. Adapté de (80).  $\Delta^{15}N$  de différents acides aminés lors d'études contrôlées chez plusieurs espèces de consommateurs tertiaires classées en tant qu'aquatique (losanges bleus) ou terrestre (losanges verts) et de la production d'ammoniac (losanges pleins) et d'urée ou d'acide urique (losanges vides).

Dans une méta-analyse du  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA chez 70 espèces, McMahon et al. (80) rapportent que la Glu, carrefour des transaminations (Figure 5), a le  $\Delta^{15}\text{N}$  moyen le plus élevé de tous les AA ( $6,4 \pm 2,4 \text{ ‰}$ ) (Figure 21). Plusieurs AA démontrent une importante variabilité de  $\Delta^{15}\text{N}$  entre ces études chez plusieurs espèces, particulièrement la Gly et la Ser. Cette variabilité de  $\Delta^{15}\text{N}$  suggère que le fractionnement isotopique de l'azote des AA peut varier de façon importante selon l'organisation des réactions métaboliques dans le système ou le tissu étudié. La figure 21 démontre aussi le faible  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA non-transaminant et une constante et importante déplétion en  $^{15}\text{N}$  par rapport au régime dans la Thr. Un effet isotopique d'équilibre de la thréonine ammonia-lyase (ou thréonine désaminase et thréonine déshydratase cytosolique) favorisant l'accumulation de  $^{15}\text{N}$  dans le produit a été proposé comme responsable de cette déplétion en  $^{15}\text{N}$  dans cet acide aminé non-transaminant (261, 271). Des résultats récents chez le rat démontrant une plus grande déplétion en  $^{15}\text{N}$  dans la Thr après un régime hyperprotéique supportent cette hypothèse, puisque le catabolisme par la thréonine ammonia-lyase augmente avec l'apport protéique (261). Cependant, une étude *in vitro*, toute aussi récente, rapporte un effet isotopique cinétique normal pour la thréonine ammonia-lyase (272), en contradiction avec l'hypothèse précédente. Une hypothèse alternative expliquant la déplétion en  $^{15}\text{N}$  de la Thr est une contribution de la Thr synthétisée par le microbiote à la Thr de l'organisme. En effet, le microbiote assimile par transamination de l'ammoniac/urée plus appauvrie en  $^{15}\text{N}$  et l'assimilation préférentielle du  $^{14}\text{N}$  a d'ores et déjà bien été documentée chez des microorganismes (Tableau 6). Des études supplémentaires sont ainsi nécessaires pour élucider le rôle du microbiote dans le  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA corporels des organismes.

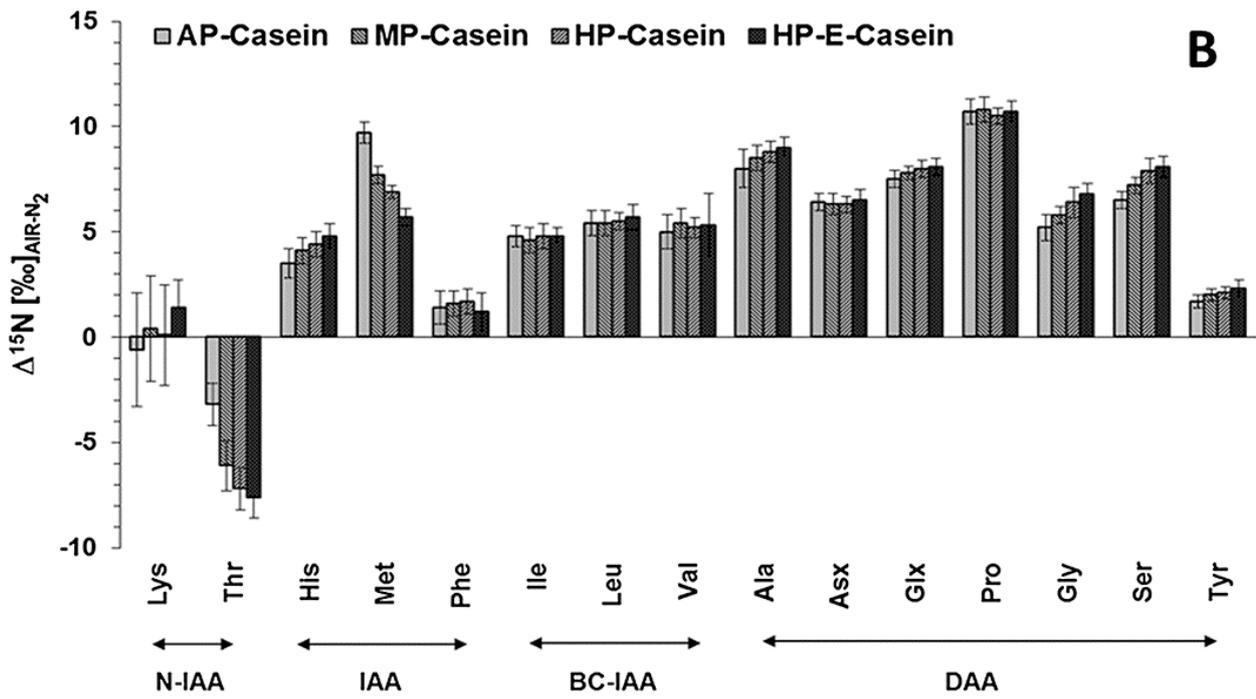


Figure 22. Adapté de (261).  $\Delta^{15}\text{N}$  d'acides aminés dans les protéines plasmatiques de rats soumis à différents niveaux d'apport protéique. **AP**, niveau adéquat (13,8%); **MP**, niveau moyen (25,7%); **HP**, niveau élevé (51,3%); **HP-E**, niveau élevé sans vitamine E.

En contraste avec la méta-analyse de McMahon et al. (80) combinant plusieurs espèces, dans l'étude de Fuller et Petzke sur des protéines plasmatiques de rats (261), la Pro était l'acide aminé au  $\Delta^{15}\text{N}$  le plus haut (Figure 22). Ce résultat a été retrouvé dans des cheveux humains (234, 273-275) et dans le foie du rat, mais pas dans ses muscles (259). Ceci indique, conformément aux différences métaboliques entre ceux-ci, l'existence d'une variabilité de l'ordre des  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA entre les tissus et les espèces.

Dans l'étude de Fuller et Petzke (261), le  $\Delta^{15}\text{N}$  de la Ser, de la Gly, de l'His, de l'Ala, de la Glu et de la Tyr, inversement au  $\Delta^{15}\text{N}$  de la Thr, augmentait avec l'apport protéique. La Ser et la Gly, après la Thr étaient les plus sensibles à l'apport protéique. Par contre, le  $\Delta^{15}\text{N}$  de la Val, de la Leu, de l'Ile, de l'Asp, de la Pro, de la Phe et de la Lys n'a pas changé significativement avec l'apport protéique. Dans ce contexte, l'absence d'effet de l'apport protéique sur le  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA ramifiés s'explique peut-être par le fait que les protéines plasmatiques étudiées proviennent majoritairement du foie, un tissu possiblement moins sensible à des changements de l'oxydation des AA ramifiés que le muscle. Beaucoup de questions demeurent par ailleurs quant à l'explication des changements de  $\Delta^{15}\text{N}$  des AA. Dans leur ensemble, les résultats présentés ici démontrent que le  $\Delta^{15}\text{N}$  globalement varie entre les AA. Il varie aussi pour un même AA entre différents tissus ou différentes espèces et en fonction de l'apport protéique pour certains AA.

En ce qui a trait au  $\Delta^{13}\text{C}$ , les AA doivent être considérés en tant que non indispensables ou indispensables selon que leur squelette carboné peut être synthétisé ou non. Lors d'une synthèse, le  $\delta^{13}\text{C}$  des AA produits signe le  $\delta^{13}\text{C}$  des nutriments utilisés comme substrats (cf l'équation de la section 2.4.3)(268). Selon des estimations sur le collagène décrites plus en détail à la section 2.4.3, dans des conditions normales d'apport protéique, environ 75% du carbone des AA tissulaires proviendrait des AA alimentaires alors que le 25% restant serait issu des glucides et des lipides suivant une synthèse *de novo* (268). Les voies de synthèse de ces AA non indispensables qui permettent au carbone de ces nutriments de se retrouver dans les AA tissulaires sont ainsi décrites ci-après.

Alors que le carbone de l'Ala provient du pyruvate, il peut provenir de multiples sources pour la Ser, la Gly et la Cys, puisque Ser et Gly sont interconverties via une hydroxyméthyltransférase, que la Ser fournit le carbone de la Cys et que la Gly a plusieurs origines potentielles (276). En effet, bien que l'intermédiaire de la glycolyse 3-phosphoglycérate sert à la production de la Ser, la Thr via la thréonine déhydrogénase forme de la Gly, la choline peut former de la Gly durant sa dégradation; de plus, la forme hydroxylée de la Pro après la synthèse de glyoxilate, peut former de la Gly et du pyruvate (277). La contribution de la Thr à la synthèse de Gly pourrait par ailleurs augmenter en parallèle avec l'apport protéique (278). Chez les mammifères, la Tyr provient de la Phe alimentaire via la phénylalanine hydroxylase. De plus, l'incorporation de carbone du glucose dans la Thr a été démontrée sur des lignées cellulaires de mammifères suggérant une voie de synthèse, mais ce résultat nécessite une confirmation (279).

L'Asp est directement synthétisée à partir de l'oxaloacétate et la Glu à partir de l' $\alpha$ -kétoglutarate, 2 intermédiaires du cycle de l'acide citrique. Contrairement aux intermédiaires de la glycolyse qui proviennent du glucose et de ses sources de carbone via la néoglucogenèse, les intermédiaires du cycle de l'acide citrique puisent aussi leur

carbone du glucose, mais le puisent plus directement des lipides et des AA via leur catabolisme (Figure 5). L'aspartate aminotransférase transfère un  $\text{NH}_2$  de la Glu synthétisant de l'Asp et de l' $\alpha$ -kétoglutarate. Un transfert d'azote similaire a d'ailleurs lieu lors de la synthèse de l'Ala et tel qu'indiqué à la figure 3, la Glu est impliquée dans une multitude de réactions de transamination. La Gln est formée par l'ajout d'un  $\text{NH}_2$  à la Glu par la glutamine synthétase. L'Asn est formée par l'asparagine synthétase via l'ajout à l'Asp d'un  $\text{NH}_2$  provenant de la Gln ce qui résulte en la synthèse concomitante de Glu. De plus, la Glu sert à la synthèse de l'Arg et de la Pro. Ainsi, la possibilité de former de la Gly avec la forme hydroxylée de la Pro démontre un lien, au-delà de la néoglucogénèse, entre le carbone du cycle de l'acide citrique et les AA qui sont plus reconnus comme étant issus d'intermédiaires de la glycolyse. Ces différents flux de carbone formant les AA non indispensables influent en retour sur leur composition isotopique selon la contribution des différents substrats et de leur  $\delta^{13}\text{C}$  respectif (cf section 2.4.3). Cependant, très peu d'études à ce jour ont évalué de telles modulations potentielles des flux de carbone vers la synthèse d'AA.

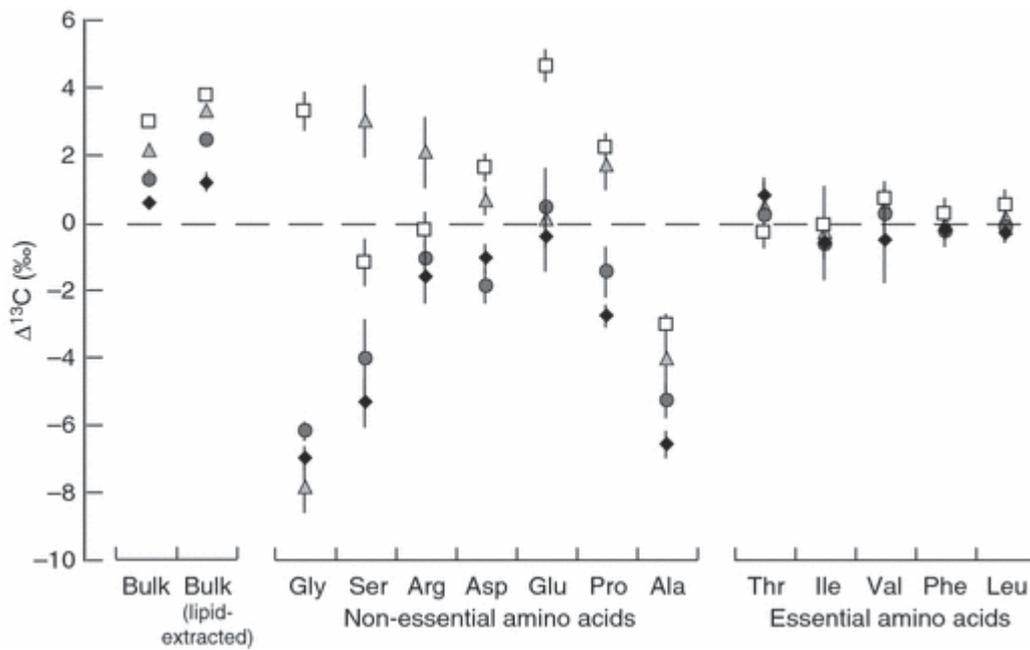


Figure 23. Adapté de (280).  $\Delta^{13}\text{C}$  d'acides aminés musculaires chez des poissons soumis à des régimes de compositions diverses (protéines de diverses qualités en différentes quantités et avec différents ratios glucides/lipides). **Bulk**, valeur pour l'ensemble du tissu avec et sans extraction des lipides.

La figure 23 présente les variations de  $\Delta^{13}\text{C}$  d'AA musculaires de poissons exposés à des régimes de différentes compositions. Il y est démontré que les AA indispensables ont une signature isotopique similaire dans le tissu et dans le régime alors que les AA non indispensables en diffèrent isotopiquement. Des résultats qui vont dans le même sens ont été obtenus chez le cochon, le rat, le crabe et le papillon (271, 281-284). Le  $\Delta^{13}\text{C}$  des AA non indispensables a aussi démontré beaucoup plus de variabilité que celui des AA indispensables suivant des changements de la composition du régime, observation faite aussi chez le rat (285). Dans cette étude chez le poisson, le  $\Delta^{13}\text{C}$  de la Ser et de la Gly était le plus sensible à la composition du régime ce qui pourrait s'expliquer par leurs multiples sources potentielles de carbone (3-phosphoglycérate, Thr, choline, Pro) tel que détaillé plus haut. L'interprétation de telles variations de  $\Delta^{13}\text{C}$  dans les AA et les protéines et l'interprétation des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  sont abordées ultérieurement.

## 2.4 Variations d'abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques

Nous avons vu précédemment en quoi les différences de  $\delta^{15}\text{N}$  entre les tissus (Tableau 9) et entre les AA les composants (Figure 21) reflètent la diversité tissulaire de métabolisme azoté de par un fractionnement isotopique dans les réactions métaboliques (cf section 2.3.1). Sous cette prémisse que la diversité métabolique impacte le  $\delta^{15}\text{N}$ , les modulations métaboliques lors de conditions nutritionnelles ou physiopathologiques sont aussi susceptibles d'avoir un impact. Des méta-analyses ont certes mis en évidence des liens entre la qualité et la nature du régime, l'apport en azote, le statut nutritionnel et le  $\Delta^{15}\text{N}$  (228, 249, 251). Toutefois, peu d'études en conditions contrôlées chez des mammifères permettent de quantifier et d'expliquer ces variations isotopiques. Alors que l'étendue de valeurs de  $\Delta^{15}\text{N}$  observées dans le tableau 9 lorsque différents régimes ont été administrés suggère d'emblée un effet des modulations métaboliques induites par l'alimentation, nombre d'études ont au moins clairement démontré que l'adéquation de l'apport protéique et certaines conditions physiopathologiques se répercutent sur le  $\Delta^{15}\text{N}$ . De plus, bien que moins exploré, le  $\delta^{13}\text{C}$  est aussi susceptible de varier selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques. La présente section met en évidence cette variabilité isotopique.

#### 2.4.1 La qualité de l'apport protéique influe sur le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

L'adéquation entre le profil en AA des protéines alimentaires et les besoins en AA indispensables influent sur le  $\Delta^{15}\text{N}$ . L'étude de Poupin et al. (286) l'a clairement démontré : 2 groupes de rats mangeaient soit un régime contenant des protéines de lait ou un régime isoénergétique et isoprotéique contenant des protéines de soya comblant moins bien les besoins en AA indispensables. En effet, après 3 semaines, la composition corporelle et la croissance étaient similaires dans les 2 groupes alors que le  $\Delta^{15}\text{N}$  était plus élevé dans les protéines du plasma, du foie, de l'estomac, des reins et du colon chez les rats ingérant les protéines de soya. Ces résultats sont venus conforter, indépendamment de la quantité de protéines ingérées et d'effets sur la croissance, des observations précédentes d'une augmentation du  $\Delta^{15}\text{N}$  lorsque l'adéquation du profil en AA de l'alimentation diminue (249, 259, 260). Les AA utilisés pour le renouvellement protéique seraient ainsi vraisemblablement issus d'un pool plus sujet au transfert d'azote et à ses effets isotopiques lors d'une alimentation avec des protéines de moins bonne qualité.

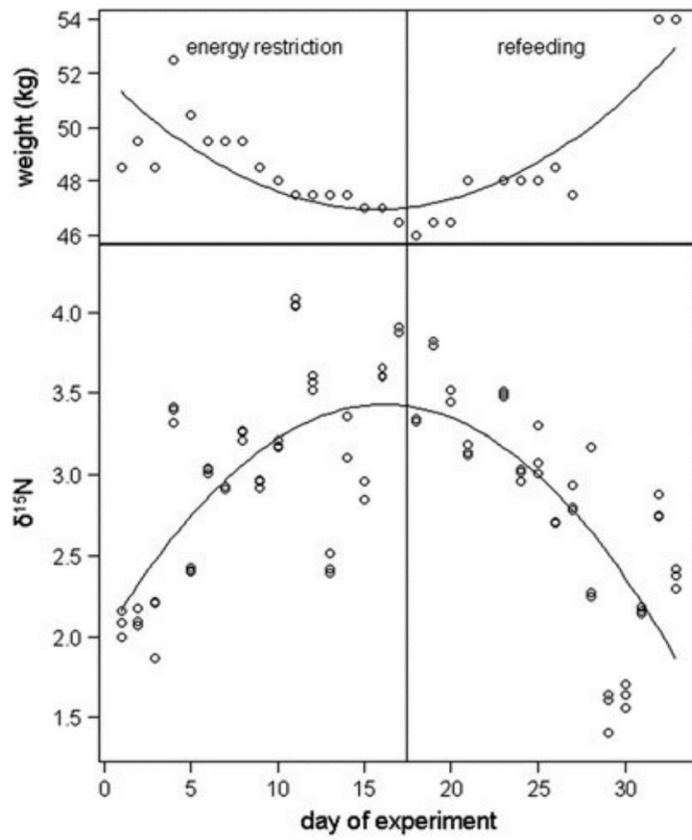


Figure 24. Adapté de (287). Variations du poids et du  $\delta^{15}\text{N}$  de l'urine chez un mâle Bonobo en restriction protéino-énergétique et progressivement renourri.

#### 2.4.2 L'apport protéino-énergétique influe sur le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

L'absence d'apport protéique ou sa restriction engendre un bilan négatif en AA alors qu'un apport surpassant les besoins stimule leur oxydation totale (184). Une plus grande proportion d'AA est susceptible, dans ces deux cas, mais pour des raisons différentes, d'être transaminée et d'ainsi subir un fractionnement isotopique. Ce postulat est appuyé par l'étude de Deschner (287) montrant une baisse du  $\delta^{15}\text{N}$  urinaire chez des singes progressivement renourris après une restriction puis une élévation du  $\delta^{15}\text{N}$  quand l'apport finit par surpasser les besoins (Figure 24). Aussi, plusieurs autres études ont démontré des scénarios similaires dans des situations isolées de restriction ou d'augmentation de l'apport protéino-énergétique (254, 287-294).

Bien que globalement le  $\Delta^{15}\text{N}$  semble augmenter lors de la restriction protéino-énergétique, certaines études ont démontré des effets non systémiques, soit dans certains tissus seulement ou surtout dans les excréta. L'une des premières études montrant une augmentation du  $\delta^{15}\text{N}$  lors d'une insuffisance de l'apport alimentaire a été effectuée chez l'oiseau : Hobson et al. (288) ont démontré un  $\delta^{15}\text{N}$  s'accroissant dans le muscle et le foie d'oies en jeûne et de cailles en restriction alimentaire (Figure 25). Un  $\delta^{15}\text{N}$  élevé dans le plasma et les globules rouges a aussi été observé chez des manchots ayant perdu 28% de leur masse corporelle après 25 jours de jeûne (289). Par contre, des résultats contrastés ont été obtenus chez l'écureuil en hibernation (254) et le poisson en jeûne (290) où le  $\delta^{15}\text{N}$  a augmenté dans le foie et le cœur (et aussi dans l'intestin et le tissu adipeux chez l'écureuil), mais pas dans le muscle. De plus, 14 jours de jeûne ont été sans effet sur le  $\delta^{15}\text{N}$  de la queue du lézard bien que celui de l'acide urique ait augmenté (291). Ces résultats suggèrent donc que le muscle puisse répondre de façon variable lors de stress nutritionnels.

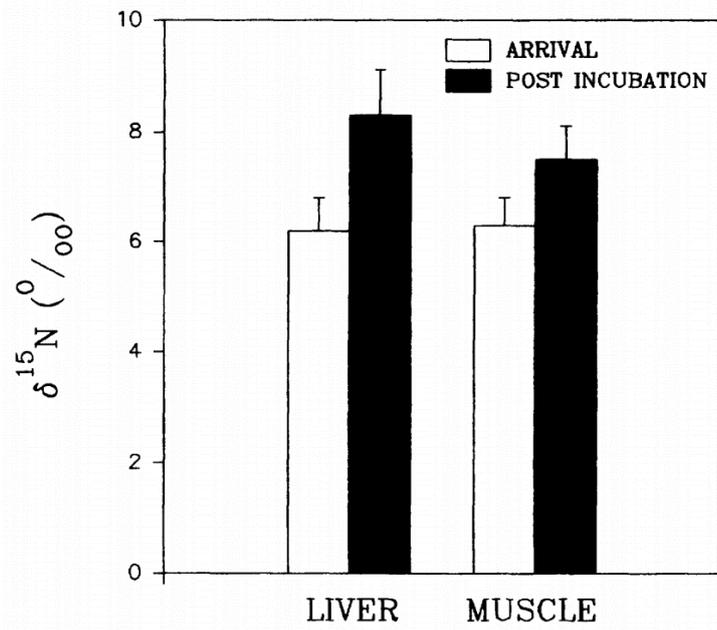


Figure 25. Adapté de (288). Effet d'un jeûne de 4 semaines sur le  $\delta^{15}\text{N}$  du foie et du muscle chez des oies.

Bien que moins d'études aient évalué l'effet d'accroissement de l'apport protéique, quelques  $\Delta^{15}\text{N}$  élevés ont été observés dans ce contexte (287, 292-294). La croissance doit cependant aussi être prise en compte dans l'évaluation des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$ . Si celle-ci n'est pas stimulée lors d'un apport alimentaire plus important, les AA excédentaires sont oxydés alors qu'en cas de stimulation de la croissance, ils seront plus destinés à la synthèse protéique. Ces deux cas de figure sont susceptibles d'influencer différemment le  $\Delta^{15}\text{N}$ . Une mauvaise connaissance de l'adéquation des besoins et des effets sur la croissance pourraient donc être liés à des résultats discordants où le  $\Delta^{15}\text{N}$  diminue quand augmente l'apport protéique (266, 295, 296). Dans l'ensemble, par ailleurs, le contexte écologique de plusieurs études présentées ici, dans lesquelles des changements de la quantité de protéines ingérées pourraient être accompagnés de changements du profil en AA de ces protéines, limite de surcroît l'interprétation des résultats puisque la qualité de l'apport protéique impacte aussi le  $\Delta^{15}\text{N}$ .

Chez l'Homme, quelques études renforcent cette relation entre l'apport protéino-énergétique et le  $\delta^{15}\text{N}$  (et du  $\Delta^{15}\text{N}$  en considérant que l'apport alimentaire est de nature à peu près constante chez les participants de ces études). Effectivement, des études ont montré une augmentation du  $\delta^{15}\text{N}$  des cheveux de femmes enceintes perdant du poids à cause de nausées matinales (297) et une diminution du  $\delta^{15}\text{N}$  des cheveux d'anorexiques en reprise de poids (298). Ces résultats sont notamment en accord avec l'étude de Deschner (287) chez le singe, montrant une augmentation du  $\Delta^{15}\text{N}$  lors de la restriction protéino-énergétique et une diminution lors d'une augmentation subséquente de l'apport alimentaire (Figure 24). Une autre étude rapporte une corrélation positive entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  et l'indice de masse corporelle résultant des valeurs plus élevées chez 2 participants obèses (299) ce qui pourrait suggérer que l'apport protéique n'est pas en adéquation avec les besoins de ces derniers. Dans un contexte plus physiopathologique, d'autres études,

certes peu nombreuses, ont montré un  $\delta^{15}\text{N}$  plus faible dans les cheveux de patients atteints de cirrhose hépatique (300) et dans des cellules cancéreuses (301).

#### 2.4.3 Variations du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ lors de conditions nutritionnelles et physiopathologiques

De son côté, le  $\delta^{13}\text{C}$  est aussi susceptible de varier avec les conditions nutritionnelles et physiopathologiques. Cependant, contrairement à l'azote, le carbone est présent, par définition, dans toutes molécules organiques. Ceci semble affecter l'interprétation des variations de  $\delta^{13}\text{C}$  lorsque les lipides intratissulaires qui sont appauvris en  $^{13}\text{C}$  par rapport aux protéines ne sont pas extraits avant l'analyse (302). Doucett et al. (302) ont rapporté une augmentation du  $\delta^{13}\text{C}$  associée à une réduction des stocks de lipides intratissulaires dans le muscle et le foie de saumons en migration cessant de s'alimenter. De plus, Charel et al. (289) ont noté une réduction du  $\delta^{13}\text{C}$  du plasma de pingouins en jeûne et proposé qu'une concentration plus élevée d'acides gras était en cause. Une même diminution du  $\delta^{13}\text{C}$  plasmatique a été observée chez des phoques jeûnant durant la lactation (303). Par contre, des résultats démontrent sans équivoque que le  $\delta^{13}\text{C}$  peut varier indépendamment des lipides : son augmentation dans des cheveux chez des anorexiques en reprise de poids (298), sa diminution dans des cheveux lors de la sous-nutrition sévère (304), et ses valeurs plus élevées dans le glucose plasmatique chez des chiens (305) et des rats (306) diabétiques. Cependant, les effets de l'adéquation de l'apport alimentaire sur le  $\delta^{13}\text{C}$  sont incertains.

Tableau 10. Effets de la restriction alimentaire et du jeûne sur le  $\delta^{13}\text{C}$  de plusieurs espèces. X indique que les lipides tissulaires ont été extraits. Inspiré de (307).

Conditions	Espèces	Tissus	$\delta^{13}\text{C}$	Extraction des lipides	Études
Restriction	Bonobo	Urine	↑		(287)
Différents niveaux d'apports	Poisson	Corps entier	↑	X	(295)
		Lipides	↑	X	
25% de ad libitum	Poulet	Globules rouges Plumes	↑		(308)
45 ou 50% du régime contrôlé	Puffin	Sang	↓		(309)
		Globules rouges	↓		
65% de ad libitum	Moineau	Foie		X	(310)
		Muscle		X	
		Plumes		X	
		Sang		X	
53% du régime contrôlé	Oiseau de mer	Globules rouges Plumes			(311)
45% de ad libitum	Rat	Collagène		X	(312)
		Apatite	↓	X	
Jeûne épisodique	salamandre	Foie			(313)
		Queue			
Jeûne durant la lactation	Phoque	Globules rouges			(303)
		Sérum	↓		
		Lait			
Jeûne	Serpent	Corps entier			(314)
Jeûne	Reptiles	Corps entier	↑		(307)
		Excrétas	↑		
		Écailles			
		Griffes			
Jeûne	Reptiles	Queue			(291)
		Excrétas			
Jeûne	Poisson	Muscle			(290)
		Foie			
		Coeur	↓		
Jeûne	Poisson	Corps entier			(315)
Jeûne	Poisson	Foie		X	(316)
		Muscle		X	

Conditions	Espèces	Tissus	$\delta^{13}\text{C}$	Extraction des lipides	Études
Jeûne	Poisson	Foie	↑		(302)
		Muscle	↑		
Jeûne	Pingouin	Plasma	↓		(289)
		Globules rouges Sang			
Jeûne	Oie	Muscle		X	(288)
		Foie		X	
Jeûne	Crevettes	Muscle			(317)
Jeûne	Planaire	Corps entier	↑		(318)
Jeûne	Amphipode	Corps entier			(319)
Jeûne	Larve	Segment abdominal 9			(320)
Jeûne	Larve	Corps entier	↑		(321)
Jeûne	Ver marin	Corps entier	↑		(322)
Jeûne	Ver de terre	Corps entier			(323)
		Mucus	↑		
Jeûne	Araignée	Corps entier	↑		(324)
Jeûne	Coquerelle	Corps entier	↑		(325)

\*Augmentation du  $\delta^{13}\text{C}$  avec une réduction de l'apport alimentaire.

Tableau 10

C'est pourquoi, et étant donné que relativement peu d'études chez le rongeur sont disponibles, les effets sur le  $\delta^{13}\text{C}$  de la restriction alimentaire ou du jeûne chez plusieurs espèces, dont une étude chez le rat, ont été synthétisés dans le tableau 10. Pour des raisons multiples, peu de constance des variations de  $\delta^{13}\text{C}$  peut y être observée.

Premièrement, il est notable que peu d'études rapportent une extraction des lipides tissulaires susceptibles d'influencer les résultats. Ceci semble d'autant plus juste qu'il a été démontré chez le poisson qu'en plus de différer du  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines, le  $\delta^{13}\text{C}$  des lipides s'accroît lors d'apports alimentaires réduits (295).

Deuxièmement, la durée du jeûne, relativement au taux métabolique de l'organisme étudié, est aussi susceptible d'influencer les résultats sachant qu'il est classiquement admis que le glucose est plus oxydé au début du jeûne, que les lipides sont plus oxydés dans la phase suivante et que finalement les AA tissulaires sont davantage oxydés lors du jeûne prolongé (326, 327).

Troisièmement, le fait que les organismes soient soumis à un jeûne complet ou à une restriction partielle est aussi susceptible d'avoir un impact. Les études du tableau 10 sont regroupées en ce sens. En effet, lors du jeûne, seules les réserves endogènes sont utilisées alors que le régime l'est aussi lors de la restriction partielle. Ainsi, la composition de ce régime et l'ampleur de la restriction sont susceptibles d'influer sur l'utilisation des macronutriments alimentaires pour les biosynthèses et ainsi influencer le  $\delta^{13}\text{C}$  des composés endogènement produits (cf l'équation pour les AA à la section 2.4.3). Cependant, un tel adressage métabolique des macronutriments durant la restriction alimentaire n'a été à ce jour que très peu exploré (328). Celui-ci est expliqué plus en détail dans une section ultérieure.

Une méta-analyse récente n'a pas démontré d'effet global constant du jeûne ou de la restriction alimentaire sur le  $\delta^{13}\text{C}$  de plusieurs tissus (329). Ni l'extraction des lipides, ni la distinction entre le jeûne et la restriction alimentaire n'expliquaient significativement

de la variabilité entre les études alors que c'était le cas pour le type de tissu étudié. En prenant cela en compte, un  $\delta^{13}\text{C}$  plus élevé dans le sang et le corps entier après le jeûne a été démontré. Ceci suggère que les tissus pourraient répondre différemment en termes de variations de  $\delta^{13}\text{C}$  durant le jeûne ou la restriction alimentaire ce qui pourrait aussi expliquer en partie la diversité des réponses retrouvées dans le tableau 10.

En définitive, l'existence de variations des  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  liées à des modulations métaboliques d'origines nutritionnelles et physiopathologiques est démontrée. Plus précisément, il semble assez clair que différents tissus peuvent s'enrichir en  $^{15}\text{N}$  lors de la restriction protéo-énergétique ou d'une diminution de la qualité de l'apport protéique et vice-versa. Il pourrait aussi y avoir un enrichissement en  $^{13}\text{C}$  dans certains tissus lors de la restriction protéino-énergétique. Une moindre utilisation des lipides pour la synthèse d'AA est théoriquement à même d'expliquer ce résultat (détaillé à la section 2.5.3) tout comme une simple déplétion des stocks de lipides si ceux-ci n'ont pas été extraits avant l'analyse. Beaucoup de questions demeurent néanmoins quant aux variations de  $\delta^{13}\text{C}$ , notamment lors de la restriction alimentaire. À la lumière de ces variations de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  liées à des modulations métaboliques d'origines nutritionnelles et physiopathologiques, les sections qui suivent posent les bases mécanistiques de leurs interprétations en vue d'en extraire des informations physiologiquement plausibles.

## 2.5 Interprétation des variations tissulaires d'abondances isotopiques naturelles du carbone et de l'azote

### 2.5.1 Chaque tissu possède une fenêtre d'intégration temporelle qui lui est propre

Les protéines tissulaires sont en renouvellement constant. Ce renouvellement se fait d'une part avec des acides aminés issus de l'alimentation et d'autre part via le recyclage d'acides aminés endogènes. Le renouvellement des protéines tissulaires fait que leur composition isotopique change lorsque la composition isotopique des AA utilisés pour la synthèse protéique change. Ceci est possible lors d'un changement de la composition isotopique des protéines alimentaires ou par une réorganisation des flux métaboliques. Suivant un tel changement alimentaire et/ou métabolique, la composition isotopique des protéines tissulaires change ainsi progressivement jusqu'à l'atteinte d'un nouvel état stationnaire. Cette nouvelle composition isotopique d'équilibre ou le nouvel état stationnaire sera atteint plus ou moins rapidement en fonction de la vitesse de renouvellement tissulaire (257).

Ce taux de renouvellement a été déterminé expérimentalement en changeant la composition isotopique du régime et en mesurant la composition isotopique de tissus avant et à différents moments après le changement de régime. Différentes méthodes ont été utilisées pour estimer le taux de renouvellement comme une fonction exponentielle et la variable de progrès de la réaction et cela pour différents nombres de compartiments et en tenant compte ou non d'un délai avant que le nouveau régime soit utilisé métaboliquement (257). Tout ceci peut influencer la valeur estimée.

Selon l'hypothèse que les protéines tissulaires sont cinétiquement homogènes (se renouvellent à des vitesses similaires, modèle à un compartiment) l'équation générale

suivante décrit l'évolution de leur composition isotopique selon une cinétique mono-exponentielle d'atteinte de l'équilibre (330):

$$\delta_t = \delta_\infty + (\delta_0 - \delta_\infty) \times e^{-((FSR/100) \times t)}$$

Où  $\delta_t$ ,  $\delta_0$  et  $\delta_\infty$  représente les  $\delta^{15}\text{N}$  ou  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires au temps  $t$ , au temps 0 (avant le changement de régime) et une fois l'atteinte de l'équilibre isotopique. FSR est le taux de renouvellement protéique (en %/jour). Pour un modèle à deux compartiments avec 2 pools protéiques de proportions  $p$  et  $1-p$  et au FSR respectif, l'équation devient :

$$\delta_t = \delta_\infty + (\delta_0 - \delta_\infty) \times [p \times e^{-((FSR_1/100) \times t)} + (1 - p) \times e^{-((FSR_2/100) \times t)}]$$

Le temps nécessaire aux protéines d'un tissu pour atteindre 95% de leur nouvelle valeur d'équilibre isotopique suivant un changement de régime ( $T_{95\%}$ , jour) peut ensuite être calculé selon l'équation suivante pour un modèle à un compartiment :

$$T_{95\%} = \frac{\ln(1/0,05)}{(FSR/100)}$$

Et en résolvant l'équation suivante pour un modèle à deux compartiments :

$$0,05 = p \times e^{-((FSR_1/100) \times t)} + (1 - p) \times e^{-((FSR_2/100) \times t)}$$

Le tableau 11 présente une synthèse d'études ayant estimé chez le rongeur les taux de renouvellement du carbone et de l'azote de différents tissus. Globalement, il en ressort que les excréta (urine et fèces) se renouvellent isotopiquement plus rapidement que les tissus et que les tissus splanchniques se renouvellent plus rapidement que le muscle, le cœur et le cerveau. Ces observations sont en accord avec les différences de taux de renouvellement protéique mesurés avec des traceurs enrichis et présentés dans le tableau 1. À titre d'exemple, la figure 26 présente ces différences d'évolution des  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines de différents tissus après une réorganisation des flux d'azote splanchnique.

Tableau 11. Temps de renouvellement isotopique tissulaire (jours) provenant de différentes études chez le rongeur. L'étendue (min à max) des valeurs moyennes rapportées est indiquée.

<b>Tissus</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>Études</b>
Sang	38,9 à 114,1	65,5 à 300,4	(253, 263, 331-334)
Plasma	13,0 à 21,6	17,3 à 52,0	(225, 335)
Sérum	21,7	35,0 à 36,3	(257)
Érythrocytes	121,4 à 132,3	145,7 à 200,1	(257) (225)
Intestin	nd	37 à 49	(225)
Foie	10,4 à 43,2	15,6 à 65,3	(225, 253, 257, 263, 331, 332, 335, 336)
Muscle	78,7 à 164,2	63,3 à 199,7	(225, 253, 257, 263, 331, 332, 335, 336)
Coeur	60,1 à 129,7	68,3 à 138,3	(331, 335)
Reins	19,9 à 160,3	30,3 à 96,4	(225, 257, 331, 335)
Cerveau	60,5 à 121,9	69,2 à 96,8	(331, 335, 336)
Tissu adipeux	67,4	nd	(336)
Poumon	34,6 à 38,9	47,5 à 51,9	(335)
Rate	25,9 à 30,3	30,3 à 56,6	(335)
Fèces	4,3 à 8,6	8,6 à 13,0	(335)
Urine	nd	4,3 à 17,3	(335)
Peau	nd	67 à 71	(225)
Poils	205,3 à 369,1	265,0 à 486,0	(225, 257, 336)
	$\delta^{13}\text{C}$ constant au fil du temps		(263)

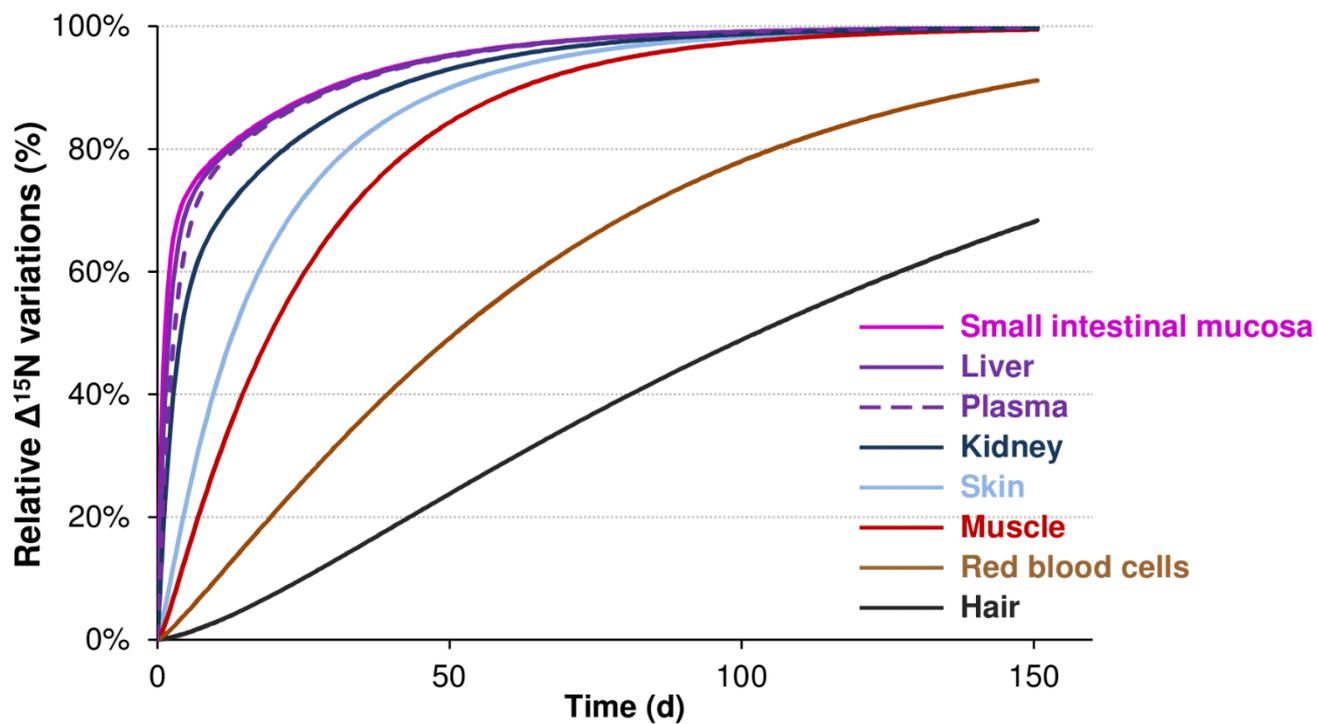


Figure 26. Adapté de (225). Évolution des  $\Delta^{15}\text{N}$  de différents tissus suivant un changement métabolique lié au flux d'azote splanchnique.

En plus des différences intertissulaires, des études ont également démontré des effets du sexe (257, 333) et de l'alimentation, notamment de la teneur en protéines du régime (335), sur le taux de renouvellement tissulaire. Bien qu'il y ait une relation évidente entre les taux de renouvellement isotopique du carbone et de l'azote dans les tissus, la littérature n'est pas claire sur le fait que les isotopes de l'un de ces éléments pourraient se renouveler plus vite que ceux de l'autre (257, 335). La présence (ou l'extraction) de lipides dans le tissu étudié ainsi que son métabolisme spécifique comprenant des échanges intertissulaires sont susceptibles d'être en cause. Une contribution au renouvellement isotopique d'un changement de la taille des tissus, comme durant la croissance, peut également être calculée avec les changements de masse protéique des tissus et les équations ci-dessus et ne contribuerait qu'à 10% du renouvellement isotopique tissulaire chez le rat adulte selon les estimations de MacAvoy et al. (253).

De plus, la vitesse de renouvellement protéique, le terme FSR des équations ci-dessus, n'a par ailleurs pas été exploitée en tant que tel en physiologie où il est classiquement mesuré sur de plus courtes périodes avec des traceurs enrichis (cf section 1.1.6). Ces deux approches sont utilisées de pairs dans la 3<sup>e</sup> étude de ce manuscrit.

## 2.5.2 Le rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ des protéines tissulaires signe l'orientation préférentielle des acides aminés vers l'anabolisme et le catabolisme

Les protéines et leurs AA représentent la très vaste majorité de l'azote tissulaire. Étant donné les différences de  $\delta^{15}\text{N}$  entre AA, le  $\delta^{15}\text{N}$  d'un tissu dépend de 2 facteurs : sa composition en AA et les effets isotopiques lors de leur métabolisme. Toutefois, la composition en AA a probablement peu d'impact puisque : **(i)** beaucoup d'AA échangent leur azote via des pools communs (Figure 5) et de façon intertissulaire, **(ii)** les tissus contiennent de nombreuses protéines aux diverses compositions en AA (224) et **(iii)** le  $\delta^{15}\text{N}$  d'un même acide aminé varie entre les tissus (259). Ceci met en évidence le rôle d'effets isotopiques et du métabolisme dans l'enrichissement tissulaire en  $^{15}\text{N}$  (Tableau 9) et ses modulations lors de différentes conditions nutritionnelles et physiopathologiques.

Dans ce contexte, plusieurs modèles ont été développés en vue d'expliquer l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des organismes et ses variations lors de différentes conditions nutritionnelles (224, 225, 233, 254, 337, 338). Une formalisation mathématique simple d'un flux d'assimilation et d'un flux d'excrétion jumelée à quelques observations expérimentales suggère que le fractionnement isotopique expliquant l'enrichissement tissulaire en  $^{15}\text{N}$  (Tableau 9) doit se faire après l'assimilation, étant donné que l'urine n'est pas enrichie par rapport au régime (224). Par ailleurs, le principe de conservation de la masse impose qu'à l'état stationnaire isotopique, les flux entrant et sortant de l'organisme soient de même composition isotopique à défaut de quoi le  $\Delta^{15}\text{N}$  tissulaire serait en perpétuelle évolution. Globalement, ce formalisme met en lumière une utilisation préférentielle du  $^{15}\text{N}$  pour le renouvellement protéique et une élimination préférentielle du  $^{14}\text{N}$  lors de l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires. Cela apparaît d'autant plus vrai que le  $^{14}\text{N}$  pourrait même être préférentiellement absorbé au niveau caeco-coliaque suivant le métabolisme bactérien (225). Ainsi, un effet isotopique

favorisant la rétention de  $^{15}\text{N}$  dans les protéines durant leur renouvellement même a été démontré par le modèle de Poupin et al. (225), mais est contesté d'un point de vue théorique par Schoeller (224)(cf section 2.1.3). Cet effet isotopique net lors du renouvellement protéique pourrait certes découler d'une utilisation préférentielle du  $^{14}\text{N}$  lors du transfert d'azote catalysé par des enzymes (Tableau 6) qui enrichirait en  $^{15}\text{N}$  les AA destinés à la synthèse protéique et déplèterait l'azote exporté des tissus (225).

L'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires (le  $\Delta^{15}\text{N}$ ) résulte probablement majoritairement d'un gain net en  $^{15}\text{N}$  durant la croissance lors de laquelle les tissus ont un gain net d'azote. Le même mécanisme expliquant l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des tissus (le  $\Delta^{15}\text{N}$ ) peut par contre, d'une part être à même d'expliquer les différences intertissulaires de  $\Delta^{15}\text{N}$  (Tableau 9), et d'autre part les variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  résultant de modulations du métabolisme azoté lors de diverses conditions nutritionnelles et physiopathologiques.

Ainsi, Sick et al. (260) ont proposé que les variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines hépatiques peuvent s'interpréter en termes de changements dans la partition des AA tissulaires entre synthèse protéique et production d'urée. Un tel embranchement métabolique a été décrit de façon théorique dans les travaux de Hayes (222)(cf section 2.1.3). Poupin et al. (225) ont ensuite étendu cette approche en développant un modèle multitissu et multicompartiment d'interprétation des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$ . Ce modèle, selon le principe de parcimonie, a été constitué de 21 compartiments et de 49 voies d'échanges (Figure 27). Chaque compartiment du modèle est caractérisé par sa teneur totale en azote et son  $\delta^{15}\text{N}$ . Les différents tissus sont représentés par 2 compartiments : les AA tissulaires libres et les protéines. Ces 2 compartiments échangent entre eux via synthèse et dégradation protéique. Les AA tissulaires libres échangent avec la circulation via le captage d'AA circulants et l'oxydation des AA tissulaires amenant la production hépatique d'urée.

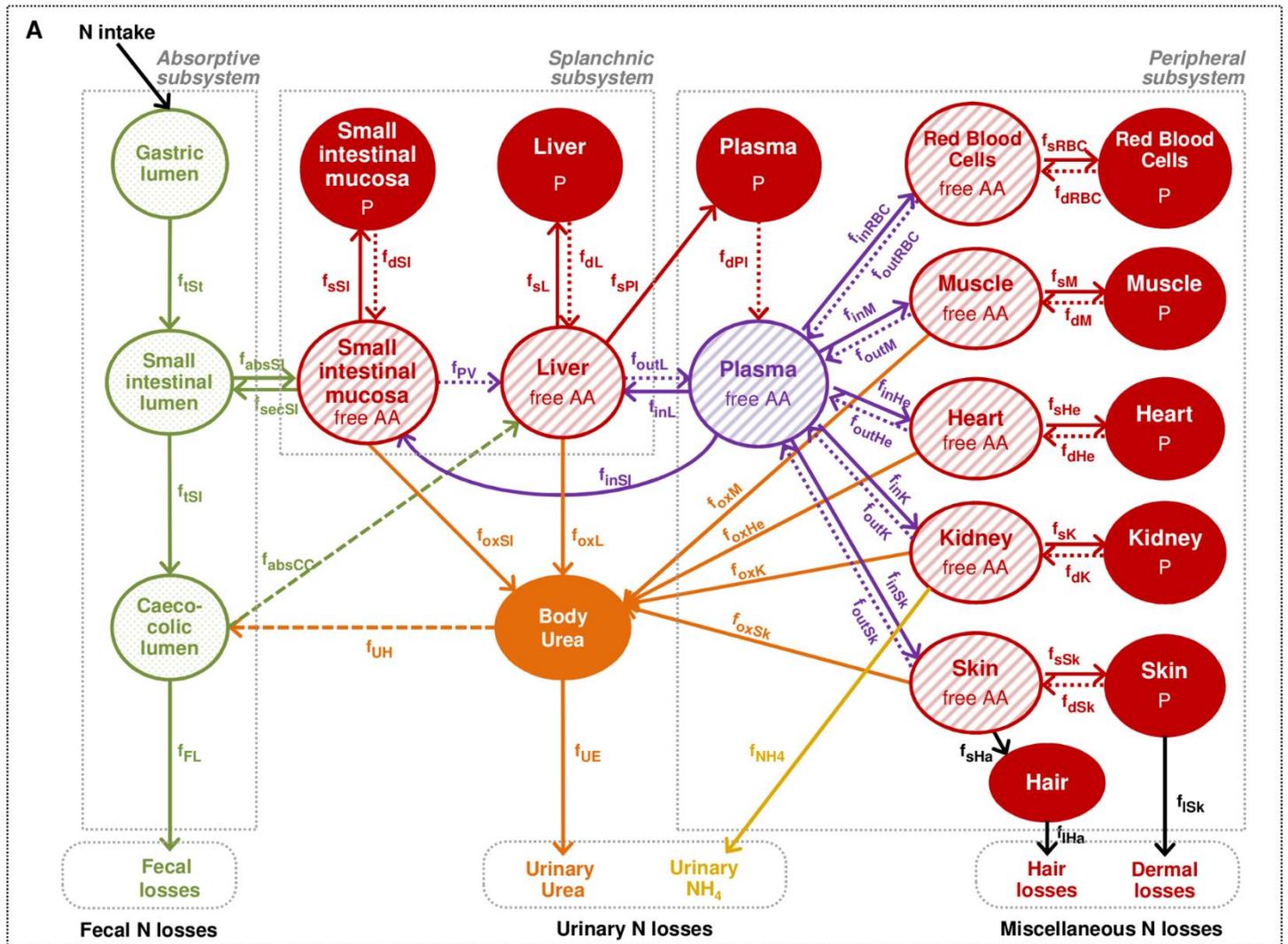


Figure 27. Adapté de (225). Modèle multitissu et multicompartiment d'interprétation des variations de  $\Delta^{15}N$  en fonction de modulations des flux azoté ( $f$ ).

Ce modèle est basé sur l'hypothèse que le transfert simple d'azote (transport vers le milieu intracellulaire, transfert le long du tractus gastro-intestinal, flux des pertes fécales, dermiques et pilaires et le flux d'urée vers le colon) est sans effet isotopique. Par ailleurs, le modèle a identifié des effets isotopiques favorisant l'accumulation du  $^{15}\text{N}$  dans les protéines lors du renouvellement protéique de tous les tissus considérés (effet combiné de  $f_s$  et  $F_d$  dans la Figure 27) suivant des mesures systématiques d'un enrichissement en  $^{15}\text{N}$  dans les protéines comparativement aux AA libres des tissus.

Dans ce contexte, le modèle explique les différences de  $\delta^{15}\text{N}$  entre les protéines de différents tissus en associant un effet isotopique, favorisant l'élimination préférentielle du  $^{14}\text{N}$  lors de l'oxydation des AA tissulaires ( $f_{ox}$  dans la Figure 27) dans tous les tissus considérés sauf le muscle, où l'effet isotopique est inverse. Cet effet isotopique opposé dans le muscle pourrait être lié à l'exportation de Gln, un acide aminé riche en  $^{15}\text{N}$  (259), pour l'uréogénèse hépatique. Pour les autres tissus, l'élimination préférentielle du  $^{14}\text{N}$  lors de l'oxydation des AA est en accord avec les effets isotopiques mesurés in vitro lors du transfert de l'azote des AA (Tableau 6). En d'autres termes, le modèle indique qu'une augmentation de la proportion d'AA tissulaires orientée vers le catabolisme (relativement au flux anabolique) augmente le  $\Delta^{15}\text{N}$  de tous les tissus sauf du muscle où le  $\Delta^{15}\text{N}$  diminue dans ce contexte. Dans le muscle, le  $\Delta^{15}\text{N}$  augmente quand, inversement, augmente la proportion d'AA orientée vers l'anabolisme relativement au catabolisme. Il est à noter que des modulations seules des flux de synthèse et de dégradation protéiques entraînant ou non des gains ou des pertes de masses protéiques n'engendrent pas de changement permanent de  $\Delta^{15}\text{N}$  une fois le nouvel état stationnaire isotopique atteint.

Sur la base des équations de l'annexe II, l'équation suivante permet ainsi de schématiser les résultats du modèle en décrivant le  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires en

fonction du  $\delta^{15}\text{N}$  des AA tissulaires libres et de la proportion de ces AA destinés à l'oxydation ou l'élimination ( $f$ ) et de l'effet isotopique sur cette voie ( $\epsilon$ ) :

$$\delta_{\text{protéines}} = \delta_{\text{acides aminés}} + f\epsilon$$

Ici, une valeur de  $\epsilon$  positive représente donc que le  $^{14}\text{N}$  est davantage éliminé (contrairement à dans (225)). Le travail de modélisation de Poupin et al. (225) a démontré que l'orientation préférentielle des AA tissulaires vers la synthèse protéique relativement au catabolisme ( $f$  ou  $p_{\text{ox}}$ ) dicte l'ampleur des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$ , mais que différents tissus peuvent répondre de façon opposée étant donné une valeur opposée de  $\epsilon$  dans l'équation ci-dessus. Plus particulièrement, le muscle peut s'enrichir en  $^{15}\text{N}$  lors d'un anabolisme accru des AA, et vice-versa, du fait d'un  $\epsilon$  négatif dans cette équation. Au contraire,  $\epsilon$  apparaît positif dans les autres tissus étudiés, notamment ceux de la zone splanchnique. L'effet isotopique de l'orientation des AA vers l'oxydation ( $\epsilon$ ) reste néanmoins à définir pour d'autres tissus comme le tissu adipeux dont par ailleurs le catabolisme des AA ramifiés semble diminué lors de la résistance à l'insuline (30). En somme, cette interprétation mécanistique des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  peut servir à l'étude du métabolisme des AA lors de différentes conditions nutritionnelles ou physiopathologiques. Elle permettrait une vision globale et multitissulaire de l'impact métabolique.

Ensuite, une fois le modèle de Poupin et al. (225) calibré pour les différents effets isotopiques et l'impact de moduler certains flux métaboliques sur les  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires étudié, la capacité du modèle à prédire les variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  observées dans la littérature lors de différentes conditions nutritionnelles a été évaluée.

D'abord, le modèle a été à même de reproduire l'association négative entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  et l'efficacité d'utilisation anabolique des protéines alimentaires liée notamment à la qualité des protéines ingérées (225, 339-342). Les résultats suggèrent qu'une augmentation de l'oxydation splanchnique et non périphérique des AA cause cette augmentation du  $\Delta^{15}\text{N}$  lorsque diminue l'efficacité d'utilisation anabolique des protéines

alimentaires. Plus particulièrement, stimuler l'orientation des AA vers l'oxydation, relativement à l'anabolisme (augmenter  $f$ ) dans les zones splanchnique et périphérique ou périphérique seulement, affecterait peu le  $\Delta^{15}\text{N}$  splanchnique et diminuerait le  $\Delta^{15}\text{N}$  musculaire (du fait du  $\varepsilon$  opposé dans le muscle). Le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines de tous les tissus serait plutôt augmenté par une augmentation exclusivement splanchnique de l'orientation des AA vers l'oxydation relativement à l'anabolisme.

En second lieu, le modèle permet de reproduire et d'expliquer différents scénarios de variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  observés dans la littérature lors du jeûne ou de la restriction alimentaire chez différentes espèces (254, 288)(cf section 2.4.2), des situations où la taille des pools protéiques n'est pas stable, mais diminue. Effectivement, selon le modèle, stimuler la dégradation protéique musculaire lors du jeûne ou de la restriction alimentaire accroîtrait systématiquement le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires (ce qui est en accord avec les résultats de (288) et la plupart des études (cf section 2.4.2)). De plus, une diminution de la synthèse protéique accompagnée d'une augmentation de l'orientation des AA vers l'oxydation (augmentation de  $f$ ) dans le muscle accroîtrait surtout le  $\Delta^{15}\text{N}$  splanchnique, encore une fois du fait du  $\varepsilon$  opposé dans le muscle (ce qui est en accord avec les résultats de (254)).

En conclusion, les résultats de modélisation présentés ici indiquent dans leur ensemble que l'enrichissement en  $^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires par rapport au régime (le  $\Delta^{15}\text{N}$ ), qui varie entre les différents tissus (Tableau 9), est lié à l'orientation métabolique des AA tissulaires vers l'anabolisme vs le catabolisme. Le modèle multitissu et multicompartiment de Poupin et al. (225) démontre que des effets isotopiques favorisant l'élimination du  $^{14}\text{N}$  des tissus lors de l'oxydation des AA en sont responsables sauf pour le muscle où l'oxydation des AA favoriserait l'élimination du  $^{15}\text{N}$ . Ainsi, les protéines tissulaires s'enrichissent en  $^{15}\text{N}$  lorsqu'augmente l'orientation catabolique relative des AA sauf pour les protéines du muscle qui s'appauvrissent en  $^{15}\text{N}$  (dans ce contexte) et

s'enrichissent lorsqu'augmente l'orientation anabolique relative des AA. Le modèle démontre aussi différents scénarios de variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires en fonction de différentes modulations régionales des flux métaboliques des AA. Ce modèle s'avère certes utile pour interpréter les variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires en termes de modulations du métabolisme de l'azote des AA, mais le  $\delta^{13}\text{C}$ , de son côté, contient de l'information quant à la synthèse du squelette carboné des AA non indispensables.

### 2.5.3 Le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des protéines tissulaires signe l'utilisation des macronutriments alimentaires pour la synthèse d'acides aminés

En premier lieu, cette section met en avant que l'enrichissement en  $^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires par rapport au régime, le  $\Delta^{13}\text{C}$ , contrairement au  $\Delta^{15}\text{N}$  pour les variations de  $\delta^{15}\text{N}$ , est peu informatif quant à l'interprétation des variations de  $\delta^{13}\text{C}$ . La principale raison en est que suivant la biosynthèse d'AA, le carbone des protéines tissulaires est constitué de carbone provenant de plusieurs macronutriments alimentaires aux différents  $\delta^{13}\text{C}$ . Effectivement, dès lors qu'un substrat contribue à une biosynthèse, son  $\delta^{13}\text{C}$  influence celui du produit tel qu'indiqué par exemple par l'empreinte isotopique du sucre alimentaire dans l'Ala (Figure 19), dont le carbone provient du pyruvate. Ce phénomène atteste que les protéines tissulaires sont composées d'AA d'une part issus directement des protéines alimentaires et d'autre part synthétisés *de novo* par l'organisme. Ces AA synthétisés *de novo* le sont par différentes voies (cf 2.3.2) tirant leur carbone des protéines alimentaires, mais aussi des glucides et des lipides (Figure 4). Puisque ces macronutriments diffèrent en  $\delta^{13}\text{C}$ , les AA synthétisés *de novo* ont un  $\delta^{13}\text{C}$  qui dépend de la contribution de ces différentes sources de carbones à leurs squelettes carbonés. À titre d'exemple, il serait concevable que le  $\delta^{13}\text{C}$  de la Gln synthétisée *de novo* diffère en fonction des proportions de glucose et d'acides gras alimentant le cycle de l'acide

citrique. En somme, les protéines tissulaires contiennent donc un mélange d'AA dont le carbone est issu non seulement des protéines, mais aussi des glucides et des lipides alimentaires.

Dans ce contexte, le  $\Delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires dépend : **(i)** de la contribution de ces différents macronutriments alimentaires au carbone des AA utilisés pour le renouvellement protéique, **(ii)** des  $\delta^{13}\text{C}$  de ces macronutriments et **(iii)** des effets isotopiques depuis l'absorption de ces macronutriments jusqu'à l'incorporation de leur carbone dans les protéines. Il devient complexe en cas de variation de  $\Delta^{13}\text{C}$  de déterminer laquelle ou lesquelles de ces 3 *voies* sont modulées (contrairement au fait que pour le  $\Delta^{15}\text{N}$  une seule *voie* semble être impliquée selon le plus récent modèle (225). Un changement de  $\delta^{15}\text{N}$  de l'alimentation sans effet métabolique ne peut affecter le  $\Delta^{15}\text{N}$ ).

En second lieu, cette section pose les bases permettant d'extraire du  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines les contributions des glucides, des lipides et des protéines alimentaires à leur carbone. À l'état stationnaire, selon le principe de conservation de masse, la contribution des macronutriments alimentaires au carbone dans les AA est liée au  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires ( $\delta^{13}\text{C}_T$ ) comme suit (cf Figure 29) :

$$\delta^{13}\text{C}_T = p \times \delta^{13}\text{C}_P + c \times \delta^{13}\text{C}_G + (1 - p - c) \times \delta^{13}\text{C}_L + TS$$

Où  $p$ ,  $c$  et  $1-p-c$  représentent les proportions de carbone dans les protéines tissulaires issues respectivement des protéines ( $\delta^{13}\text{C}_P$ ), des glucides ( $\delta^{13}\text{C}_G$ ), et des lipides ( $\delta^{13}\text{C}_L$ ) alimentaires.  $TS$  est l'effet isotopique global dans l'ensemble des réactions impliquées.

À ce jour, les études évaluant l'adressage des macronutriments ont cependant combiné glucides et lipides référés comme l'*énergie alimentaire* (268, 343). Fernandes et al. (268) par des données issues de plusieurs études dans une régression linéaire multiple entre  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines et de l'*énergie alimentaire* (glucides+lipides) et celui du collagène ont démontré que 74% du carbone dans le collagène provient des protéines alimentaires et le reste des glucides et des lipides. Leur modèle s'est avéré moins précis

pour des régimes déficients ou excessifs en protéines suggérant que l'adressage des macronutriments diffère dans ces cas-ci. Hobbie (343) a par la suite démontré, aussi avec des données de la littérature, que la relation entre l'apport protéique et l'adressage des macronutriments varie non linéairement selon une fonction logarithmique. Les adressages respectifs des glucides et des lipides et leurs variations intertissulaires restent à définir, et cela pour différents niveaux de protéines, glucides et lipides alimentaires. Enfin, différentes conditions nutritionnelles tels le jeûne ou la restriction alimentaire, puisqu'elles affectent l'utilisation des substrats métaboliques et le  $\delta^{13}\text{C}$  des organismes (Tableau 10), sont susceptibles d'affecter l'adressage des macronutriments vers la synthèse d'AA, mais beaucoup de questions demeurent.

À titre d'exemple, vu que diffèrent les  $\delta^{13}\text{C}$  des glucides et des lipides, les flux dans la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation devraient influencer le  $\delta^{13}\text{C}$  des AA synthétisés à partir d'intermédiaires du cycle de l'acide citrique (Figure 4 et section 2.3.2). Du moins, des mesures lors du jeûne chez le rat du  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  expiré, un autre produit du cycle de l'acide citrique, suggèrent que la répartition des flux entre la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation se répercutent sur le  $\delta^{13}\text{C}$  des produits du cycle de l'acide citrique. Dans cette étude, le  $\delta^{13}\text{C}$  du  $\text{CO}_2$  expiré se situait entre celui des lipides et des glucides sanguins au début du jeûne lorsque les glucides sont plus utilisés et diminuait de 3,5 ‰ après 48 h se situant à 0,7 ‰ des lipides qui sont principalement utilisés à ce stade (344). Des variations des flux dans la glycolyse et la  $\beta$ -oxydation induites par des changements du ratio glucides/lipides dans l'alimentation sont donc susceptibles d'influencer le  $\delta^{13}\text{C}$  des AA non indispensables, mais le phénomène reste à démontrer et à quantifier. De plus, nous ne savons pas à ma connaissance si la résistance à l'insuline qui accompagne le syndrome métabolique ou d'autres conditions physiopathologiques sont à même d'influencer l'utilisation des différentes sources de carbones pour la synthèse d'AA et dans quelle mesure.

En somme, les résultats présentés dans cette seconde partie du manuscrit montrent que les légères différences de masses entre les isotopes stables naturellement présents de l'azote ( $^{15}\text{N}$  et  $^{14}\text{N}$ ) et du carbone ( $^{13}\text{C}$  et  $^{12}\text{C}$ ) affectent la vitesse à laquelle ces isotopes sont utilisés par certaines réactions métaboliques. Il en résulte un fractionnement de ces isotopes par le réseau complexe de réactions dans l'organisme causant son enrichissement en isotopes lourds par rapport au régime ( $\Delta$ ) d'environ 3‰ en azote et 1‰ en carbone. Ces valeurs moyennes sont, de plus, sujettes à des variations intertissulaires et entre les AA composants les protéines tissulaires. Il a aussi été démontré que les  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$ , puisqu'ils signent des orientations métaboliques, varient lors de conditions nutritionnelles comme le jeûne et la restriction alimentaire, et de certaines conditions physiopathologiques comme le diabète pour le  $\delta^{13}\text{C}$  et le cancer pour le  $\delta^{15}\text{N}$ . L'atteinte de l'état stationnaire isotopique est essentielle à l'interprétation mécanistique de ces disparités isotopiques. Celui-ci fait référence au renouvellement complet, s'effectuant à des vitesses variables selon les tissus, des isotopes de ses protéines lors d'un changement de l'alimentation ou métabolique. Selon le plus récent modèle, l'orientation préférentielle des AA vers l'anabolisme, relativement au catabolisme, est responsable de ces variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines. L'adressage des macronutriments alimentaires vers le carbone des protéines tissulaires, possible pour les glucides et les lipides via la synthèse d'AA non indispensables, fait varier le de  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines. Les variations de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires sont donc des outils prometteurs pour l'étude du métabolisme des protéines et des AA dont les modulations lors du syndrome métabolique sont d'ailleurs peu comprises.

# Justification et objectifs

## Justification des travaux

L'analyse de la bibliographie présentée en introduction montre qu'aucun consensus ne se dégage jusqu'ici concernant l'existence et les mécanismes tissulaires des potentielles altérations du métabolisme des protéines et des AA lors du syndrome métabolique. Alors que les flux de renouvellement des protéines corporelles ou musculaires restent inchangés ou sont différemment affectés selon les études, les concentrations circulantes de plusieurs AA, notamment ramifiés, sont clairement modulées lors du développement du syndrome métabolique, et sont même capables de prédire l'apparition des signes cliniques. Ces concentrations élevées d'AA en circulation suggèrent un métabolisme altéré pouvant avoir comme origine une oxydation réduite, une moindre synthèse protéique et/ou une protéolyse accrue dans certains tissus. Néanmoins, le métabolisme des protéines et des AA étant fortement compartimenté et régionalisé, les techniques classiques de traçage isotopique des flux de synthèse et dégradation protéiques n'ont pas été à même, à ce jour, de clairement identifier comment ils sont altérés lors de l'obésité et de la résistance à l'insuline.

Notre groupe a ainsi récemment développé un modèle multi-compartimental permettant une interprétation mécanistique des variations naturelles de  $\delta^{15}\text{N}$  dans les différents tissus, permettant de les interpréter en termes d'allocation relative des AA tissulaires vers l'oxydation ou la synthèse protéique (225). Cette approche novatrice permet de mettre en évidence de façon intégrée des réorientations métaboliques tissulaires de la partition des flux anaboliques et cataboliques d'AA au contraire des techniques

classiques de traceurs métaboliques qui ne permettent que d'estimer certains flux individuellement.

## Objectifs

L'objectif général de cette thèse est donc d'identifier les altérations du métabolisme des protéines et des AA lors du développement nutritionnel précoce du syndrome métabolique en interprétant les variations naturelles de  $\delta^{15}\text{N}$  dans les protéines des différents tissus. Plus précisément, cette thèse vise à :

- 1- Identifier quels sont les tissus qui montrent, par des variations de leurs  $\delta^{15}\text{N}$  protéiques, une réorientation du métabolisme de leurs AA lors du syndrome métabolique.
- 2- Interpréter ces variations de  $\delta^{15}\text{N}$  en termes de variations de l'orientation préférentielle des AA tissulaires vers l'anabolisme *vs* le catabolisme, à la lumière de nos résultats préalables de modélisation (225) nous permettant d'interpréter qualitativement de telles signatures isotopiques.
- 3- Cette thèse a comme objectif supplémentaire d'étudier l'adressage des macronutriments alimentaires vers les protéines tissulaires via des mesures de leur  $\delta^{13}\text{C}$ , puis d'identifier des modulations potentielles de ces flux lorsque changent les apports glucidique et lipidique, et lors du syndrome métabolique. Des études ont effectivement mis en évidence que les protéines alimentaires contribuent à ~75% du carbone des protéines tissulaires et que le reste provient des glucides et des lipides via la synthèse d'AA. Il a aussi été suggéré que cet adressage métabolique pourrait varier selon les conditions nutritionnelles et physiopathologiques (268, 308, 343, 345-348). Mais, les contributions respectives des glucides et des lipides à la synthèse d'AA, leurs variations

intertissulaires et l'influence des apports glucidique et lipidique restent méconnues.

À ces fins, trois études ont été réalisées. Dans la 1<sup>ère</sup> étude, des rats Wistar préalablement nourris avec un régime gras et sucré (type « Western diet ») ont ensuite été soumis à une importante restriction énergétique engendrant une fonte protéique tissulaire. Cette étude a surtout permis de valider certaines prédictions de notre modèle d'interprétation des variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires, à savoir la manière dont une augmentation de l'orientation préférentielle des AA vers l'oxydation se traduit en termes de signatures isotopiques dans les différents tissus. Cette validation renforce les interprétations des variations isotopiques tissulaires faites à la lumière de nos résultats préalables de modélisation dans les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> études de ce manuscrit.

Dans la 2<sup>e</sup> étude, des rats Sprague-Dawley ont été exposés en période périnatale et/ou ensuite nourris après leur sevrage avec un régime gras et sucré, puisque ce modèle d'exposition périnatale semble très susceptible de prédisposer au développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Cette étude a permis d'identifier les tissus dont le métabolisme des protéines et des AA est altéré lors de l'exposition à un régime gras et sucré et l'influence des apports glucidique et lipidique sur l'adressage des glucides et des lipides vers la synthèse d'AA.

Dans la 3<sup>e</sup> étude, des rats Wistar ont été nourris avec un régime gras et sucré engendrant des niveaux d'obésité et de résistance à l'insuline très divers selon la sensibilité individuelle. À l'échelle de cette population, le degré de syndrome métabolique a ensuite été établi par la construction d'un score individuel et trois groupes ont été distingués par classification hiérarchique : les rats sensibles à l'obésité seulement, les rats sensibles à l'obésité et au syndrome métabolique et les rats résistants à l'obésité et au syndrome métabolique. Cette approche a permis d'identifier comment et dans quels tissus le métabolisme des protéines et des AA est affecté chez les rats sensibles au

développement du syndrome métabolique lorsque l'alimentation est grasse et sucrée et de mettre en lumière des effets sur l'adressage des macronutriments alimentaires vers les protéines tissulaires. De plus, ce modèle où tous les individus reçoivent le même régime permet de s'assurer que les effets observés ne découlent pas d'un changement de la composition alimentaire, mais bien de l'obésité et de la résistance à l'insuline. Dans l'ensemble des études, les  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  ont été mesurés par EA-IRMS dans les protéines de plusieurs tissus et dans certains cas des AA composant ces protéines ont été analysés par GC-C-IRMS (1<sup>ère</sup> et 3<sup>e</sup> études) pour identifier plus en détail les voies métaboliques impliquées. Dans l'étude 3, les flux de synthèse protéique ont été mesurés par un traçage au  $\text{D}_2\text{O}$ .



## 2 ARTICLES SCIENTIFIQUES



Étude 1 : Early changes in tissue amino acid metabolism  
and nutrient routing in rats fed a high-fat diet: evidence  
from natural isotope abundances as biomarkers

(Publié dans le *British Journal of Nutrition*)

## **Étude 1 : Changements tissulaires précoces du métabolisme des AA et de l'adressage des nutriments chez le rat nourri avec un régime gras : évidence des abondances isotopiques naturelles en tant que biomarqueurs.**

Olivier L. Mantha, Sergio Polakof, Jean-François Huneau, François Mariotti, Nathalie Poupin, Daniel Zalko et Helene Fouillet.

### **Contexte et objectifs**

On sait encore très peu de chose sur comment l'obésité et l'insulinorésistance induites par l'alimentation affectent le métabolisme des protéines et des acides aminés des tissus. L'abondance naturelle relative des isotopes stables du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) et de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) dans les protéines tissulaires constitue de nouveaux biomarqueurs prometteurs du métabolisme des acides aminés. Respectivement, ils reflètent l'utilisation des macronutriments alimentaires pour la synthèse d'acides aminés et l'utilisation métabolique relative des acides aminés tissulaires pour l'oxydation versus la synthèse protéique. Dans cette étude, nous visons ainsi à utiliser les variations naturelles de  $\delta^{13}\text{C}$  et de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires, pour mieux caractériser les dysrégulations tissu-spécifiques du métabolisme des acides aminés induites par un régime gras.

### **Méthodes**

Les  $\delta^{13}\text{C}$  et  $\delta^{15}\text{N}$  ont été mesurés dans les protéines de plusieurs tissus chez des rats exposés périnatalement et/ou nourris après le sevrage avec un régime gras.

### **Résultats et discussion**

La consommation d'un régime gras a augmenté l'adressage du gras alimentaire aux protéines de tous les tissus via la synthèse d'acides aminés non indispensables, mais n'a pas affecté la répartition des acides aminés entre les voies anaboliques et cataboliques

dans la plupart des tissus. Toutefois, la proportion d'acides aminés destinés à l'oxydation plutôt qu'à la synthèse protéique était augmentée dans l'intestin grêle et réduite dans le muscle tibial antérieur et le tissu adipeux. Pour le tissu adipeux, une réallocation des flux d'acides aminés a été observée lors d'une exposition périnatale ou post-sevrage au régime gras alors que pour l'intestin grêle et le muscle tibial antérieur, une telle réallocation fut seulement observée après une exposition au régime gras couvrant à la fois les périodes périnatale et post-sevrage.

### **Conclusion**

L'exposition à un régime gras induit une réorganisation précoce et tissu spécifique du métabolisme des acides aminés, notamment une diminution de l'orientation relative des acides aminés vers l'oxydation dans des tissus périphériques.





## Early changes in tissue amino acid metabolism and nutrient routing in rats fed a high-fat diet: evidence from natural isotope abundances of nitrogen and carbon in tissue proteins

Olivier L. Mantha<sup>1</sup>, Sergio Polakof<sup>2</sup>, Jean-François Huneau<sup>1</sup>, François Mariotti<sup>1</sup>, Nathalie Poupin<sup>3</sup>, Daniel Zalko<sup>3</sup> and Helene Fouillet<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 75005, Paris, France

<sup>2</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

<sup>3</sup>Toxalim (Research Centre in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

(Submitted 27 June 2017 – Final revision received 1 December 2017 – Accepted 7 January 2018)

### Abstract

Little is known about how diet-induced obesity and insulin resistance affect protein and amino acid (AA) metabolism in tissues. The natural relative abundances of the heavy stable isotopes of C ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and N ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in tissue proteins offer novel and promising biomarkers of AA metabolism. They, respectively, reflect the use of dietary macronutrients for tissue AA synthesis and the relative metabolic use of tissue AA for oxidation *v.* protein synthesis. In this study,  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  were measured in the proteins of various tissues in young adult rats exposed perinatally and/or fed after weaning with a normal- or a high-fat (HF) diet, the aim being to characterise HF-induced tissue-specific changes in AA metabolism. HF feeding was shown to increase the routing of dietary fat to all tissue proteins via non-indispensable AA synthesis, but did not affect AA allocation between catabolic and anabolic processes in most tissues. However, the proportion of AA directed towards oxidation rather than protein synthesis was increased in the small intestine and decreased in the *tibialis anterior* muscle and adipose tissue. In adipose tissue, the AA reallocation was observed in the case of perinatal or post-weaning exposure to HF, whereas in the small intestine and *tibialis anterior* muscle the AA reallocation was only observed after HF exposure that covered both the perinatal and post-weaning periods. In conclusion, HF exposure induced an early reorganisation of AA metabolism involving tissue-specific effects, and in particular a decrease in the relative allocation of AA to oxidation in several peripheral tissues.

**Keywords:** High-fat diets:  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural isotope abundance: Dietary nutrient routing: Protein and amino acid metabolism: Obesity: Insulin resistance

The consumption of high-energy diets rich in fat and sugars has increased worldwide, paralleling the worldwide rise in obesity and metabolic conditions such as type 2 diabetes mellitus and CVD<sup>(1,2)</sup>. Despite high inter-individual variability in sensitivity to gains in weight and adiposity under high-fat (HF) diets in both humans<sup>(3–5)</sup> and rodents<sup>(6,7)</sup>, HF over-feeding is known to favour the development of adiposity<sup>(8)</sup> and metabolic disorders<sup>(9)</sup> involving insulin resistance and ultimately leading to chronic diseases<sup>(10,11)</sup>. Moreover, early perinatal HF exposure, by maternal HF nutrition during pregnancy and lactation, very likely contributes to the predisposition of offspring to HF-induced obesity and insulin resistance in later life<sup>(12–14)</sup>.

Although numerous studies have investigated how HF feeding affects carbohydrate and lipid metabolism, little is still known about its potential impact on protein and amino acid (AA) metabolism<sup>(15,16)</sup>. Several studies have shown that high plasma concentrations of several AA, including branched-chain

AA, are associated with obesity and the early onset of insulin resistance, as well as a higher risk of developing the metabolic syndrome or type 2 diabetes<sup>(17–22)</sup>. Elevated circulating AA levels suggest an impaired metabolism, which may arise from either decreased AA catabolism and/or increased AA release as a result of increased protein degradation in some tissues, in line with the initiation of insulin resistance. However, the causes and underlying mechanisms are still poorly understood, and this is because of several reasons<sup>(17,18)</sup>. One reason is the diversity of the phenotypes reported with tissue-specific alterations in AA catabolism, with a modulation of catabolic enzyme activities being either similarly or oppositely altered, depending on the tissue<sup>(18,23)</sup>. The other reason is the unresolved debate about the possible alterations of the tissue kinetics of protein synthesis and degradation, with only few and conflicting findings about how these fluxes are affected by obesity and insulin resistance<sup>(15,16)</sup>. For instance, proteolysis

**Abbreviations:** AA, amino acid; CHO, carbohydrate; HF, high fat; NF, normal fat.

\* **Corresponding author:** H. Fouillet, fax +33 1 44 08 18 58, email Helene.Fouillet@agroparistech.fr



fluxes have mostly been measured at the whole-body level but seldom at the muscle level, with contradictory results, which generally reported no effects of obesity or insulin resistance, or in some cases a proteolysis increase at the whole-body level<sup>(24–26)</sup> or a proteolysis decrease at the muscle level<sup>(27)</sup>. Such discrepancies probably reflect the limitations of classic tracer methods when investigating protein kinetics and their alterations<sup>(28)</sup>. In this context, new and alternative approaches are required in order to gain a more integrated insight into the partitioning and potential reallocation of AA between different anabolic and catabolic fluxes in tissues, so as to ultimately decipher the effects of obesity and insulin resistance on AA and protein metabolism.

To this end, the natural abundances of stable N isotopes in tissue proteins constitute new, relevant and promising biomarkers of AA metabolism in tissues. Dietary protein N is the sole source of body protein N, but body proteins are naturally enriched in the heavier stable N isotope (<sup>15</sup>N) over dietary protein. This <sup>15</sup>N bioaccumulation ( $\Delta^{15}\text{N}$ , also known as the trophic step or discrimination factor) is globally due to discrimination against this heavy isotope during N waste formation and particularly during urea production<sup>(29–31)</sup>. More precisely,  $\Delta^{15}\text{N}$  values vary among tissues as a result of differences in AA composition<sup>(32)</sup>, but also and mostly as a result of the particular AA metabolism in the tissue, because of the existence of several isotope effects associated with different metabolic pathways such as AA oxidation, as well as protein turnover in tissues<sup>(31,33)</sup>. Consequently, variations in different body fluxes of the catabolic or anabolic use of AA can result in  $\Delta^{15}\text{N}$  variations, and tissue  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements are integrative biomarkers for the tissue-specific metabolic impact of nutritional and/or physiopathological conditions. For instance, in humans, variations in hair <sup>15</sup>N natural abundance values have been shown to reflect changes in N metabolism during pregnancy<sup>(34)</sup>, nutritional stress<sup>(35)</sup>, anorexia<sup>(36,37)</sup> and cirrhosis<sup>(38)</sup>, and  $\Delta^{15}\text{N}$  values in some animal tissues have been shown to reflect dietary protein quality and anabolic use efficiency<sup>(29,30,33,39–41)</sup>. More precisely, we have previously shown, by analysing simultaneous multi-tissue  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements using a multi-compartment model, that tissue protein  $\Delta^{15}\text{N}$  values constitute integrated and interpretable biomarkers of tissue AA partitioning between protein synthesis and oxidation<sup>(31)</sup>.

In addition, the natural abundances of stable C isotopes in tissue proteins are also informative about the dietary origin of tissue AA. In contrast with N, the heavier, stable C isotope (<sup>13</sup>C) only modestly bioaccumulates<sup>(32,42)</sup>, and if the C found in tissue proteins preferentially originates from dietary proteins it can also derive from dietary lipids and carbohydrates (CHO) that are used for non-indispensable AA synthesis<sup>(43–46)</sup>. Because dietary macronutrients generally differ in their natural <sup>13</sup>C abundances, those in tissue proteins may reflect macronutrient use for AA synthesis and consequent routing to tissue proteins, which can vary in line with nutritional and physiopathological conditions<sup>(36,43,44,46–49)</sup>.

In this study, we used these new C and N isotopic biomarkers in order to better characterise the tissue-specific dysregulations of AA metabolism induced by exposure to an HF diet. C isotopic values were used as indicators of the relative utilisation of dietary macronutrients for tissue AA synthesis, and N isotopic values as indicators for the preferential metabolic use of tissue

AA for anabolic *v.* catabolic purposes. The study was carried out in rats exposed to an HF diet during the perinatal and/or post-weaning periods, as a model of early exposure to HF that is known to increase the risk for obesity and insulin resistance.

## Methods

### Animals and diets

The animal protocol formed part of a larger study designed to explore the combined effects of diet and exposure to contaminants, whose initial results have already been presented at the 9th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors – COW2017<sup>(50)</sup>. In this ancillary study, specific tissues were sampled for isotopic analyses of a subset of animals. Sprague–Dawley dams were pair-fed either a normal-fat (NF) or HF diet during gestation and lactation, from gestational day 8 onwards, while maintaining an equal N intake. After weaning, from postnatal day 21 onwards, male pups were pair-fed with either the NF or HF diet to include all combinations of perinatal and post-weaning dietary exposures (NF-NF, *n* 9; NF-HF, *n* 7; HF-NF, *n* 8; HF-HF, *n* 8). Dietary macronutrient compositions were adjusted daily according to the recommendations of Reeves *et al.*<sup>(51)</sup> in order to meet the protein and lipid requirements of gestation, lactation and early postnatal growth. The macronutrient composition of the diets following the stabilisation of food intake (from postnatal day 35) is detailed in Table 1. Compared with the NF diet, the HF diet had the same protein content (16.7 wt%), a higher lipid content (35 *v.* 6 wt%) owing to CHO substitution and a different CHO profile (67% maltodextrin and 33% sucrose *v.* 100% maltodextrin) for its potential effect on obesity and insulin resistance. Food intake was measured daily throughout the study. On postnatal day 115, the body composition of the animals was measured using NMR-MRI-based technology (EchoMRI™ 700) and oral glucose tolerance tests (OGTT) were performed in order to determine insulin sensitivity. In brief, a glucose bolus (1 g/kg) was

**Table 1.** Nutrient and isotopic compositions of normal- and high-fat diets

	Normal fat	High fat
Nutrients (wt%)		
Protein	16.7	16.7
Carbohydrates	67.7*	38.7†
Lipids	6.0	35.0
Fibre	5.0	5.0
Minerals	3.5	3.5
Vitamins	1.1	1.1
Isotopes (‰)		
$\delta^{15}\text{N}$		
Protein	6.1	6.1
$\delta^{13}\text{C}$		
Protein	–22.2	–22.2
Carbohydrates	–11.3*	–16.3†
Lipids	–30.4	–30.4
Energy‡	–13.8	–23.0

\* 100% maltodextrin.

† 67% maltodextrin, 33% sucrose.

‡ Weighted average of lipids and carbohydrates according to their C content and wt% (Equation (2)).



administered orally after an overnight fast, and blood samples were taken from the tail vein before and 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration. The blood glucose (OneTouch Ultra Easy glucometer; LifeScan) area under the concentration–time curve (AUC) was calculated using the trapezoid method. The rats were euthanised under pentobarbital anaesthesia on postnatal day 120 after an overnight fast. After an abdominal incision, blood was drawn from the abdominal aorta using a citrate-coated syringe. After centrifugation (12 000 *g*, 2 min), plasma and erythrocytes were rapidly aliquoted, frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at –80°C. Plasma insulin levels were measured by ELISA (Millipore). Different tissues were also rapidly collected (liver, small intestine, heart; *tibialis anterior*, *gastrocnemius*, *soleus* and *extensor digitorum longus* muscles; and subcutaneous adipose tissue), weighed, freeze-clamped in liquid N<sub>2</sub> and stored at –80°C until further analyses. Faeces were also collected and stored under the same conditions. The animals were handled according to the recommendations of the Regional Ethics Committee (accreditation number issued by the Ministry for Research: 00837-01).

#### Feed efficiency and liver protein anabolism efficiency

Feed efficiency was defined as the ratio of body weight at postnatal day 120 relative to cumulative food intake. Liver samples were homogenised and centrifuged (20 000 *g*, 10 min) and the protein content was measured using a bicinchoninic acid assay kit (Bio-Rad). Liver protein anabolism efficiency (%) was defined as the ratio of liver protein content at the time of killing relative to cumulative protein intake over the post-weaning period.

#### Tissue protein extraction

Frozen tissues were cooled with liquid N<sub>2</sub> and pulverised with a pestle and mortar. Tissue proteins were precipitated from pulverised tissues (100 mg) with 5-sulfosalicylic acid (10%, 7 μl/mg of tissue). Twice, after centrifugation (10 000 *g*, 4°C, 20 min), the supernatant was removed and the protein pellets were washed with 5-sulfosalicylic acid (10%) and freeze-dried. Subcutaneous adipose tissue (1 g) was first homogenised in 0.9% NaCl using an Ultra-Turrax homogenizer (T25 digital; IKA). After centrifugation (2000 *g*, 2°C, 20 min), the infranant containing the proteins was collected using a syringe and needle, and the floating fat layer containing the lipids was stored at –20°C until isotopic analysis. Adipose tissue proteins were further precipitated with 100 μl of 5-sulfosalicylic acid (100%) and thereafter treated as described for other tissues. Plasma proteins were precipitated from 0.5 ml of plasma with 5-sulfosalicylic acid (100%, 50 μl/ml of plasma) and the samples were centrifuged (2000 *g*, 4°C, 20 min) after 1 h of incubation at 4°C. The supernatant was removed and the protein pellets were washed with H<sub>2</sub>O, centrifuged again as described above and freeze-dried. The protein pellets from all matrices were delipidated using 1:1 ethanol–diethyl ether. Twice, the proteins were mixed for 1 h with the solvent mixture using a tube rotator and the supernatant was removed after a brief centrifugation (1000 *g*, 20°C, 5 min). The remaining solvents were eliminated by centrifugal evaporation. The faeces were freeze-dried and

pulverised, and then the resulting powder was analysed without any further treatment.

#### Isotopic analysis

The natural abundances of N and C stable isotopes in samples were expressed relative to standards (atmospheric N<sub>2</sub> for <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N and Vienna Pee Dee Belemnite for <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, respectively) using the delta notation:

$$\delta(\text{‰}) = 1000 \times (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}}, \quad (1)$$

where  $\delta$  is the parts-per-thousand difference in ratio of heavy to light isotopes (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N and <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) in the samples ( $R_{\text{sample}}$ ) and standards ( $R_{\text{standard}}$ : 0.0112372 for C and 0.0036765 for N). We measured  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in the proteins in the different tissues sampled, in the faeces, in lipids from adipose tissue and in dietary proteins, CHO and lipids. Isotopic measurements were performed with an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime; VG Instruments) coupled to an elemental analyser (EA Vario Micro Cube; Elementar). Tyrosine was used for calibration and drift correction.  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values for tissue proteins and faeces were expressed relative to the  $\delta$  value of dietary proteins using the capital delta notation ( $\Delta_{\text{tissue proteins}} = \delta_{\text{tissue proteins}} - \delta_{\text{dietary proteins}}$ ). The  $\delta^{13}\text{C}$  of adipose tissue lipids was similarly expressed but relative to dietary lipid  $\delta^{13}\text{C}$ . For each diet,  $\delta^{13}\text{C}$  of non-protein energy sources was calculated as the average  $\delta^{13}\text{C}$  of lipids and CHO weighted by their C content and dietary occurrence as follows<sup>(43,44)</sup>:

$$\delta^{13}\text{C}_E = [(\%_C \times 0.444) / (\%_L \times 0.768 + \%_C \times 0.444)] \times \delta^{13}\text{C}_C + [(\%_L \times 0.768) / (\%_L \times 0.768 + \%_C \times 0.444)] \times \delta^{13}\text{C}_L, \quad (2)$$

where  $\delta^{13}\text{C}_C$ ,  $\delta^{13}\text{C}_L$  and  $\delta^{13}\text{C}_E$  are, respectively, the  $\delta^{13}\text{C}$  values of dietary lipids, CHO and non-protein energy sources,  $\%_C$  and  $\%_L$  are dietary mass fractions of CHO and lipids and 0.444 and 0.768 are the reference C mass fractions of CHO and lipids, respectively.

#### Assessment of the contribution of dietary macronutrients to amino acid synthesis

The C in tissue proteins has various origins. Indeed, even though dietary proteins are preferentially routed to tissue proteins as AA, dietary lipids and CHO are used for the biosynthesis of non-indispensable AA and thus routed to protein synthesis, the degree of which varies according to the dietary macronutrient content<sup>(43,44,46)</sup>. Therefore, by hypothesising an isotopic steady state owing to the entire renewal of tissue proteins since weaning, the  $\delta^{13}\text{C}$  of tissue proteins represents the sum of dietary macronutrient  $\delta^{13}\text{C}$  values weighted by their respective contributions to C in tissue proteins (routing coefficients), in addition to the difference in  $\delta^{13}\text{C}$  between diet and tissue proteins because of isotopic fractionation along metabolic pathways (the trophic step). In our study, the three dietary macronutrients differed in terms of their  $\delta^{13}\text{C}$  and the two diets in terms of their  $\delta^{13}\text{C}_E$ , because of the different CHO and lipid contents (Table 1). These  $\delta^{13}\text{C}$  signatures of macronutrients and diets allowed us to estimate the routing coefficients for each macronutrient and diet.



In a first step, the contributions of dietary proteins were derived from the following equation:

$$\begin{aligned} \delta^{13}C_{T_d} &= p_d \times (\delta^{13}C_p + TS_p) + (1-p_d) \times (\delta^{13}C_{E_d} + TS_{E_d}) \\ &= p_d \times \delta^{13}C_p + (1-p_d) \times \delta^{13}C_{E_d} + TS_d, \end{aligned} \quad (3)$$

where  $\delta^{13}C_{T_d}$ ,  $\delta^{13}C_p$  and  $\delta^{13}C_{E_d}$  are, respectively, the  $\delta^{13}C$  values of proteins in a tissue, of dietary proteins and of dietary non-protein energy sources in the post-weaning diet d (d=NF or HF).  $p_d$  and  $1-p_d$  are the proportions of protein and non-protein dietary macronutrients routed to C in tissue proteins (the protein and energy routing coefficients, respectively).  $TS_p$  and  $TS_{E_d}$  are the specific trophic steps on dietary protein and energy, and  $TS_d$  is the global trophic step ( $TS_d = p_d \times TS_p + (1-p_d) \times TS_{E_d}$ ). To solve Equation (3),  $p$  and  $TS$  were assumed to be equal across our diets having an identical and adequate protein content, as  $p$  and  $TS$  have previously been shown to be extremely consistent over a spectrum of dietary compositions, except for deficient or excessive protein contents<sup>(43)</sup>. By solving Equation (3) simultaneously for each post-weaning diet (NF and HF), we obtained an identifiable system of two linear equations and two unknowns,  $p$  and  $TS$ , whose solution was as follows:

$$p = (\delta^{13}C_{E_{NF}} - \delta^{13}C_{E_{HF}} + \delta^{13}C_{T_{HF}} - \delta^{13}C_{T_{NF}}) / (\delta^{13}C_{E_{NF}} - \delta^{13}C_{E_{HF}}). \quad (4)$$

$$TS = (\delta^{13}C_{T_{NF}} - \delta^{13}C_{E_{NF}}) - (\delta^{13}C_{E_{NF}} - \delta^{13}C_{E_{HF}} + \delta^{13}C_{T_{HF}} - \delta^{13}C_{T_{NF}}) \times (\delta^{13}C_p - \delta^{13}C_{E_{NF}}) / (\delta^{13}C_{E_{NF}} - \delta^{13}C_{E_{HF}}). \quad (5)$$

The contributions of dietary CHO and lipids to C in tissue proteins were then estimated using the following equation:

$$\delta^{13}C_{T_d} = p \times \delta^{13}C_p + c_d \times \delta^{13}C_{C_d} + (1-p-c_d) \times \delta^{13}C_L + TS. \quad (6)$$

Here,  $c_d$  and  $1-p-c_d$  are the proportions of CHO and lipids routed, respectively, to C in tissue proteins (the CHO and lipid routing coefficients) and  $\delta^{13}C_{C_d}$  and  $\delta^{13}C_L$  are their respective  $\delta^{13}C$  values in diet d. Equation (6) was solved for  $c_d$  as follows:

$$c_{NF} = [\delta^{13}C_{T_{NF}} - \delta^{13}C_L - TS + p \times (\delta^{13}C_L - \delta^{13}C_p)] / (\delta^{13}C_{C_{NF}} - \delta^{13}C_L). \quad (7)$$

$$c_{HF} = [\delta^{13}C_{T_{HF}} - \delta^{13}C_L - TS + p \times (\delta^{13}C_L - \delta^{13}C_p)] / (\delta^{13}C_{C_{HF}} - \delta^{13}C_L). \quad (8)$$

#### Assessment of tissue amino acid allocation between anabolic and catabolic pathways

We had previously investigated the causes and significance of  $\Delta^{15}N$  variations across tissues and diets using a multi-compartmental analysis of multi-tissue  $\Delta^{15}N$  measurements in rats, and showed that the  $\Delta^{15}N$  of a tissue protein varies as a function of  $p_{ox}$ , the proportion of tissue AA that is directed towards oxidation rather than used for protein synthesis<sup>(31)</sup>. In particular, according to model predictions, a rise in  $\Delta^{15}N$  levels indicates an increase in  $p_{ox}$  in all tissues except muscle, where in contrast it is indicative of a reduction in  $p_{ox}$  because of its opposite sign of

isotopic fractionation associated with AA catabolism. Indeed, in most tissues, AA losses for catabolic purposes favour  $^{14}N$  elimination and hence  $^{15}N$  retention owing to the isotope effects associated with transamination and liver deamination, whereas under catabolic conditions muscle releases some of the most  $^{15}N$ -enriched AA (such as Ala and Gln) into the bloodstream, which may favour  $^{15}N$  elimination from the muscle as previously discussed<sup>(31)</sup>. Our model prediction for the  $\Delta^{15}N$  and  $p_{ox}$  relationships in splanchnic tissues was further validated experimentally by combining AA tracers and arteriovenous balance methods in ruminants, where we showed that the  $\Delta^{15}N$  of plasma proteins, which are synthesised in the splanchnic bed and mainly in liver, linearly increases with the splanchnic AA metabolism and oxidation and the liver urea production<sup>(29)</sup>. In the present study, the observed diet-induced  $\Delta^{15}N$  variations were interpreted in the light of these previous modelling<sup>(31)</sup> and experimental<sup>(29)</sup> results: a higher  $\Delta^{15}N$  was interpreted as indicative of an higher  $p_{ox}$  in all tissues except the muscle, where it was interpreted as indicative of a lower  $p_{ox}$ .

#### Statistical analyses

Because this was an ancillary study during which thirty-two animals received the four dietary treatments studied here, the sample size was fixed. However, we reasoned that the study would be powerful enough with eight rats in each group, because this sample size allowed minimally detectable effect sizes of 0.3‰ using a *t* test on group means for both  $\Delta^{15}N$  and  $\Delta^{13}C$  values, assuming a level of significance of 0.05, a power level of 0.80 and a standard deviation of 0.2‰<sup>(52)</sup>. Such a 0.3‰ effect size was small enough to enable the detection of diet-induced changes in (i) tissue AA metabolism using  $\Delta^{15}N$  values, according to our previous model predictions<sup>(31)</sup>, and (ii) nutrient routing to tissue protein using  $\Delta^{13}C$  values, because 0.3‰ is <2% of the difference between dietary CHO and lipid  $\Delta^{13}C$  values.

ANOVA using Tukey's *post hoc* test was run under SAS (version 21) in order to determine differences between the groups in terms of body composition, metabolic parameters and  $\Delta^{15}N$  and  $\Delta^{13}C$  values ( $\alpha=0.05$ ). Pearson's correlation coefficients between  $\Delta^{15}N$  and metabolic and body composition parameters of interest were evaluated for their significance using the Benjamini-Hochberg false discovery rate (FDR)<sup>(53)</sup>. The FDR correction was used to control the rate of false discoveries among significant correlations, and correlations with an FDR  $\leq 15\%$  were considered as significant. The data are expressed as means and standard deviations.

#### Results

##### Body composition, insulin sensitivity and feed efficiency

Post-weaning nutrition was the only factor that affected the body composition and metabolic parameters of the animals. Compared with the NF post-weaning diet, the HF post-weaning diet (i.e. NF-HF and HF-HF *v.* NF-NF and HF-NF) induced a higher body weight (+28%, 529 (SD 50) *v.* 412 (SD 27) g,  $P < 0.0001$ ), with a higher fat mass (+178%, 121 (SD 38) *v.* 44 (SD 16) g,  $P < 0.0001$ ) and a higher lean mass (+10%, 354 (SD 33) *v.* 322 (SD 36) g,  $P < 0.05$ ). The following metabolic parameters were also



increased under the HF post-weaning diet: plasma insulin levels (+100%, 74.8 (SD 48.6) v. 37.5 (SD 12.3) pM,  $P < 0.01$ ), glucose OGTT AUC (+19%, 824 (SD 105) v. 695 (SD 54) mM × 120min,  $P < 0.01$ ), feed efficiency (+27%, 66.4 (SD 4.8) v. 52.2 (SD 3.4)%,  $P < 0.0001$ ) and liver protein anabolism efficiency (+18%, 1.98 (SD 0.45) v. 1.69 (SD 0.16)%,  $P < 0.05$ ).

**Natural abundances of stable carbon isotopes ( $\Delta^{13}C$ ) in tissue proteins and dietary macronutrient use for amino acid synthesis**

Only post-weaning nutrition affected  $\Delta^{13}C$  values in tissue proteins, faeces and adipose tissue lipids, as presented in Table 2.  $\Delta^{13}C$  values after HF post-weaning feeding were lower in all the pools sampled, regardless of perinatal nutrition (NF-HF and HF-HF were lower than NF-NF and HF-NF, all  $P < 0.0001$ ). This indicates a more marked routing of dietary lipids, the macronutrient with the lowest  $\delta^{13}C$ , to adipose tissue lipids and tissue proteins when the animals consumed the HF diet.

Given the lack of effects of perinatal nutrition on  $\Delta^{13}C$  values, the contributions of dietary macronutrients (protein, CHO and lipid) to C in tissue proteins (i.e. nutrient routing) were calculated for post-weaning diets only (HF:  $n = 15$ , NF:  $n = 17$ ), for each sampled tissue (intestine, liver, plasma, erythrocytes, heart and four muscles). In each tissue, for identifiability reasons, protein routing (but not CHO and lipid routings) was assumed to be equal across the diets given their identical protein (but not energy) content. These nutrient routing results are presented in Table 3 (mean values across tissues) and in online Supplementary Table S2 (values for each tissue). For all tissues, proteins were preferentially sourced from dietary proteins, with protein routing that averaged 74.2 (SD 2.4)% across the tissues (Table 3). The routing of CHO and lipids was found to be largely dependent on diet, with a higher routing of lipid under HF feeding, but overall a higher routing of CHO than lipid for all tissues and diets. On average, in all the tissues sampled, lipid routing indeed reached 3.4 (SD 0.3)% and 12.1 (SD 1.1)% with the NF and HF diets, respectively, whereas CHO

**Table 2.** Natural abundances of carbon stable isotopes in tissue proteins, faeces and adipose tissue lipids ( $\Delta^{13}C$ )\* (Mean values and standard deviations)

	NF-NF		HF-NF		NF-HF		HF-HF		P		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Peri	Post	Peri x Post
<i>n</i>	9		8		7		8				
Protein $\Delta^{13}C$ (‰)											
Small intestine	2.8 <sup>a</sup>	0.1	2.9 <sup>a</sup>	0.1	0.4 <sup>b</sup>	0.1	0.5 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
Liver	3.2 <sup>a</sup>	0.2	3.2 <sup>a</sup>	0.1	0.8 <sup>b</sup>	0.1	0.8 <sup>b</sup>	0.2	<0.0001		
AT	2.9 <sup>a</sup>	0.2	3.0 <sup>a</sup>	0.2	0.7 <sup>b</sup>	0.1	0.7 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
TA muscle	2.8 <sup>a</sup>	0.2	2.8 <sup>a</sup>	0.2	0.4 <sup>b</sup>	0.2	0.4 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
G muscle	2.8 <sup>a</sup>	0.3	2.6 <sup>a</sup>	0.2	0.4 <sup>b</sup>	0.1	0.3 <sup>b</sup>	0.2	<0.0001		
EDL muscle	2.8 <sup>a</sup>	0.2	2.9 <sup>a</sup>	0.3	0.5 <sup>b</sup>	0.3	0.8 <sup>b</sup>	0.3	<0.0001		
S muscle	2.9 <sup>a</sup>	0.2	2.9 <sup>a</sup>	0.1	0.3 <sup>b</sup>	0.1	0.3 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
Heart	2.9 <sup>a</sup>	0.1	2.6 <sup>a</sup>	0.2	0.3 <sup>b</sup>	0.2	0.4 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
Plasma	3.3 <sup>a</sup>	0.1	3.2 <sup>a</sup>	0.1	0.7 <sup>b</sup>	0.1	0.6 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
Erythrocytes	1.8 <sup>a</sup>	0.1	1.8 <sup>a</sup>	0.2	0.0 <sup>b</sup>	0.1	-0.1 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		
Faeces $\Delta^{13}C$ (‰)	-3.3 <sup>a</sup>	0.6	-3.7 <sup>a</sup>	0.3	-5.3 <sup>b</sup>	0.2	-5.3 <sup>b</sup>	0.4	<0.0001		
AT lipid $\Delta^{13}C$ (‰)	8.5 <sup>a</sup>	0.9	8.6 <sup>a</sup>	0.7	1.5 <sup>b</sup>	0.1	1.6 <sup>b</sup>	0.1	<0.0001		

NF-NF, rats exposed to the normal-fat (NF) diet during the perinatal and post-weaning periods; NF-HF, rats exposed to the NF diet during the perinatal period and the high-fat (HF) diet during the post-weaning period; HF-NF, rats exposed to the HF diet during the perinatal period and the NF diet during the post-weaning period; HF-HF, rats exposed to the HF diet during both the perinatal and post-weaning periods; peri, perinatal diet; post, post-weaning diet; AT, adipose tissue; TA, *tibialis anterior*; G, *gastrocnemius*; EDL, *extensor digitorum longus*; S, *soleus*.

<sup>a,b</sup> Mean values with unlike superscript letters were significantly different between groups ( $P < 0.0001$ ).

\* Protein and faeces  $\Delta^{13}C$  values are the differences between protein or faeces  $\delta^{13}C$  and dietary protein  $\delta^{13}C$ . AT Lipid  $\Delta^{13}C$  is the difference between AT lipid  $\delta^{13}C$  and dietary lipid  $\delta^{13}C$ .

**Table 3.** Routing coefficients of dietary macronutrients to tissue proteins in rats fed a normal- or high-fat diet (Mean values and standard deviations and minimum and maximum values across tissues)

	Normal fat			High fat		
	Mean	SD	Min-max	Mean	SD	Min-max
Trophic step (‰)	0.63 (SD 0.25) (min-max 0.12 – 0.99)					
Protein routing (%)	74.2 (SD 2.4) (min-max 71.8–79.7)					
CHO routing (%)	22.4	2.1	17.6–24.5	13.7	1.3	10.8–15.0
Lipid routing (%)	3.4	0.3	2.7–3.8	12.1	1.1	9.5–13.3

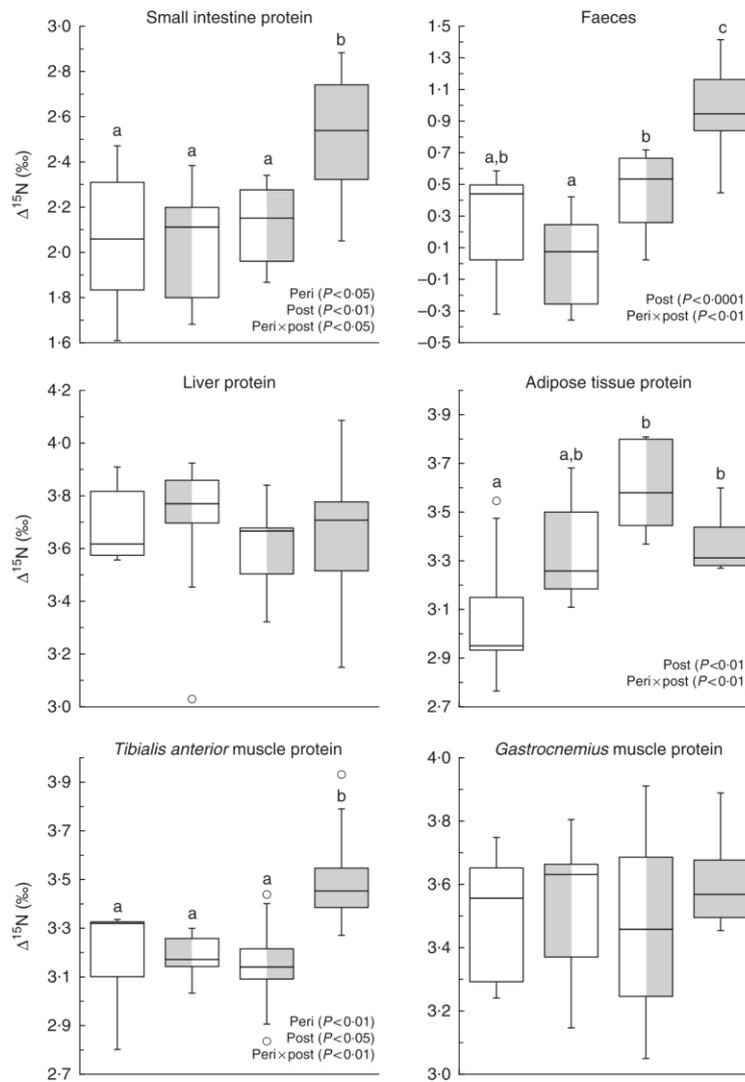
CHO, carbohydrates.

The protein, CHO and lipid routings are the proportions of dietary protein, CHO and lipid C used for amino acid synthesis and consequently routed to C in tissue proteins, and the trophic step is the difference in  $\delta^{13}C$  between dietary and tissue proteins owing to isotopic fractionation along metabolic pathways (i.e. the coefficients  $p$ ,  $c$ ,  $1 - p - c$  and TS of Equation (6), see the 'Methods' section). The protein routing and trophic step were assumed to be equal across the diets, whereas the CHO and lipid routings differed in rats fed the normal-fat or high-fat diet.

routing was 22.4 (SD 2.1)% and 13.7 (SD 1.3)%, respectively (Table 3). Therefore, in rats fed the NF and HF diets, where dietary lipids contributed to 13 and 61% of C in non-protein sources (CHO+lipids), dietary lipids contributed to 13% and only 47% of non-protein C routed to tissue proteins (energy routing, see the 'Methods' section). It should be noted that, among the tissues studied, erythrocytes were outliers for all nutrient routing, with the highest value for protein routing and the lowest values for CHO and lipid routing (online Supplementary Table S2).

*Natural abundances of stable nitrogen isotopes ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) in tissue proteins and amino acid allocation between anabolic and catabolic pathways*

Fig. 1 shows  $\Delta^{15}\text{N}$  values in faeces and proteins of the small intestine, liver, *tibialis anterior* and *gastrocnemius* muscles, and adipose tissue. In adipose tissue proteins,  $\Delta^{15}\text{N}$  values were up to 0.5‰ higher in rats fed the HF diet after weaning than in those never exposed to the HF diet (NF-HF *v.* NF-NF;  $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively), and also tended to



**Fig. 1.** Natural abundances of N stable isotopes in tissue proteins ( $\Delta^{15}\text{N}$ , ‰) in rats exposed to a normal-fat (NF) diet or a high-fat (HF) diet at different periods. Boxes represent the interquartile range (IQR, the difference between the 75th and the 25th percentiles), the line inside the box corresponds to the medians and 50th percentile and whiskers extend to maximum and minimum values or 1.5 times the IQR if outliers (○) exceed that distance. ◻, NF-NF; ◼, HF-NF; ◻, NF-HF; ◼, HF-HF. Peri, perinatal diet; post, post-weaning diet. <sup>a,b,c</sup> Values with unlike letters were significantly different between groups ( $P < 0.05$ ). Values concern the protein fraction of tissues except for faeces (bulk) that were only freeze-dried and homogenised before analysis.

**Table 4.** Pearson's correlation coefficients of significant correlations between natural abundances of stable nitrogen isotopes in tissue proteins ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) and body composition and metabolic parameters†

	Body composition			Metabolic parameters		
	Body weight	Fat mass	Lean mass	Glucose OGTT AUC	Feed efficiency	Liver PAE
Faeces $\Delta^{15}\text{N}$	0.42*	0.41*		0.43*	0.47**	
Protein $\Delta^{15}\text{N}$						
Small intestine	0.46**	0.37*			0.46**	
Adipose tissue	0.40*	0.42*			0.42*	
G muscle			0.45**			
Liver				-0.46**	-0.40*	-0.56***

 OGTT AUC, area under the concentration–time curve during oral glucose tolerance test; G, *gastrocnemius*; PAE, protein anabolism efficiency.

 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 28$ – $32$ .

† All correlations were significant at a false discovery rate of 15%.

be 0.2‰ higher following perinatal exposure alone (HF-NF *v.* NF-NF;  $P < 0.08$ ). In faeces and proteins of the small intestine and *tibialis anterior* muscle, combined HF exposure during the perinatal and post-weaning periods (HF-HF) resulted in 0.7, 0.4 and 0.3‰ higher  $\Delta^{15}\text{N}$  values, respectively, compared with all the other conditions (all  $P < 0.05$ ). These diet-induced  $\Delta^{15}\text{N}$  variations indicated diet-induced differences in  $p_{\text{ox}}$ , the AA allocation between catabolic and anabolic pathways, in the corresponding tissues. By contrast,  $\Delta^{15}\text{N}$  did not differ between the diet groups in proteins of the liver (3.7 (SD 0.2)‰), heart (4.9 (SD 0.3)‰), plasma (4.6 (SD 0.2)‰), erythrocytes (2.2 (SD 0.1)‰) and the *gastrocnemius* (3.5 (SD 0.2)‰), *soleus* (4.1 (SD 0.2)‰) and *extensor digitorum longus* muscles (3.7 (SD 0.2)‰). Detailed  $\Delta^{15}\text{N}$  values are shown in the online Supplementary Table S1.

Pearson's correlation coefficients of the significant correlations seen between  $\Delta^{15}\text{N}$  and body composition or metabolic parameters are listed in Table 4. The  $\Delta^{15}\text{N}$  values of intestinal proteins, faeces and adipose tissue proteins were all positively associated with body weight, fat mass and feed efficiency, and  $\Delta^{15}\text{N}$  values of faeces were also positively associated with glucose OGTT AUC ( $0.37 \leq r \leq 0.47$ ). In contrast, the  $\Delta^{15}\text{N}$  values of proteins in the *gastrocnemius* muscle were positively associated with lean mass ( $r = 0.45$ ), whereas the  $\Delta^{15}\text{N}$  values of liver proteins were negatively associated with liver protein anabolism efficiency ( $r = -0.56$ ), glucose OGTT AUC ( $r = -0.46$ ) and feed efficiency ( $r = -0.40$ ).

## Discussion

During this animal study performed in a carefully controlled dietary environment, we were able to reveal some of the tissue-specific changes that affect protein and AA metabolism in response to HF feeding depending on the exposure window (perinatal and/or post-weaning). This was made possible by the use of a new isotopic approach that consisted in measuring the natural abundances of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) in proteins from a large set of tissues. Using  $\delta^{13}\text{C}$ , we were able to determine the contribution of each dietary macronutrient to AA renewal in the different tissues (i.e. nutrient routing), whereas the use of  $\delta^{15}\text{N}$  enabled us to characterise the partitioning of AA between oxidation and protein synthesis pathways in the different tissues (i.e.  $p_{\text{ox}}$ , the proportion of tissue AA that

are directed towards oxidation rather than used for protein synthesis). More specifically, our tissue protein  $\delta^{13}\text{C}$  measurements were analysed with a new routing model, which allowed quantitative estimation of nutrient routing for each studied diet, whereas our tissue protein  $\delta^{15}\text{N}$  measurements were interpreted in the light of previous modelling<sup>(31)</sup> and experimental<sup>(29)</sup> results, which allowed qualitative estimation of the diet-induced differences in  $p_{\text{ox}}$ . A necessary condition to validate our interpretation of these  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  data was that sufficient time had elapsed since the last diet-shift – that is,  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  were no longer evolving but had reached their final equilibrium values with the post-weaning diet. In our study, nearly all body proteins had very likely reached their isotopic equilibrium at the end of the 100-d post-weaning period. Indeed, according to findings available in the literature, the times necessary to reach  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  equilibrium in rat tissues range from less than or about 50 d in small intestine, liver and plasma to about 100 d in muscles<sup>(45,54–57)</sup>. The only exception was erythrocytes, for which a longer period (130–180 d) has been reported to be necessary to achieve isotopic equilibrium<sup>(31,55)</sup>.

### Dietary macronutrient use for amino acid synthesis

Because the three dietary macronutrients generally differ in terms of their  $\delta^{13}\text{C}$  values and can all be used for AA synthesis,  $\delta^{13}\text{C}$  in tissue proteins reflects macronutrient use for AA synthesis and subsequent routing to proteins, the extent of which may vary in line with the macronutrient composition of the diet<sup>(43,46,56)</sup>. Compiled data from studies involving a wide variety of dietary conditions suggest a contribution of about 75% of dietary protein to C in tissue proteins<sup>(43,44,56)</sup> with, for instance, protein routing of 74% to bone collagen under a broad range of dietary compositions except for diets markedly deficient or excessive in protein<sup>(43)</sup>. Here, protein routing was estimated to reach 74.2 (SD 2.4)% across all tissues, which is consistent with the mean values and minor inter-tissue variations recorded by the studies in the literature<sup>(43,44,49,56)</sup>. Furthermore, taking advantage of the different  $\delta^{13}\text{C}$  signatures of dietary CHO and lipid, we were able to distinguish their respective routings for the first time. In the same way as for protein routing, we found few inter-tissue variations regarding the routing of CHO and lipid under each diet, although erythrocyte was an outlier with the lowest values for both CHO and lipid routing. This limited inter-tissue variability probably



reflects the fact that almost all the tissues studied are reliant on a mix of energy fuels during the postprandial period and more on lipids during the post-absorptive period. The only exception is erythrocytes, which are strictly dependent on glucose to fuel their energy metabolism because they lack mitochondria. However, as erythrocytes do not synthesise protein, the lipid and CHO routing calculated in erythrocytes will tend to reflect the mixed utilisation of lipid and CHO in bone marrow. Notwithstanding this, and as discussed above, our routing estimates for erythrocytes may have been partially biased because erythrocytes was the tissue most likely to be influenced by incomplete isotopic turnover.

Interestingly, we found that during NF feeding lipid contributed to the routing of non-protein nutrients in proportion with their dietary occurrence in non-protein nutrients (13%), whereas during HF feeding lipid contributed more to the routing of non-protein nutrients (47%) but less than in proportion with their dietary occurrence in non-protein nutrients (67%). One likely explanation is that dietary lipids cannot enter all the pathways of non-protein C routing to AA<sup>(45)</sup>: some AA (Ala, Ser, Cys and to a lesser extent Gly) are synthesised from 3C precursors, which are mostly produced during glycolysis, whereas others (Asx, Glx, Pro and Arg) are derived from 4 and 5C precursors produced during the tricarboxylic acid cycle that is fuelled by both glucose and fatty acids via acetyl-CoA. Therefore, an increase in the proportion of lipid in the diet may lead to a proportional rise in lipid-derived C in Asx, Glx Pro and Arg, but not in Ala, Ser, Cys and Gly. In this context, HF-diet-induced changes to the routing of dietary CHO and lipid merely reflected differences in their dietary availability and possible access to the metabolic pathways of AA synthesis, rather than being the consequence of marked changes to the enzymatic activities that occur during adaptation to a new dietary environment.

In our young adult rats, the routing of dietary lipids to tissue proteins thus increased in line with recent, post-weaning, HF exposure, whereas we found no significant effect of earlier, perinatal, HF exposure. This suggests that perinatal HF exposure has no lasting effect on dietary nutrient routing to tissue proteins in later life. It does not preclude the possibility that HF exposure might have affected nutrient routing during the perinatal period in the same way as it did during the post-weaning period, but this could not be traced in tissue protein  $\delta^{13}\text{C}$  at the end of the 100-d post-weaning period. After such a time delay, routing effects limited to the perinatal period are no longer detectable. As discussed above, 100 d were indeed sufficient to reach isotopic equilibrium with the post-weaning diet in nearly all tissues by complete isotopic turnover since the perinatal period<sup>(45,54–57)</sup>, so that the isotopic footprints of earlier effects on nutrient routing had been cleared.

#### *Tissue amino acid allocation between anabolic and catabolic pathways*

Although all dietary macronutrients contain C, only dietary proteins contain N and are the almost exclusive sources of the N found in tissue proteins. Because bioaccumulation of the heavy isotope  $^{15}\text{N}$  is known to occur, our tissue protein  $\delta^{15}\text{N}$  measurements were expressed as  $\Delta^{15}\text{N}$  in order to represent  $^{15}\text{N}$  enrichment over dietary protein. Our tissue protein  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements ranged from 2 to 5‰; these values were in line

with the few findings available in the literature on rodents<sup>(30,31,45,54–56,58)</sup>. Furthermore, the diet-induced  $\Delta^{15}\text{N}$  differences that we observed in some tissue proteins point to diet-induced differences in  $p_{\text{ox}}$ , the relative proportion of AA entering the tissue that is directed toward catabolism. Indeed, according to our previous experimental and modelling results<sup>(29,31)</sup>, a higher  $\delta^{15}\text{N}$  difference between tissue and dietary proteins (i.e. a higher  $\Delta^{15}\text{N}$ ) indicates a higher  $p_{\text{ox}}$  in all tissues except the muscle, where it indicates a lower  $p_{\text{ox}}$ . Although we found that HF feeding systematically favoured AA synthesis from dietary fat in all tissues, we saw no associated changes in  $\Delta^{15}\text{N}$ , and thus in  $p_{\text{ox}}$ , in most of the tissues studied (seven out of eleven), namely three skeletal muscles (*gastrocnemius*, *soleus* and *extensor digitorum longus*), the heart, plasma, erythrocytes and liver. In contrast, the present results suggest that HF nutrition affected  $p_{\text{ox}}$  in three other tissues, namely the small intestine (and consequently faeces), *tibialis anterior* muscle and adipose tissue. In the protein of these three tissues, we observed an HF-induced increase in  $\Delta^{15}\text{N}$ , but according to different patterns: prolonged HF exposure covering both the perinatal and post-weaning periods was required for the small intestine and *tibialis anterior* muscle, whereas for adipose tissue post-weaning exposure alone was sufficient, and perinatal exposure alone tended to be sufficient, to attain a significant effect. According to our previous works<sup>(29,31)</sup>, the HF-induced increase in protein  $\Delta^{15}\text{N}$  indicated with confidence a more preferential catabolic use of AA (i.e. a higher  $p_{\text{ox}}$ ) in the small intestine and the opposite (i.e. a lower  $p_{\text{ox}}$ ) in the *tibialis anterior*. In contrast, as adipose tissue had not been considered in our previous works, a metabolic interpretation of its increase in  $\Delta^{15}\text{N}$  levels was not straightforward. Because a compelling body of evidence supports the reduced expression and activity of enzymes involved in branched-chain AA oxidation (i.e. branched-chain aminotransferase and  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase) in adipose tissue in the context of both genetic and diet-induced obesity and insulin resistance<sup>(18,59,60)</sup>, higher  $\Delta^{15}\text{N}$  levels likely indicate less preferential catabolic orientation of AA metabolism in adipose tissue (i.e. a lower  $p_{\text{ox}}$ ), as is the case in muscle.

Regarding the *tibialis anterior* muscle, the rise in its  $\Delta^{15}\text{N}$  level after prolonged HF nutrition – during both the perinatal and post-weaning periods – indicated a lower  $p_{\text{ox}}$  and thus a stronger preferential anabolic orientation of its AA metabolism. Higher protein synthesis in some muscles was likely in the specific context of our study, as it encompassed the early phase of the development of obesity where the gain in fat mass is accompanied by a concomitant gain in lean and muscle masses, as observed here and reported elsewhere<sup>(61)</sup>. During this early phase, the gain in muscle mass has been shown to be associated with an increased fractional protein synthesis rate in the *tibialis anterior* muscle but not in the *soleus* muscle<sup>(61)</sup>, which is exactly in line with our observation of a  $\Delta^{15}\text{N}$  increase in the former but not in the latter. Furthermore, limited evidence has suggested that branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase activity, the rate-limiting step in branched-chain AA oxidation, is reduced in the muscle of obese rodents<sup>(62)</sup>. The rise in  $\Delta^{15}\text{N}$  levels in the protein of the *tibialis anterior* muscle after prolonged HF exposure could therefore result from an increased



anabolic use and/or a decreased catabolic use of AA in this tissue. Such a reduction in the relative allocation of AA to oxidation in specific muscles may contribute to the elevation of circulating levels of branched-chain AA and some other AA during obesity and insulin resistance.

Regarding the small intestine, its increased  $\Delta^{15}\text{N}$  levels after prolonged HF nutrition – during both the perinatal and post-weaning periods – indicated a higher  $p_{\text{ox}}$  and thus a weaker preferential anabolic orientation of its AA metabolism. There is a paucity of data regarding the effect of HF feeding on intestinal protein metabolism. In a mouse model of obesity, some cellular changes have recently been observed in the small intestine epithelium that might impair the synthesis of proteins, and particularly those involved in the gut barrier function<sup>(63)</sup>. Interestingly, the similarity between the  $\Delta^{15}\text{N}$  profiles of proteins in the small intestine and faeces reflected the important contribution of enterocyte shedding and intestinal mucins to the N flux entering the colon, and suggests that faeces might be considered as a more accessible proxy for the small intestine when seeking to determine isotopic biomarkers of diet-induced metabolic orientations.

Apart from the above-mentioned effects of the dietary group on  $\Delta^{15}\text{N}$  values in some tissues, we found significant correlations between the  $\Delta^{15}\text{N}$  values in other tissues and certain indicators of their protein anabolism efficiency, which depends on their efficiency of AA anabolic use for protein synthesis *v.* catabolic use for oxidation ( $p_{\text{ox}}$ ). In particular,  $\Delta^{15}\text{N}$  levels in liver protein were negatively correlated with liver protein anabolism efficiency, and  $\Delta^{15}\text{N}$  in *gastrocnemius* muscle protein was positively correlated with lean mass, which is known to increase in line with muscle mass and muscle protein anabolism efficiency. Such inverse associations between protein  $\Delta^{15}\text{N}$  and efficiency of AA anabolic (*v.* catabolic) use in liver and muscle were in line with our previous model predictions, and resulted from the opposite signs of isotopic fractionation associated with AA catabolism in liver and muscle<sup>(31)</sup>. The negative association between liver protein  $\Delta^{15}\text{N}$  and anabolism efficiency had previously been confirmed experimentally in a metabolic tracer study in ruminants, where we have shown that the  $\Delta^{15}\text{N}$  of liver-synthesised plasma proteins increases linearly with liver AA oxidation and urea production<sup>(29)</sup>, but the present study is the first to have demonstrated a positive association between muscle protein  $\Delta^{15}\text{N}$  levels and lean mass. Our results therefore indicate that in different splanchnic and peripheral tissues  $\Delta^{15}\text{N}$  could be used as a valuable biomarker of protein anabolism in the considered tissue.

#### Strengths and limitations of the present study

By using a new isotopic approach consisting in analysing the natural abundances of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in tissue proteins, we were able to unveil the effects of HF feeding on the nutrient routing to tissue AA and on the relative metabolic use of tissue AA for oxidation *v.* protein synthesis ( $p_{\text{ox}}$ ), respectively. The change in lipid content between diets was confounded with a change in CHO content and profile, so that the HF diet was enriched in fat but also in sucrose compared with the NF diet, a classic dietary pattern for mimicking the contrasted profiles of energy intake in humans while being able to induce obesity and insulin resistance with the fat- and sucrose-enriched diet<sup>(64,65)</sup>. During

our nutrient routing estimation by  $^{13}\text{C}$  data analysis, for identifiability reasons, the protein routing and trophic steps were assumed to be equal across the diets despite their different compositions. An identical protein routing between diets is very likely given their identical protein content, inasmuch as protein routing has been found notably stable – about 75% – under a broad range of dietary compositions, and our present estimate for protein routing was indeed strictly in line with these previous estimates<sup>(43,44,49,56)</sup>. In contrast, an identical trophic step between diets of different CHO and lipid contents and profiles is a more questionable simplifying assumption that could have biased our estimates for the CHO and lipid routings, but probably only marginally. Indeed, numerically, our estimate for trophic step only marginally affected the CHO and lipid routings calculated in Equations (7) and (8) (e.g. a 25% variation in the trophic step value used in these equations resulted in an absolute difference of <1% in the calculated CHO and lipid routing values). Our routing estimates for erythrocytes may have also been biased because of incomplete isotopic turnover in this tissue, but only marginally as the erythrocytes isotopic values should have reached 80–90% of their final equilibrium values at 100 d, when considering that 130–180 d are required for complete isotopic turnover in this tissue<sup>(31,55)</sup>. A last limitation relates to the interpretation of the diet-induced  $\Delta^{15}\text{N}$  differences in terms of  $p_{\text{ox}}$ , which was based on previous modelling and experimental findings rather than by a devoted modelling analysis of the present data set, because the data set at hand was insufficient for being analysed by such a complex multi-compartmental model as the one we previously developed<sup>(31)</sup>.

In conclusion, our results show that HF feeding increases both dietary fat deposition in adipose tissues and dietary fat routing to the protein of all tissues via AA synthesis from tri-carboxylic acid cycle intermediates. In addition, our  $\Delta^{15}\text{N}$  data also support HF-induced changes to the relative orientation of AA metabolism towards oxidation *v.* protein synthesis in three tissues, with more oxidation in the small intestine but less in the *tibialis anterior* muscle and adipose tissue.

#### Acknowledgements

The authors thank N. Khodorova for her technical assistance in isotopic measurements, and Dr M. Sebilo and V. Vauzy (UMR 7618 BIOEMCO, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) for supplying the internal standard for isotopic measurements.

O. L. M. was supported by a PhD grant from the doctoral school ABIES (ED 581).

The authors' contributions are as follows: H. F. and J.-F. H. formulated the research question in this ancillary study derived from a larger experiment designed by S. P. and D. Z. S. P. conducted the animal protocol and tissue sampling, O. L. M. conducted the tissue preparation and isotopic analysis and H. F. and N. P. conducted the isotopic data modelling and analysis in collaboration with J.-F. H. and F. M. H. F., J.-F. H., O. L. M. and F. M. analysed and interpreted the data. All authors were involved in the preparation of the manuscript and approved the final manuscript. H. F. had primary responsibility for the final content.

The authors declare that there are no conflicts of interest.



### Supplementary material

For supplementary material/s referred to in this article, please visit <https://doi.org/10.1017/S0007114518000326>

### References

1. Astrup A, Dyerberg J, Selbeck M, *et al.* (2008) Nutrition transition and its relationship to the development of obesity and related chronic diseases. *Obes Rev* **9**, 48–52.
2. Danaei G, Lu Y, Singh GM, *et al.* (2014) Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endo* **2**, 634–647.
3. Blundell JE, Stubbs RJ, Golding C, *et al.* (2005) Resistance and susceptibility to weight gain: individual variability in response to a high-fat diet. *Physiol Behav* **86**, 614–622.
4. Levin EB (2007) Why some of us get fat and what we can do about it. *J Physiol-London* **583**, 425–430.
5. Stoger R (2008) The thrifty epigenotype: an acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? *Bioessays* **30**, 156–166.
6. Azzout-Marniche D, Chaumontet C, Nadkarni NA, *et al.* (2014) Food intake and energy expenditure are increased in high-fat-sensitive but not in high-carbohydrate-sensitive obesity-prone rats. *Am J Physiol-Reg I* **307**, R299–R309.
7. Levin BE, DunnMeynell AA, Balkan B, *et al.* (1997) Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* **273**, R725–R730.
8. Bray GA & Popkin BM (1998) Dietary fat intake does affect obesity! *Am J Clin Nutr* **68**, 1157–1173.
9. Poudyal H, Panchal SK, Ward LC, *et al.* (2012) Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E1472–E1482.
10. Hardy OT, Czech MP & Corvera S (2012) What causes the insulin resistance underlying obesity? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **19**, 81–87.
11. Nagao M, Asai A, Sugihara H, *et al.* (2015) Fat intake and the development of type 2 diabetes. *Endocr J* **62**, 561–572.
12. Ainge H, Thompson C, Ozanne SE, *et al.* (2011) A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control. *Int J Obesity* **35**, 325–335.
13. Desai M, Jellyman JK, Han G, *et al.* (2014) Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* **211**, 237.e231–237.e213.
14. Li M, Sloboda DM & Vickers MH (2011) Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res* **2011**, 592408.
15. Guillet C, Masgrau A & Boirie Y (2011) Is protein metabolism changed with obesity? *Curr Opin Clin Nutr* **14**, 89–92.
16. Katsanos CS & Mandarino IJ (2011) Protein metabolism in human obesity: a shift in focus from whole-body to skeletal muscle. *Obesity* **19**, 469–475.
17. Lotta LA, Scott RA, Sharp SJ, *et al.* (2016) Genetic predisposition to an impaired metabolism of the branched-chain amino acids and risk of type 2 diabetes: a Mendelian randomisation analysis. *Plos Med* **13**, e1002179.
18. Lynch CJ & Adams SH (2014) Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* **10**, 723–736.
19. Newgard CB, An J, Bain JR, *et al.* (2009) A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab* **9**, 311–326.
20. Tulipani S, Palau-Rodriguez M, Alonso AM, *et al.* (2016) Biomarkers of morbid obesity and prediabetes by metabolomic profiling of human discordant phenotypes. *Clin Chim Acta* **463**, 53–61.
21. Wang TJ, Larson MG, Vasani RS, *et al.* (2011) Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* **17**, 448–U483.
22. Yamakado M, Nagao K, Imaizumi A, *et al.* (2015) Plasma free amino acid profiles predict four-year risk of developing diabetes, metabolic syndrome, dyslipidemia, and hypertension in Japanese population. *Sci Rep* **5**, 11918.
23. She PX, Van Horn C, Reid T, *et al.* (2007) Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E1552–E1563.
24. Chevalier S, Marliss EB, Morais JA, *et al.* (2005) Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *Am J Clin Nutr* **82**, 355–365.
25. Denne SC, Brechtel G, Johnson A, *et al.* (1995) Skeletal-muscle proteolysis is reduced in noninsulin-dependent diabetes-mellitus and is unaltered by euglycemic hyperinsulinemia or intensive insulin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 2371–2377.
26. Gougeon R, Morais JA, Chevalier S, *et al.* (2008) Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* **31**, 128–133.
27. Patterson BW, Horowitz JF, Wu GY, *et al.* (2002) Regional muscle and adipose tissue amino acid metabolism in lean and obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E931–E936.
28. Foullet H, Bos C, Gaudichon C, *et al.* (2002) Approaches to quantifying protein metabolism in response to nutrient ingestion. *J Nutr* **132**, 3208s–3218s.
29. Cantalapiedra-Hijar G, Origués-Marty I, Sepchat B, *et al.* (2015) Diet – animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *Br J Nutr* **113**, 1158–1169.
30. Poupin N, Bos C, Mariotti F, *et al.* (2011) The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet 15N discrimination factors in laboratory rats. *PLoS ONE* **6**, e28046.
31. Poupin N, Mariotti F, Huneau JF, *et al.* (2014) Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003865.
32. O'Brien DM (2015) Stable isotope ratios as biomarkers of diet for health research. *Ann Rev Nutr* **35**, 565–594.
33. Martínez del Río C & Wolf BO (2005) Mass-balance models for animal isotopic ecology. In *Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates*, pp. 141–174 [JM Starck and T Wang, editors]. Enfield, NH: Science Publishers, Inc.
34. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, *et al.* (2004) Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**, 2889–2896.
35. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, *et al.* (2005) Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**, 2497–2506.
36. Hatch KA, Crawford MA, Kunz AW, *et al.* (2006) An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in hair. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**, 3367–3373.
37. Mekota AM, Grupe G, Ufer S, *et al.* (2006) Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**, 1604–1610.
38. Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, *et al.* (2006) Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom* **20**, 2973–2978.



39. Cheng L, Sheahan A, Gibbs S, *et al.* (2013) Technical note: nitrogen isotopic fractionation can be used to predict nitrogen-use efficiency in dairy cows fed temperate pasture. *J Anim Sci* **91**, 5785–5788.
40. Gaye-Siesseger J, Focken U, Abel H, *et al.* (2004) Individual protein balance strongly influences  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* **91**, 90–93.
41. Robbins CT, Felicetti LA & Sponheimer M (2005) The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* **144**, 534–540.
42. McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, *et al.* (2003) Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* **102**, 378–390.
43. Fernandes R, Nadeau M-J & Grootes PM (2012) Macronutrient-based model for dietary carbon routing in bone collagen and bioapatite. *Archaeol Anthropol Sci* **4**, 291–301.
44. Kurlle CM, Koch PL, Tershy BR, *et al.* (2014) The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ) in mammalian omnivores. *Isotopes Environ Health Stud* **50**, 307–321.
45. MacAvoy SE, Macko SA & Arneson LS (2005) Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Can J Zool* **83**, 631–641.
46. Wolf N, Newsome SD, Peters J, *et al.* (2015) Variability in the routing of dietary proteins and lipids to consumer tissues influences tissue-specific isotopic discrimination. *Rapid Commun Mass Spectrom* **29**, 1448–1456.
47. Butz DE, Casperson SL & Whigham LD (2014) The emerging role of carbon isotope ratio determination in health research and medical diagnostics. *J Anal Atom Spectrom* **29**, 594–605.
48. Hatch KA, Sacksteder KA, Treichel IW, *et al.* (1995) Early Detection of catabolic state via change in C-13/C-12 ratios of blood proteins. *Biochem Bioph Res Commun* **212**, 719–726.
49. Hobbie EA (2017) Dietary protein content and tissue type control C-13 discrimination in mammals: an analytical approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* **31**, 639–648.
50. Zalko D, Canlet C, Tremblay-Franco M, *et al.* (2017) Combined effects of perinatal exposure to bisphenol A and high fat diet in rats. 9th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors – COW2017, 2–5 May 2017, Copenhagen, Denmark.
51. Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939–1951.
52. Dell RB, Holleran S & Ramakrishnan R (2003) Sample size determination (vol 43, pg 207, 2002). *ILAR J* **44**, 239–239.
53. Benjamini Y & Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Statist Soc Ser B (Methodological)* **57**, 289–300.
54. Arneson LS & MacAvoy SE (2005) Carbon, nitrogen, and sulfur diet-tissue discrimination in mouse tissues. *Can J Zool* **83**, 989–995.
55. Kurlle CM (2009) Interpreting temporal variation in omnivore foraging ecology via stable isotope modelling. *Funct Ecology* **23**, 733–744.
56. MacAvoy SE, Arneson LS & Bassett E (2006) Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* **150**, 190–201.
57. Kraeer K, Arneson LS & MacAvoy SE (2014) The intraspecies relationship between tissue turnover and metabolic rate in rats. *Ecol Res* **29**, 937–947.
58. Yoneyama T, Ohta Y & Ohtani T (1983) Variations of natural  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  abundances in the rat tissues and their correlation. *Radioisotopes* **32**, 330.
59. Estrada-Alcalde I, Tenorio-Guzman MR, Tovar AR, *et al.* (2017) Metabolic fate of branched-chain amino acids during adipogenesis, in adipocytes from obese mice and C2C12 myotubes. *J Cell Biochem* **118**, 808–818.
60. Polakof S, Rémond D, David J, *et al.* (2017) Time-course changes in circulating branched-chain amino acid levels and metabolism in obese Yucatan minipig. *Nutrition* (In the Press).
61. Masgrau A, Mishellany-Dutour A, Murakami H, *et al.* (2012) Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *J Physiol* **590**, 5199–5210.
62. Adams SH (2011) Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. *Adv Nutr* **2**, 445–456.
63. Nakadate K, Motojima K, Hirakawa T, *et al.* (2016) Progressive depletion of rough endoplasmic Reticulum in epithelial cells of the small intestine in monosodium glutamate mice model of obesity. *Biomed Res Int* **2016**, 5251738.
64. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, *et al.* (2012) Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr* **4**, 32.
65. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, *et al.* (2016) Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)* **13**, 65.

## Supplemental data

Table S1. Natural abundances of nitrogen stable isotopes in tissue proteins and faeces.

	NF-NF	HF-NF	NF-HF	HF-HF	<i>p</i> values		
					peri	post	peri x post
<i>n</i>	9	8	7	8			
Protein $\Delta^{15}\text{N}$ (‰)							
Small intestine	2.1 $\pm 0.3^a$	2.0 $\pm 0.2^a$	2.1 $\pm 0.2^a$	2.5 $\pm 0.3^b$	<0.05	<0.01	<0.05
Liver	3.7 $\pm 0.15$	3.7 $\pm 0.29$	3.6 $\pm 0.17$	3.7 $\pm 0.27$			
AT	3.1 $\pm 0.3^a$	3.3 $\pm 0.2^{ab}$	3.6 $\pm 0.2^b$	3.4 $\pm 0.1^b$		<0.01	<0.01
TA muscle	3.2 $\pm 0.2^a$	3.2 $\pm 0.1^a$	3.1 $\pm 0.2^a$	3.5 $\pm 0.2^b$	<0.01	<0.05	<0.01
G muscle	3.5 $\pm 0.2$	3.5 $\pm 0.2$	3.5 $\pm 0.3$	3.6 $\pm 0.1$			
EDL muscle	3.7 $\pm 0.1$	3.7 $\pm 0.2$	3.7 $\pm 0.1$	3.8 $\pm 0.3$			
S muscle	4.2 $\pm 0.1$	4.1 $\pm 0.2$	4.2 $\pm 0.2$	4.1 $\pm 0.1$			
Heart	5.1 $\pm 0.3$	4.9 $\pm 0.4$	5.0 $\pm 0.3$	4.8 $\pm 0.3$			
Plasma	4.6 $\pm 0.2$	4.6 $\pm 0.2$	4.7 $\pm 0.1$	4.7 $\pm 0.2$			
RBC	2.2 $\pm 0.1$	2.2 $\pm 0.1$	2.3 $\pm 0.1$	2.3 $\pm 0.1$			
Faeces $\Delta^{15}\text{N}$	0.2 $\pm 0.3^{ab}$	0.0 $\pm 0.3^a$	0.4 $\pm 0.3^b$	0.9 $\pm 0.3^c$		<0.0001	<0.01

NF-NF, rats exposed to the normal-fat (NF) diet during the perinatal and post-weaning periods; NF-HF, rats exposed to the NF diet during the perinatal period and the high-fat (HF) diet during the post-weaning period; HF-NF, rats exposed to the HF diet during the perinatal period and the NF diet during the post-weaning period; HF-HF, rats exposed to the HF diet during both the perinatal and post-weaning periods. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). Peri, perinatal diet; post, post-weaning diet. AT, adipose tissue; EDL, *Extensor digitorum longus*; G, *Gastrocnemius*; RBC red blood cells; S, *Soleus*; TA, *Tibialis anterior*. Protein and faeces  $\Delta^{15}\text{N}$  values are the differences between protein or faeces  $\delta^{15}\text{N}$  and dietary protein  $\delta^{15}\text{N}$ .

Table S2. Routing coefficients of dietary macronutrients to tissue proteins in rats fed a normal or high fat diet.

		Small intestine	Liver	Plasma	RBC	TA muscle	G muscle	EDL muscle	S muscle	Heart
Trophic step (‰)		0.70	0.99	0.88	0.12	0.61	0.55	0.80	0.52	0.53
Protein routing (%)		74.3	73.3	71.8	79.7	73.9	73.9	75.5	71.8	73.4
CHO routing (%)	NF	22.3	23.2	24.5	17.6	22.7	22.6	21.2	24.4	23.1
	HF	13.6	14.2	15.0	10.8	13.9	13.8	13.0	14.9	14.1
Lipid routing (%)	NF	3.4	3.6	3.8	2.7	3.5	3.5	3.3	3.7	3.5
	HF	12.1	12.6	13.3	9.5	12.3	12.3	11.5	13.2	12.5

The protein, CHO and lipid routings are the proportions of dietary protein, CHO and lipid carbon used for amino acid synthesis and consequently routed to carbon in tissue proteins, and the trophic step is the difference in  $\delta^{13}\text{C}$  between dietary and tissue proteins due to isotopic fractionation along metabolic pathways (i.e., the coefficients  $p$ ,  $c$ ,  $1-p-c$  and  $TS$  of equation [6], see Materials and Methods). The protein routing and trophic step were assumed to be equal across the diets, while the CHO and lipid routings differed in rats fed with the normal-fat (NF) or high-fat (HF) diet. EDL, *Extensor digitorum longus*; G, *Gastrocnemius*; RBC red blood cells; S, *Soleus*; TA, *Tibialis anterior*.



Étude 2 :  $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$  of proteins and amino acids are isotopic biomarkers of the metabolic orientations induced by energy restriction in obese rats

## **Étude 2 : Les $\Delta^{15}\text{N}$ et $\Delta^{13}\text{C}$ des protéines et des acides aminés sont des biomarqueurs isotopiques des orientations métaboliques induites par la restriction énergétique chez le rat obèse**

Jean-François Huneau, Olivier L. Mantha, Guillaume Galmiche, Véronique Mathé, François Mariotti, Dominique Hermier et Hélène Fouillet.

### **Contexte et objectifs**

Les abondances naturelles du  $^{15}\text{N}$  et du  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$ ) des protéines tissulaires pourraient constituer des biomarqueurs intégrés des adaptations métaboliques, en réponse à un stress nutritionnel. Les études en conditions contrôlées venant soutenir cette hypothèse restent cependant peu nombreuses et les mécanismes à l'origine des variations de  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$  sont encore largement discutés.

### **Méthodes**

Des rats obèses ont été maintenus pendant 8 semaines sous un régime gras avec accès *ad libitum* à l'alimentation, ou soumis à une restriction énergétique progressive avec une diminution de l'apport glucidique et maintien de l'apport protéique. La composition corporelle, les  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires et de leurs acides aminés constitutifs, ainsi que le niveau d'expression des ARN codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme hépatique des acides aminés ont été mesurés à la fin de l'expérience.

### **Résultats et discussion**

Par rapport aux rats avec accès libre à l'alimentation, la restriction énergétique induit une perte de poids avec une réduction significative des tailles de *pools* protéiques de l'intestin, du cœur et du foie, et une réduction mineure de celles des muscles squelettiques. Ces modifications sont associées à une augmentation des  $\Delta^{15}\text{N}$  dans l'urine et dans les protéines

hépatiques constitutives et exportées (plasma), une diminution du  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines du cœur et pas de changement dans le muscle squelettique. Ces variations s'accompagnent d'une augmentation parallèle du  $\Delta^{15}\text{N}$  de la lysine protéique dans les protéines plasmatiques et de l'intestin, et de sa diminution dans les protéines du cœur. L'expression des ARN codant pour des enzymes impliquées dans l'oxydation des acides aminés et en particulier de la lysine (l'aminocarboxymuconate semialdéhyde synthétase) est accrue chez les rats soumis à une restriction énergétique par rapport à ceux ayant un libre accès à l'alimentation.

La restriction énergétique est également associée à une diminution du  $\Delta^{13}\text{C}$  des protéines dans l'ensemble des tissus ainsi qu'à une diminution du  $\Delta^{13}\text{C}$  de Ala et dans une moindre mesure de Glx et Asx dans le plasma, l'intestin, le cœur et le muscle squelettique.

## **Conclusion**

Ces résultats montrent de façon claire que l'augmentation du  $\Delta^{15}\text{N}$  de l'urine et des protéines hépatiques constitutives et exportées sont des signatures isotopiques de la restriction énergétique, et reflètent une partition accrue des acides aminés vers les voies oxydatives au niveau de l'embranchement métabolique hépatique. Ils montrent également que les  $\Delta^{13}\text{C}$  des protéines, et plus encore ceux des acides aminés non-indispensables (Ala, Glx et Asx) reflètent les flux de carbones issus des différents macronutriments alimentaires vers les acides aminés corporels et sont en particulier affectés par une diminution de l'apport glucidique.

**$\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$  of proteins and amino acids are isotopic biomarkers of the metabolic orientations induced by energy restriction in obese rats.**

Huneau J.F.<sup>1\*†</sup>, Mantha O.L.<sup>1†</sup>, Galniche G.<sup>1</sup>, Mathé V.<sup>1</sup>, Mariotti F.<sup>1</sup>, Hermier D.<sup>1</sup>, Fouillet H.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 75005, Paris, France.

† Both authors contributed equally to this study

\*Corresponding author ([jean-francois.huneau@agroparistech.fr](mailto:jean-francois.huneau@agroparistech.fr))

Running title : isotopic biomarkers of energy restriction in the rat

Key words : energy restriction, amino acid oxidation, isotope natural abundance

## Abstract

A growing body of evidence support a role for  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  natural abundance ( $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$ ) in tissue protein as biomarker of metabolic adaptation to nutritional stress. However, the mechanism involved in  $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$  variation during nutritional stress remain poorly understood. In the present study, obese rats were submitted for 8 weeks to a gradual energy restriction and the  $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$  of protein and constitutive amino acids, as well as body composition and the expression of enzyme involved in amino acid metabolism, were measured at the end of the experiment. Energy restriction-induced weight loss was associated with a significant reduction in nitrogen pool size in the intestine, heart and liver, with only minor changes in skeletal muscles. As a consequence of energy restriction, the  $\Delta^{15}\text{N}$  increased in urine, liver and plasma protein, decreased in heart protein and remained unchanged in skeletal muscle. In parallel, a decrease in the  $\Delta^{13}\text{C}$  of protein was observed in every tissues. In energy restricted rats, the  $\Delta^{15}\text{N}$  of Lys increased in plasma, intestine and muscle protein and decreased in heart protein, while a decrease in the  $\Delta^{13}\text{C}$  of Ala and to a lesser extent Glx and Asx was observed in these four tissues. Expression of mRNA coding for aminocarboxymuconate semialdehyde synthase, ornithine aminotransferase and branched-chain ketoacid deshydrogenase increased and that of asparagine synthetase decreased in the liver of restricted rats.

These results demonstrate that the  $\Delta^{15}\text{N}$  of urine, liver and plasma proteins are isotopic footprints of energy restriction and reflect an increased partition of amino acids toward oxidative pathways at the level of liver metabolic branched-point. The decrease in  $\Delta^{13}\text{C}$  reflect a reduction in the routing of glucose carbon towards Ala, Glx and Asx, as a consequence of carbohydrate restriction.

## Introduction

Natural abundance of nitrogen and carbon heavy isotope ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) have been used for decades in ecological studies to examine organism's position in food web and more recently in nutritional epidemiology as a biomarkers of the diet (1–6). Their utilization is based on the observation that body tissues isotopic composition reflect that of the diet plus a small fractionation factor called trophic step or discrimination factor, equal to 1‰ for  $^{13}\text{C}$  and 3-4‰ for  $^{15}\text{N}$  according to McCutchan et al. (7). These discrimination factors are the consequence of equilibrium and kinetic isotope effects in metabolic pathways involved in nitrogen and carbon metabolism and favoring the utilization of the lighter isotope ( $^{14}\text{N}$  and  $^{12}\text{C}$ ). Using a multicompartimental analysis of  $\delta^{15}\text{N}$  measurements in numerous metabolic pools in rats, we have shown that  $^{15}\text{N}$  bioaccumulation in the body is a consequence of isotope effects occurring in multiple metabolic pathways including protein synthesis and degradation, amino acid transport, transamination, urea synthesis and urea recycling in the gut (8).

A growing body of evidence also suggest that beyond their interest as dietary proxies, stable isotope abundance also vary between subjects according to their metabolic orientation. In particular, studies in different species suggest that  $\delta^{15}\text{N}$  reflects fluctuation of nitrogen balance induced by nutritional stress. Hobson *et al.* were among the first to report an increase in the  $\delta^{15}\text{N}$  of the liver and muscle during the incubation period corresponding to a 4-weeks fast in wild geese (*Chen rossii*) (9). An increase in urinary  $\delta^{15}\text{N}$  has since be reported in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and more recently in bonobos (*Pan paniscus*) and artic ground squirrel (*Urocytellus Parryii*) during episodes of negative nitrogen and/or energy balance (10–12).

In human, most available data relate to evolution of  $\delta^{15}\text{N}$  along the hair stem during a nutritional stress, as sequentially-synthetized hair proteins remain inert after deposition and

represent an easily accessible record of the metabolic history. Fuller *et al.* have shown that in pregnant women, weight loss due to morning sickness could be traced by an increase in the  $\delta^{15}\text{N}$  values of hairs (13). Similarly,  $\delta^{15}\text{N}$  in hair protein increase during episode of starvation in patients suffering of anorexia nervosa and decrease during nutritional rehabilitation (14,15). Fewer data are available regarding  $\delta^{13}\text{C}$  variations during metabolic stress but studies in human and mice suggest a decrease in  $\delta^{13}\text{C}$  in exhaled breath and in hair protein during catabolic episode associated with energy restriction or acute inflammation (15–17). Altogether, these data suggest that stable isotope abundance might represent biomarker of catabolic states.

However, the mechanism involved in stable isotope natural abundance variation during nutritional stress remains poorly understood. It has been suggested that during protein restriction, tissue proteolysis resulted in an increased contribution of  $^{15}\text{N}$ -enriched endogenous amino acid to proteolysis to the free AA pool used for protein synthesis and/or ureogenesis, thus leading to a further enrichment of tissue proteins and urine (18). Alternatively, the increase in  $\delta^{15}\text{N}$  may also result from the activation of  $^{14}\text{N}$ -preferring transamination and deamination metabolic pathways occurring during protein and/or energy restriction (8). Regarding  $\delta^{13}\text{C}$ , a possible explanation for the nutritional stress-associated decrease is an increased oxidation of  $^{13}\text{C}$ -poor body lipids leading to a  $^{13}\text{C}$  depletion of  $\text{CO}_2$  and keto-acid precursors used for amino-acid synthesis (17,19). However, because most of the above mentioned studies are observational, with little or no control of the isotopic composition of the diet (9,10,13–15,19), changes in tissue and urinary  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  may also in part reflect changes in isotopic exposition through the diet. In this regard, experimental studies with strictly controlled nutritional conditions and constant dietary isotopic

environment may help to understand how are stable isotope natural abundances in tissues and urine affected by nutritional stress.

In the present study, both the nutritional intake and the isotopic composition of the diet fed to rats was carefully controlled throughout the experiment, comprising a first period of ad-libitum feeding and second period of gradual energy restriction. The  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of protein and of ten of their constitutive amino acid were measured in different tissues at the end of the experiment. Furthermore, in order to gain insight on the mechanism underlying the restriction-induced changes in  $\delta^{15}\text{N}$ , the expression of mRNA coding for enzymes involved in nitrogen transfer and elimination was also measured.

## **Material and methods**

### ***Diet and animals***

A detailed description of animal protocol can be found in Galmiche et al. (20). Briefly, 48 24-week old male Wistar Rats weighing 475 g were individually housed and after a 1-week acclimatization to housing conditions randomly allocated into 4 groups (OLE-AL, OLE-R, ALA-R and LC-R). Only rats allocated to the OLE-AL and OLE-R groups were considered in this ancillary study.

During a first 4-week induction period, rats from the OLE-AL and OLE-R groups had ad-libitum access to a high-fat induction diet containing (as energy) 15.6% protein, 29.9% carbohydrate and 54.5% lipids. Thereafter, rats from the OLE-AL remained with ad-libitum access to food for 8 consecutive weeks while rats from the OLE-R groups were submitted to a gradual energy restriction with the following pattern: 75% of the spontaneous energy intake measured during the last week of the induction period for 1 week, 60% for the next 2 weeks and 50% for the remaining 5 weeks. Energy restriction was achieved by both adjusting the amount of food provided to the rats and adjusting diet composition to provide the same amount of protein (3.22 g/d) and micronutrient and the same proportion of energy as lipids throughout the experiment. Detailed compositions of the diets are presented in table 1.

Food intake and body weight were monitored on a weekly basis during the induction and ad-libitum/restriction period. At the end of the ad-libitum/restriction period, rats were fasted overnight, deeply anesthetized by isoflurane inhalation and killed by exsanguination. Urine was collected in the bladder and plasma was prepared by centrifugation from blood collected on heparin. The following organ and tissues were dissected, weighed and snap-frozen in liquid nitrogen : small intestine, liver, heart, hind-limb skeletal muscles (gastrocnemius,

soleus, tibialis anterior), epididymal adipose tissue and subcutaneous adipose tissue. All samples were stored at -80°C until subsequent analysis.

### ***Sample preparation***

Protein fraction were prepared from frozen tissues and plasma by sulfosalicylic acid precipitation as previously described (21) except that a delipidation step was added at the end of sample preparation to remove contaminating triglycerides and phospholipids. Briefly, 1 mL of 1:1 ethanol/ether was added to the freeze-dried protein pellet and mixed for 1 hour on a tube rotator. The solvent was discarded and this step was repeated once. After a brief centrifugation, the delipidated protein pellet was collected, the remaining solvent eliminated by centrifugal evaporation and the sample was stored at room temperature until further analyses.

For amino acids analysis, samples preparation was done at the UC Davis stable isotope facility as previously described (22). Briefly, 5-10 mg of delipidated tissue or dietary protein were hydrolyzed with 6M HCl at 150°C for 70 min under nitrogen. After hydrolysis, the samples were dried in heating block at 60°C under a stream of nitrogen and re-suspended in 200 µl 0.1 M HCl. Methoxycarbonyl amino acid methyl esters (AA-MCF) were prepared by reacting 100 µL of amino acid solution and 20 µL of internal reference (norleucine) with 15 µL methyl chloroformate. AA-MCF were extracted in 100 µL chloroform dried with 0.1 mg of sodium sulfate.

### ***Elemental and isotopic determinations***

The carbon and nitrogen content and the natural isotope ratio of nitrogen and carbon were measured in the major diet macronutrients and in delipidated protein fraction using an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime, VG-instruments, Manchester, UK) coupled to an elemental analyzer (EA 3000. Eurovector, Italy). Tyrosine was used as an external standard to

correct for possible variations in the raw values determined by the mass spectrometer. Typical replicate measurement error for tyrosine standard were  $\pm 0.1\%$  for  $^{15}\text{N}$  and  $\pm 0.05\%$  for  $^{13}\text{C}$ . The compound-specific natural isotope ratio of AA-MCF were measured by gas-chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) at the UC Davis stable isotope facility as described in Walsh et al. (22) AA-MCF were separated on a Agilent DB-23 column (30m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and converted to  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2$  in a combustion reactor at  $1000^\circ\text{C}$ . Water was removed through a nafion<sup>TM</sup> dryer and the isotope ratio of  $\text{N}_2$  and  $\text{CO}_2$  were measured using a Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (ThermoFisher). Isotopic calibration of AA-MCF was performed using the internal standard norleucine.

The natural abundance of  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  in the samples were expressed using the delta notation, according to the following equation:

$$\delta = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] \times 1000$$

Where  $R_{\text{sample}}$  is the nitrogen or carbon isotope ratio of the heavier to the lighter isotope ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in the sample and  $R_{\text{standard}}$  the same ratio for internationally defined standards (atmospheric  $\text{N}_2$  for nitrogen,  $R_{\text{standard}} = 0.0036765$  and Vienna Pee-Dee belemnite for carbon,  $R_{\text{standard}} = 0.0112372$ , respectively).

Discrimination factors for N and C ( $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$ ) were calculated by subtracting the values of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of dietary proteins or individual amino-acid present in dietary proteins to the  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  measured in tissue proteins and amino acids. The  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of dietary carbohydrates, lipids, proteins and individual amino acids used for discrimination factor calculation are presented in **supplemental table S1**.

## Gene expression

Because nitrogen discrimination factor in a given tissue is expected to reflect the relative orientation of free amino acid between oxidation and protein synthesis, the expression of gene coding for enzymes involved in amino-acid oxidation was measured in the liver using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (Q-RT-PCR). Total RNA was extracted from liver samples (50 mg) using Trizol reagent (Invitrogen) and complementary DNA (cDNA) was synthesized as previously described (20).

Target genes were those involved in nitrogen transfer between amino acids and in amino acid oxidation : glutamate-pyruvate-transaminase (GPT), arginase 2 (ARG2), glutaminase (GLS2), Histidase (HAL), tyrosine amino-transferase (TAT), serine/threonine desaminase (SDS), ornithine aminotransferase (OAT), branched chain ketoacid deshydrogenase a (BCKDHa), asparagine synthetase (ASNS), aminocarboxymuconate semialdehyde synthase (AASS) and pyrroline-5-carboxylate reductase (PYCR2). The primers listed in **supplemental table S2** were used for quantitative PCR on a 7300 real-time PCR system as previously described (reference). Gene expression level was calculated using the  $2^{-\Delta CT}$  formula using 18S mRNA as the reference gene and expressed as % of the expression level measured in the OLE-AL group.

## Statistical analysis

All results are expressed as means  $\pm$  standard error. Statistical analysis was carried out using one analysis of variance with group and tissue as fixed effect and rat as a random factor (GLM procedure, SAS 9.1, SAS institute). Bonferoni corrections were used for multiple correlations and post-hoc comparisons and correlations.

## Results

### ***Growth and body composition***

Expectedly, weight gain during the first *ad-libitum* feeding period was the same in the two groups (data not shown), with a weight of  $566 \pm 8$  g at the end of the first period. Daily energy intake before induction was  $61.86 \text{ kJ} \cdot 100\text{g}^{-1}$  body weight. During the second period, rats from the OLE-AL group continued to put on weight, while energy restriction induced a 15% reduction of body weight in the OL-R group (table 2).

At the time of sacrifice, the difference in body weight was associated with a lower adiposity (-46% for the epididymal fat mass) and a smaller but significant reduction in the weight (-15 to -18%) and nitrogen content (-18%) of the liver, heart and small intestine. In skeletal muscles, the differences were even smaller, with a 6% reduction in the weight of the gastrocnemius and tibialis anterior of OLE-R compared to OLE-AL rats and no difference in nitrogen content (table 2).

### ***Effect of energy restriction on $\Delta^{15}\text{N}$ of tissue protein and amino acids***

The protein fractions of the different tissues were enriched over dietary protein, with a mean  $\Delta^{15}\text{N}$  of 3.5‰. Analysis of variance indicates a strong tissue effect with  $\Delta^{15}\text{N}$  being higher in the liver, plasma and heart ( $\Delta^{15}\text{N} > 4$  ‰) compared to skeletal muscles and adipose tissue ( $2.7\text{‰} < \Delta^{15}\text{N} < 3.7$  ‰) and to the intestine ( $\Delta^{15}\text{N} = 2.35$  ‰) (**figure 1**). In contrast to tissue protein nitrogen, urinary nitrogen was slightly but significantly depleted in  $^{15}\text{N}$  compared to dietary protein ( $\Delta^{15}\text{N} = -0.36$  ‰). Energy restriction was associated with contrasting effects on tissue  $\Delta^{15}\text{N}$ , with a significant increase in the liver and plasma proteins as well as in urinary nitrogen (+0.23 to +0.44‰) and a significant decrease in the heart (-0.31 ‰), while no change was observed in skeletal muscle and adipose tissue proteins.

$\delta^{15}\text{N}$  was also measured for 11 amino acids (Ala, Asx, Gly, Glx, Pro, Ile, Leu, Val, Met, Phe and Lys) in tissue proteins prepared from small intestine, plasma, heart and gastrocnemius and  $\Delta^{15}\text{N}$  was calculated by subtracting the  $\delta^{15}\text{N}$  of the corresponding amino acid in dietary proteins (**supplementary table s3**). When considering the 4 tissues and the OLE-AL and OLE-R rats collectively, strong positive correlations were observed between the  $\Delta^{15}\text{N}$  of protein and those of Ala, Asx, Gly, Pro but not with the  $\Delta^{15}\text{N}$  of the different indispensable amino acids (**table 3**). Positive correlations were also observed between the  $\Delta^{15}\text{N}$  of the branched chain amino acids (Leu, Ile, Val) and those of Met, Ala, Glx and Asx. None of these correlations subsisted when tissues were considered independently (data not shown)

Whatever the tissue, there was no effect of energy restriction on the  $\Delta^{15}\text{N}$  of non-indispensable amino acids, branched-chain amino acids, Met and Phe. In contrast, energy restriction was associated with major changes in the  $\Delta^{15}\text{N}$  of lysine which was significantly higher in the intestine, plasma and gastrocnemius and lower in the heart of OLE-R rats, compared to OLE-AL (**Figure 2**).

#### ***Effect of energy restriction on $\Delta^{13}\text{C}$ of tissue protein and amino acids***

As for  $^{15}\text{N}$ , there was also a slight but significant enrichment in  $^{13}\text{C}$  of tissue proteins over their dietary counterpart ( $+0.45 \pm 0.03$  ‰,  $p < 0.01$ ) which differed among tissues: the highest discrimination factors were observed in the liver and the small intestine and the lowest in heart and epididymal adipose tissue (**figure 3**). Compared to  $\Delta^{15}\text{N}$ , the magnitude of  $\Delta^{13}\text{C}$  variations between tissues was much smaller, with a 0.9‰  $\Delta^{13}\text{C}$  difference between the highest and lowest values compared to a 2.3‰ for  $\Delta^{15}\text{N}$ . Energy restriction was associated with a significant reduction in  $\Delta^{13}\text{C}$  in almost all tissues (mean difference =  $-0.29 \pm 0.03$  ‰). The  $\delta^{13}\text{C}$  of individual amino acids were also measured for Ala, Asx, Gly, Glx, Pro, Ile, Leu, Val, Met, Phe and Lys in tissue proteins prepared from small intestine, plasma, heart and

gastrocnemius and  $\Delta^{13}\text{C}$  was calculated by subtracting the  $\delta^{13}\text{C}$  of the corresponding amino acid in dietary proteins (**supplementary table s4**).

Energy restriction was associated with a significant reduction in the  $\Delta^{13}\text{C}$  for Ala, Asx and Glx in the 4 different tissues (**figure 4**) while no significant effect was observed for indispensable amino acids as well as for Gly and Pro.

#### ***Effect of energy restriction on the expression of enzymes involved in amino acid metabolism in the liver***

Expression of mRNA coding for enzymes involved in amino acid interconversion and catabolism was measured in the liver of ad-libitum fed and restricted rats. Asparagine synthetase expression was dramatically reduced (-75%,  $p < 0.001$ ) in the liver of OLE-R rats compared to OLE-AL rats. In contrast, the expression of the AASS (the first enzyme responsible for lysine oxidation in mitochondria), BCKDHa (the rate-limiting step in branched chain amino acid catabolism) and OAT (involved in glutamate catabolism) were increased by 40 to 60% in the OLE-R rats compared to OLE-AL rats (**figure 5**). No difference was observed for the other enzyme involved in amino acid catabolism measured in this study (data not shown).

## **Discussion**

While a growing body of evidence suggest that  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural abundance in protein pools may represent new biomarkers of nutritional stress (9–16,19), the underlying mechanisms are still largely elusive because most of the data available to date come from observational studies, with little or no control of the nutritional and isotopic conditions. The present results provide the first in vivo demonstration of the concomitant activation of amino acid oxidation pathways and change in protein and amino acid  $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$ , in carefully controlled

nutritional and isotopic conditions and confirm the prediction of previously developed multi-compartmental model of whole body nitrogen metabolism (8).

Although body composition was not assessed at the end of the induction period, the comparison between OLE-AL and OLE-R rats indicates that the main effect of energy restriction is an important loss of fat mass and that lean body mass was only minimally affected. While energy restriction is usually associated with a loss in both adipose tissue and lean body mass in human, the results are different in rats where only minimal protein losses are reported, especially when animals are restricted on a high protein diet (23,24). In accordance with the results of Johnson et al. (23), the most prominent decrease (-18%) in the size of protein pool was observed in visceral organs (small intestine, liver and heart) while no significant difference was observed in the protein pool size of skeletal muscle. Because protein daily protein intake was the same in the OLE-AL and OLE-R throughout the experiment, the size of the protein pools reflects differences in nitrogen balance. Summing the size of the protein pool of the 3 visceral organs leads to a 125 mg N or 781 mg protein difference between OLE-AL and OLE-R rats at the time of sacrifice, which must be compared to a total protein intake of  $\approx 180$  g during the 8 weeks of the second period. This suggest that despite an important energy restriction leading to a significant decrease in fat mass, nitrogen balance was only minimally impacted in our rat model.

Despite this limited impact on nitrogen balance, energy restriction was associated with a significant increase in the  $\Delta^{15}\text{N}$  in urine and in plasma and liver constitutive proteins and a significant decrease in the  $\Delta^{15}\text{N}$  of heart protein, while the  $\Delta^{15}\text{N}$  of the other protein pools including skeletal muscles, intestine and adipose tissue remained unchanged. An increase in urine or urinary urea  $\Delta^{15}\text{N}$  during energy restriction has previously been reported in other

animal models including reindeer, arctic squirrel or Bonobos (10–12). Isotopic fractionation is known to occur during the deamination/transamination processes leading to urea production in the liver, resulting in urine being  $^{15}\text{N}$  depleted relative to its amino acid precursor in the body (8,25). It has been proposed that the increase in urine  $\Delta^{15}\text{N}$  occurring during dietary restriction may result from a greater contribution to urea production of the  $^{15}\text{N}$ -enriched amino acid released during protein breakdown in the muscles (11,12). However, this explanation applies to situations where nitrogen balance is negative, with a significant loss of lean body mass, which does not correspond to the present situation. Alternatively, the increase in urinary  $\Delta^{15}\text{N}$  may also reflect an increase in amino acid oxidation at the liver metabolic branched-point, as suggested by the multi-compartmental model of nitrogen metabolism previously developed (8). According to this model prediction, an increase in the relative orientation of amino acids toward oxidation vs protein synthesis in the liver results in a parallel increase in the  $\Delta^{15}\text{N}$  urea and both constitutive and exported liver proteins, in complete agreement with the present results. Although no attempt was made to measure amino acid oxidation, the increased expression of mRNA coding for OAT (ammonia detoxication through glutamate/glutamine synthesis), BCKDHa (branched-chain keto-acid oxidation) and AASS (lysine mitochondrial oxidation) support a change in amino acid partition towards a greater oxidation in the liver. AASS is a bifunctional enzyme that catalyze the removal of the  $\epsilon\text{-NH}_2$  group of lysine, and both its lysine-ketoglutarate reductase (amine oxidoreductase) and its saccharopine deshydrogenase activities are likely to favor the light nitrogen isotope, resulting in a gradual  $^{15}\text{N}$  enrichment of lysine (26,27). Indeed, the increase in AASS expression in the liver of OLE-R rats compared to OLE-AL rats was paralleled by an increase in the  $\Delta^{15}\text{N}$  of Lys in plasma protein, but also in protein from small intestine and skeletal muscles, in accordance with the prominent role of liver in whole-body Lys catabolism

(28). Because Lys accounts only for 10-15% of tissue nitrogen, changes in the  $\Delta^{15}\text{N}$  of other amino acids are also required for the  $\Delta^{15}\text{N}$  of plasma protein to change, as observed in the OLE-R plasma. Correlation between the  $\Delta^{15}\text{N}$  of some AA including Ala, Asx, Gly and Pro and that of bulk protein. However, these correlations are mostly driven by between tissue differences in  $^{15}\text{N}$  natural abundance, as they were only observed when considering simultaneously plasma, muscle, heart and intestine and did not persist when tissues were considered independently. The same apply for the correlations observed between the  $\Delta^{15}\text{N}$  of branched-chain amino acids and those of Met, Glx, Asx and Ala. Altogether, this reflect the compartmentation of amino acid metabolism with differences between the nature and intensity of the transaminating reaction between tissues and suggest that these differences contribute to the between-tissue differences in the  $\Delta^{15}\text{N}$  of bulk proteins. It also suggests that other amino acids than those assessed in tissue-specific GC-C-IRMS analyses contribute to the effect of energy restriction on the  $\Delta^{15}\text{N}$  of liver and plasma proteins. Collectively, Arg, Gln and Asn contribute to 20-25% of protein nitrogen and may explain the increase in  $\Delta^{15}\text{N}$  of constitutive and exported liver proteins. Because Arg is the direct precursor of urea and because the  $\Delta^{15}\text{N}$  of urine was increased in OLE-R rats, arginine  $\Delta^{15}\text{N}$  was presumably increased in restricted rats. Arg metabolism is highly compartmented with only a marginal contribution of plasma Arg to urea production (29) and its  $\Delta^{15}\text{N}$  is likely to vary independently between tissues according to nutritional conditions, with larger amplitude of variation in the liver because of its high arginase activity. The  $\Delta^{15}\text{N}$  of Gln and Asn of plasma protein are also likely to differ between the OLE-R and OLE-AL rats as a consequence of the lower expression of ASNS in restricted rats, which catalyze the transfer of the amide group transfer between these two amino acids. Unfortunately, the guanidium side chain group of arginine makes it unreactive with methyl-chloroformate and the amino group of Asn and Gln are lost during

protein hydrolysis, precluding the measurement of the actual  $\Delta^{15}\text{N}$  of these three amino acids and the experimental validation of these hypothesis.

The decreased  $\Delta^{15}\text{N}$  of heart proteins and lysine observed in the represent study was less expected and its explanation is less straightforward. Because the heart largely relies on fatty acids to fulfill its energy requirement and play no role in gluconeogenesis, an energy restriction mostly based on the reduction of CHO intake is expected to have little impact on the routing of amino acid toward oxidative pathways in this organ. However, the difference in in both the organ weight and the size of the nitrogen pool between OLE-R and OLE-AL rats indicates that energy restriction resulted in a negative protein balance. This negative balance, in association with the export of  $^{15}\text{N}$ -enriched AA into the bloodstream to support liver gluconeogenesis, may favour  $^{15}\text{N}$  elimination from the heart and contribute to the decreased  $\Delta^{15}\text{N}$  as previously suggested (8).

In contrast to nitrogen heavy isotope which bioaccumulates in the body and whose natural abundance reflects the metabolic partition of amino acids between anabolic and oxidative pathways, the heavier stable C isotope ( $^{13}\text{C}$ ) bioaccumulates only modestly as a consequence of discrimination during the formation of respiratory  $\text{CO}_2$  by carbonic anhydrase (30) and its natural abundance in the body typically reflects that of the diet (1). Carbon from tissue proteins comes from dietary proteins but also from carbohydrates (CHO) and lipids which contribute to non-indispensable amino acid synthesis through intermediary metabolism pathways (31–33). Because dietary macronutrients generally differ in their natural  $^{13}\text{C}$  abundance, it has been possible to estimate the routing of macronutrient C to tissue protein in different nutritional conditions. Compiled data from numerous studies involving a wide variety of dietary conditions, suggest quite a fixed contribution of around 75% of dietary protein to C in tissue

proteins, under a broad range of dietary compositions except for diets markedly deficient or excessive in protein (32). A correct estimation of the routing coefficients of the different sources of dietary carbon to tissue protein requires an isotopic steady state, i.e. that an equilibrium has been reached between the  $\delta^{13}\text{C}$  of the tissue protein and that of the diet. In mice, the time required to reach equilibrium for  $^{13}\text{C}$  has been shown to vary between 70 and more than 112 days depending on tissue turnover rate and longer delay are expected in rats due to lower metabolic rate (34). In the present study, energy restriction in the OLE-R group was achieved through a gradual reduction in dietary CHO, resulting in a progressive decrease in the  $\delta^{13}\text{C}$  of the non-protein fraction of the diet from -23.0 to -25.5 ‰ between week 4 and week 9. For the global  $\delta^{13}\text{C}$  of the diet, the first 5 weeks of the restriction period were associated with a decrease from -22.8‰ to -23.9‰ assuming equal contribution of carbons from the 3 macronutrients, or from -22.3‰ to -23.0‰ considering that dietary proteins provide 75% of the tissue protein carbon with the remaining 25% coming from non-protein macronutrients (32,35). Whatever the hypothesis, the carbon isotopic environment was not held constant throughout the study for carbon, making it impossible to achieve isotopic steady states in the different tissues and to compute sound estimation of the routing coefficient for the different macronutrients. However, in light of the marked differences between the  $\delta^{13}\text{C}$  of the different macronutrient (-15.66‰, -22.16‰ and -29.19‰ for CHO, proteins and lipids, respectively), the -0.29‰ difference between the mean  $\Delta^{13}\text{C}$  of the tissue protein pools measured in OLE-AL and OLE-R rats is consistent with a reduction of the contribution of dietary CHO to C protein in the body, in favor of C from dietary proteins and lipids. Such a reduction is in accordance with the results of previous long term experiment in rats, showing that decreasing the proportion of CHO in the diet was associated with a parallel but not proportional decrease in contribution of CHO to the non-protein C routing to tissue protein

(36). Interestingly, in the present study, the energy-restriction associated reduction of  $\Delta^{13}\text{C}$  of bulk protein in 4 different tissues was associated with a decrease in the  $\Delta^{13}\text{C}$  of 3 non-indispensable amino acids – Ala, Glx and Asx – while those of Pro, Gly and of indispensable amino acids remained unchanged. Ala is synthesized largely in the muscle through the transamination of pyruvate produced from glucose oxidation (37), and its  $\delta^{13}\text{C}$  has been shown to reflect in part that of dietary CHO, making it a biomarker for sugar-sweetened beverage intake (3). Muscle glucose oxidation is expected to decrease as a consequence of CHO restriction in the OLE-R rats, thus leading to a reduction of alanine  $\Delta^{13}\text{C}$  in all tissues. The same mechanism applies for the reduction of Asx and Glx  $\Delta^{13}\text{C}$ , with less marked consequences as their keto-acid precursors – oxaloacetate and ketoglutarate - are synthesized from acetyl-CoA produced during oxidation of the 3 different macronutrients, and not only glucose. The metabolic link with dietary glucose is even less straightforward for Pro and Gly, which are not produced through keto-acid transamination but mostly synthesized from Glu (for Pro), Ser, Thr and choline (for Gly), which represent a likely explanation for the lack of impact of CHO restriction on their  $\Delta^{13}\text{C}$ .

In conclusion, this study demonstrates that energy restriction leads to changes in the natural abundance of C and N heavy isotope in tissue protein and amino acid, which represent isotopic signatures of the metabolic reorientation required to cope with the reduction in energy macronutrient intake. Regarding nitrogen, the isotopic footprints of energy restriction mostly affect the liver metabolic branched-point, but also, less expectedly, heart proteins. Deviations in  $\Delta^{15}\text{N}$  mostly reflect an increased partition of amino acids toward oxidative pathways in the liver, in relation to their increased contribution to energy production and gluconeogenesis. In contrast, the changes in  $\Delta^{13}\text{C}$  homogeneously affect the different tissues and reflect a decreased

utilisation of carbon from dietary carbohydrate for Ala and to a lesser extent Glx and Asx synthesis.

## References

1. O'Brien DM. Stable Isotope Ratios as Biomarkers of Diet for Health Research. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:565–94.
2. Nash SH, Kristal AR, Hopkins SE, Boyer BB, O'Brien DM. Stable Isotope Models of Sugar Intake Using Hair, Red Blood Cells, and Plasma, but Not Fasting Plasma Glucose, Predict Sugar Intake in a Yup'ik Study Population. *J Nutr.* 2014 Jan 1;144(1):75–80.
3. Choy K, Nash SH, Kristal AR, Hopkins S, Boyer BB, O'Brien DM. The Carbon Isotope Ratio of Alanine in Red Blood Cells Is a New Candidate Biomarker of Sugar-Sweetened Beverage Intake. *J Nutr.* 2013 Jun 1;143(6):878–84.
4. Patel PS, Cooper AJ, O'Connell TC, Kuhnle GG, Kneale CK, Mulligan AM, et al. Serum carbon and nitrogen stable isotopes as potential biomarkers of dietary intake and their relation with incident type 2 diabetes: the EPIC-Norfolk study. *Am J Clin Nutr.* 2014 Aug 1;100(2):708–18.
5. O'Brien DM, Kristal AR, Nash SH, Hopkins SE, Luick BR, Stanhope KL, et al. A stable isotope biomarker of marine food intake captures associations between n-3 fatty acid intake and chronic disease risk in a Yup'ik study population, and detects new associations with blood pressure and adiponectin. *J Nutr.* 2014 May;144(5):706–13.
6. Fakhouri THI, Jahren AH, Appel LJ, Chen L, Alavi R, Anderson CAM. Serum Carbon Isotope Values Change in Adults in Response to Changes in Sugar-Sweetened Beverage Intake. *J Nutr.* 2014 Jun 1;144(6):902–5.
7. McCutchan JHJ, Lewis WMJ, Kendall C, McGrath C. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos.* 2003;102:378–90.
8. Poupin N, Mariotti F, Huneau J-F, Hermier D, Fouillet H. Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLoS Comput Biol.* 2014 Oct;10(10):e1003865.
9. Hobson KA, Alisauskas RT, Clark RG. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian-tissues due to fasting and nutritional stress - Implications for isotopic analyses of diet. *Condor.* 1993;95(2):388–94.

10. Barboza PS, Parker KL. Body protein stores and isotopic indicators of N balance in female reindeer (*Rangifer tarandus*) during winter. *Physiol Biochem Zool* PBZ. 2006 Jun;79(3):628–44.
11. Deschner T, Fuller BT, Oelze VM, Boesch C, Hublin J-J, Mundry R, et al. Identification of energy consumption and nutritional stress by isotopic and elemental analysis of urine in bonobos (*Pan paniscus*). *Rapid Commun Mass Spectrom RCM*. 2012 Jan 15;26(1):69–77.
12. Lee TN, Buck CL, Barnes BM, O'Brien DM. A test of alternative models for increased tissue nitrogen isotope ratios during fasting in hibernating arctic ground squirrels. *J Exp Biol*. 2012 Oct 1;215(Pt 19):3354–61.
13. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, Hedges REM. Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005 Sep 30;19(18):2497–506.
14. Hatch KA, Crawford MA, Kunz AW, Thomsen SR, Eggett DL, Nelson ST, et al. An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in hair. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006 Nov 30;20(22):3367–73.
15. Mekota A-M, Grupe G, Ufer S, Cuntz U. Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006 May 30;20(10):1604–10.
16. Butz DE, Cook ME, Eghbalnia HR, Assadi-Porter F, Porter WP. Changes in the natural abundance of  $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$  in breath due to lipopolysacchride-induced acute phase response. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009 Dec 15;23(23):3729–35.
17. Whigham LD, Butz DE, Johnson LK, Schoeller DA, Abbott DH, Porter WP, et al. Breath carbon stable isotope ratios identify changes in energy balance and substrate utilization in humans. *Int J Obes*. 2014 Sep;38(9):1248–50.
18. Gannes LZ, Martínez del Rio C, Koch P. Natural abundance variations in stable isotopes and their potential uses in animal physiological ecology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1998 Mar;119(3):725–37.
19. Neuberger FM, Jopp E, Graw M, Püschel K, Grupe G. Signs of malnutrition and starvation—Reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair. *Forensic Sci Int*. 2013 Mar;226(1–3):22–32.
20. Galmiche G, Huneau J-F, Mathé V, Mourot J, Simon N, Le Guillou C, et al. n-3 Fatty acids preserve muscle mass and insulin sensitivity in a rat model of energy restriction. *Br J Nutr*. 2016 Oct;116(07):1141–52.
21. Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D, Fouillet H. The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet  $^{15}\text{N}$  discrimination factors in laboratory rats. *PLoS One*. 2011;6(11):e28046.

22. Walsh RG, He S, Yarnes CT. Compound-specific  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis of amino acids: a rapid, chloroformate-based method for ecological studies: GC/C/IRMS of chloroformate-derivatized amino acids. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2014 Jan 15;28(1):96–108.
23. Johnson JA, Yu CH, Yang MU, Pi-Sunyer FX. Effect of age on protein conservation during very-low-energy diet in obese Sprague-Dawley rats. *Obes Res*. 1998 Nov;6(6):448–57.
24. 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* 2005. 2013 Feb;37(2):263–71.
25. Cantalapiedra-Hijar G, Fouillet H, Huneau JF, Fanchone A, Doreau M, Nozière P, et al. Relationship between efficiency of nitrogen utilization and isotopic nitrogen fractionation in dairy cows: contribution of digestion v. metabolism? *Anim Int J Anim Biosci*. 2016 Feb;10(2):221–9.
26. Handley LL, Raven JA. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant Cell Environ*. 1992;15:965–85.
27. Macko SA, Fogel ML, Engel MH, Hare PE. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochim Cosmochim Acta*. 1986;50:2143–6.
28. Benevenga NJ, Blemings KP. Unique aspects of lysine nutrition and metabolism. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6 Suppl 2):1610S–1615S.
29. Mariotti F, Petzke KJ, Bonnet D, Szezepanski I, Bos C, Huneau J-F, et al. Kinetics of the utilization of dietary arginine for nitric oxide and urea synthesis: insight into the arginine-nitric oxide metabolic system in humans. *Am J Clin Nutr*. 2013 May;97(5):972–9.
30. Paneth P, O’Leary MH. Carbon isotope effect on dehydration of bicarbonate ion catalyzed by carbonic anhydrase. *Biochemistry (Mosc)*. 1985 Sep 10;24(19):5143–7.
31. MacAvoy SE, Arneson LS, Bassett E. Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia*. 2006 Oct 18;150(2):190–201.
32. Fernandes R, Nadeau M-J, Grootes PM. Macronutrient-based model for dietary carbon routing in bone collagen and bioapatite. *Archaeol Anthropol Sci*. 2012 Dec;4(4):291–301.
33. Wolf N, Newsome SD, Peters J, Fogel ML. Variability in the routing of dietary proteins and lipids to consumer tissues influences tissue-specific isotopic discrimination: Routing of dietary proteins and lipids to consumer tissues. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2015 Aug 15;29(15):1448–56.
34. MacAvoy SE, Macko SA, Arneson LS. Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Can J Zool*. 2005 May;83(5):631–41.
35. Kurle CM, Koch PL, Tershy BR, Croll DA. The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ) in mammalian omnivores. *Isotopes Environ Health Stud*. 2014;50(3):307–21.

36. Mantha OL, Polakof S, Huneau J-F, Mariotti F, Poupin N, Zalko D, et al. Early changes in tissue amino acid metabolism and nutrient routing in rats fed a high-fat diet: evidence from natural isotope abundances as biomarkers. *Br J Nutr.* under publication.
37. Palmer TN, Caldecourt MA, Snell K, Sugden MC. Alanine and inter-organ relationships in branched-chain amino and 2-oxo acid metabolism. Review. *Biosci Rep.* 1985 Dec;5(12):1015–33.

**Table 1** : composition of the experimental diets (in g/kg) and  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  of the major constituents (‰)

	Ad-libitum	75% restriction	60% restriction	50% restriction
Casein HCl	194.4	256.2	323.9	353.7
L-Cystin	2.5	3.3	4.2	4.5
Corn starch	255.0	201.1	141.4	115.6
Sucrose	144.0	113.5	79.8	65.3
High-Oleic sunflower oil	270.0	270.7	272	272.1
Soybean oil	20.0	21.0	22.2	22.7
AIN 93N mineral mix	47.7	62.70	79.3	86.5
AIN 93VX vitamin mix	13.9	18.3	23.1	25.2
Alpha-cellulose	50.0	49.9	49.9	49.9
Choline bitartrate	2.5	3.3	4.2	4.5

**Table 2** : Effect of energy restriction on body weight, organ weight and organ nitrogen (end of the second period)

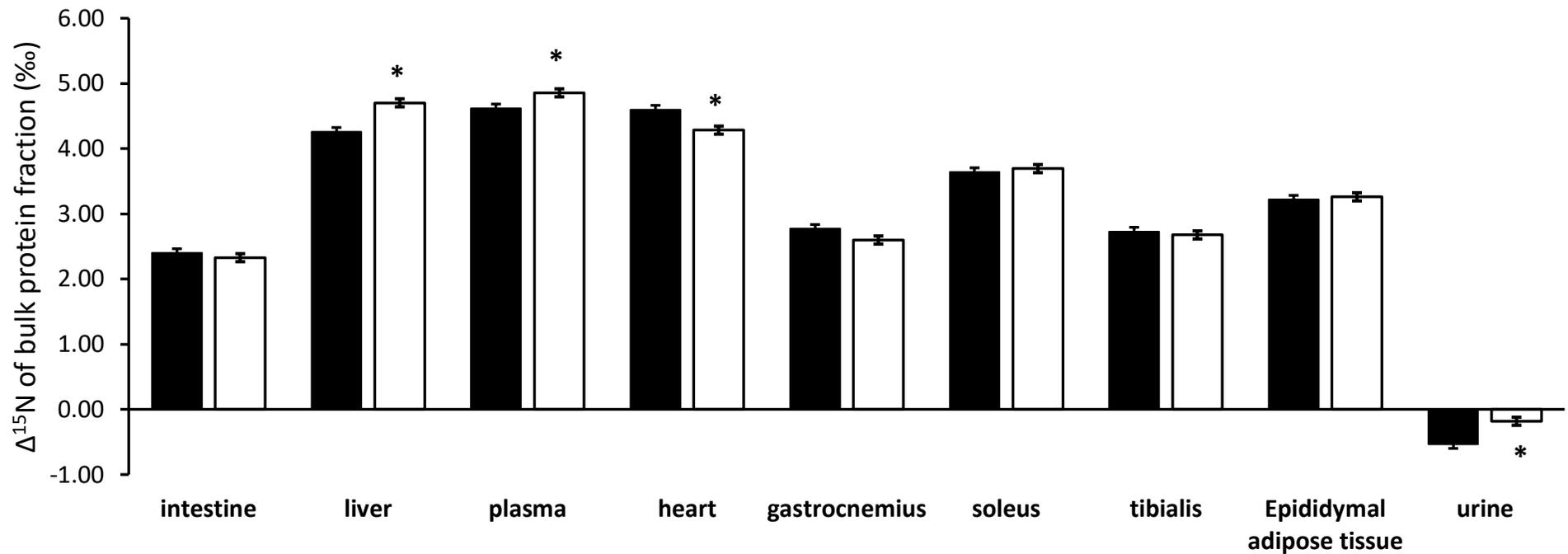
		OLE-AL	OLE-R
Body weight (g)	(g)	611 ± 20	482 ± 10**
Small intestine	Weight (g)	7.75 ± 0.31	6.46 ± 0.14**
	Nitrogen (mg)	173.7 ± 6.0	142.4 ± 5.1**
Liver weight (g)	Weight (g)	12.93 ± 0.57	11.00 ± 0.31*
	Nitrogen (mg)	507.5 ± 20.8	422.9 ± 14.6*
Heart	Weight (g)	1.08 ± 0.03	0.92 ± 0.02**
	Nitrogen (mg)	35.1 ± 1.3	29.2 ± 0.8**
Gastrocnemius (L+R)	Weight (g)	5.60 ± 0.08	5.28 ± 0.13*
	Nitrogen (mg)	190.0 ± 3.8	176.6 ± 3.6
Tibialis (L+R)	Weight (g)	1.81 ± 0.03	1.70 ± 0.04*
	Nitrogen (mg)	60.4 ± 1.5	59.1 ± 1.7
Soleus (L+R)	Weight (g)	0.39 ± 0.01	0.36 ± 0.01
	Nitrogen (mg)	14.3 ± 0.5	12.8 ± 0.4
Epididymal fat mass (L+R)	Weight (g)	27.86 ± 1.82	15.13 ± 1.06**
	Nitrogen (mg)	15.3 ± 0.8	10.4 ± 1.0*

Data are means ± SEM of n=12 observations. L+R stands for left+right. Means with \* and \*\* are significantly different from the OLE-AL group at p<0.05 and p<0.01, respectively

**Table 3** : Pearson correlation between the 15N discrimination factor of protein and protein-bound amino acids over their respective dietary counterparts. \* and \*\* denotes a significant Pearson correlation,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

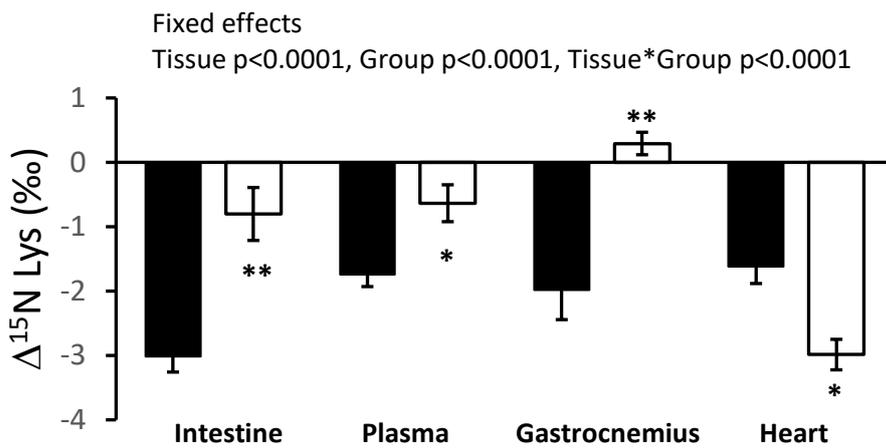
Ala	0.71**										
Asx	0.60**	0.40									
Glx	0.40	0.58**	0.45*								
Gly	0.66**	0.62**	0.40	0.40							
Pro	0.76**	0.33	0.49**	0.07	0.56**						
Ile	0.40	0.51**	0.55**	0.59**	0.23	-0.11					
Leu	0.28	0.50**	0.44*	0.56**	0.30	-0.24	0.91**				
Val	0.37	0.38	0.56**	0.41	0.28	0.10	0.79**	0.73**			
Lys	-0.07	0.01	-0.35	-0.05	0.08	0.05	-0.45*	-0.31	-0.43*		
Met	0.32	0.40	0.46*	0.42	0.46*	0.15	0.48**	0.60**	0.59**	-0.06	
Phe	-0.21	-0.03	0.04	0.26	0.12	-0.08	-0.06	0.05	-0.05	0.29	0.10
	Protein	Ala	Asx	Glx	Gly	Pro	Ile	Leu	Val	Lys	Met

Fixed effects : Tissue:  $p < 0.001$ , Group:  $p=0.05$ , Tissue\* Group:  $p<0.0001$

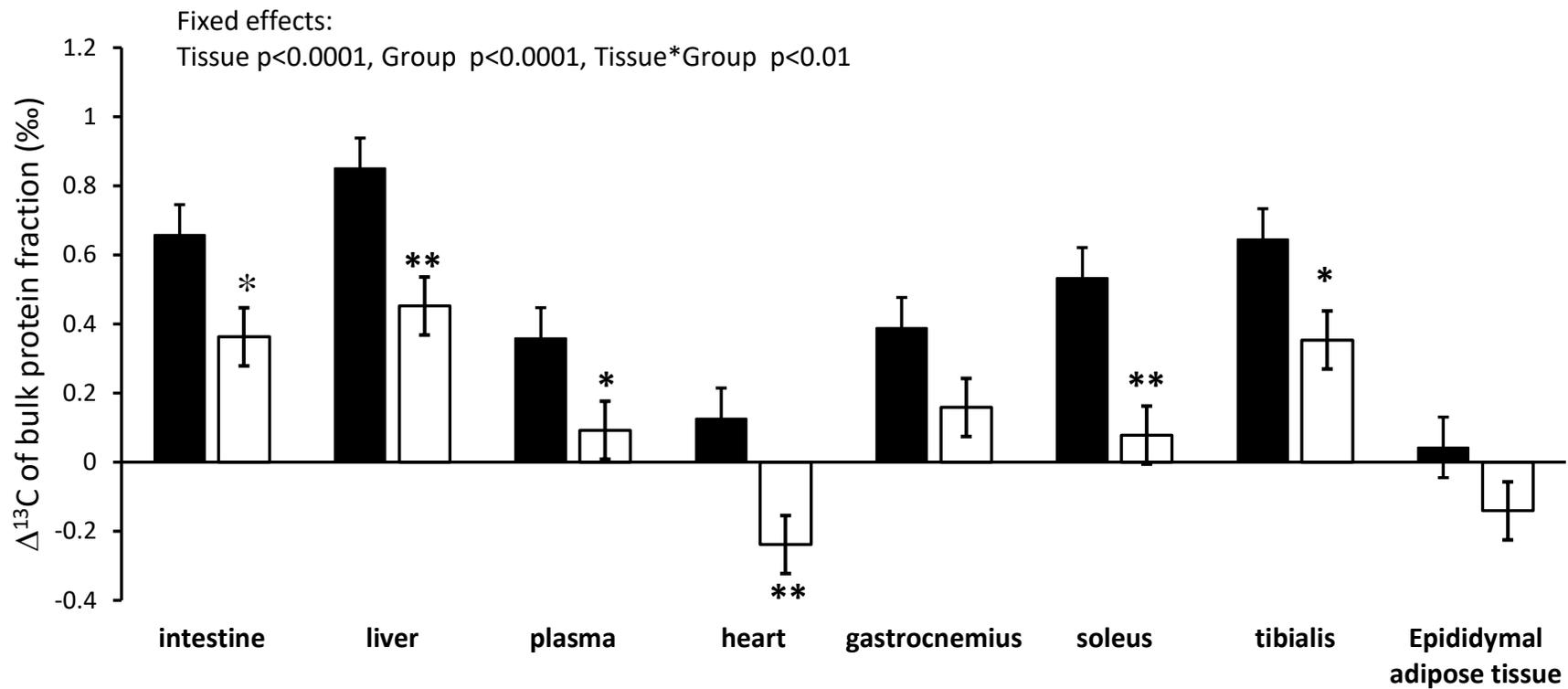


**Figure 1:** Effect of energy restriction on the  $^{15}\text{N}$  discrimination factor of tissue proteins over dietary proteins. ■ OLE-AL and □ OLE-R rats. Results are means  $\pm$  SEM of  $n=12$  rats. \* different from OLE-AL, ( $p<0.05$ )

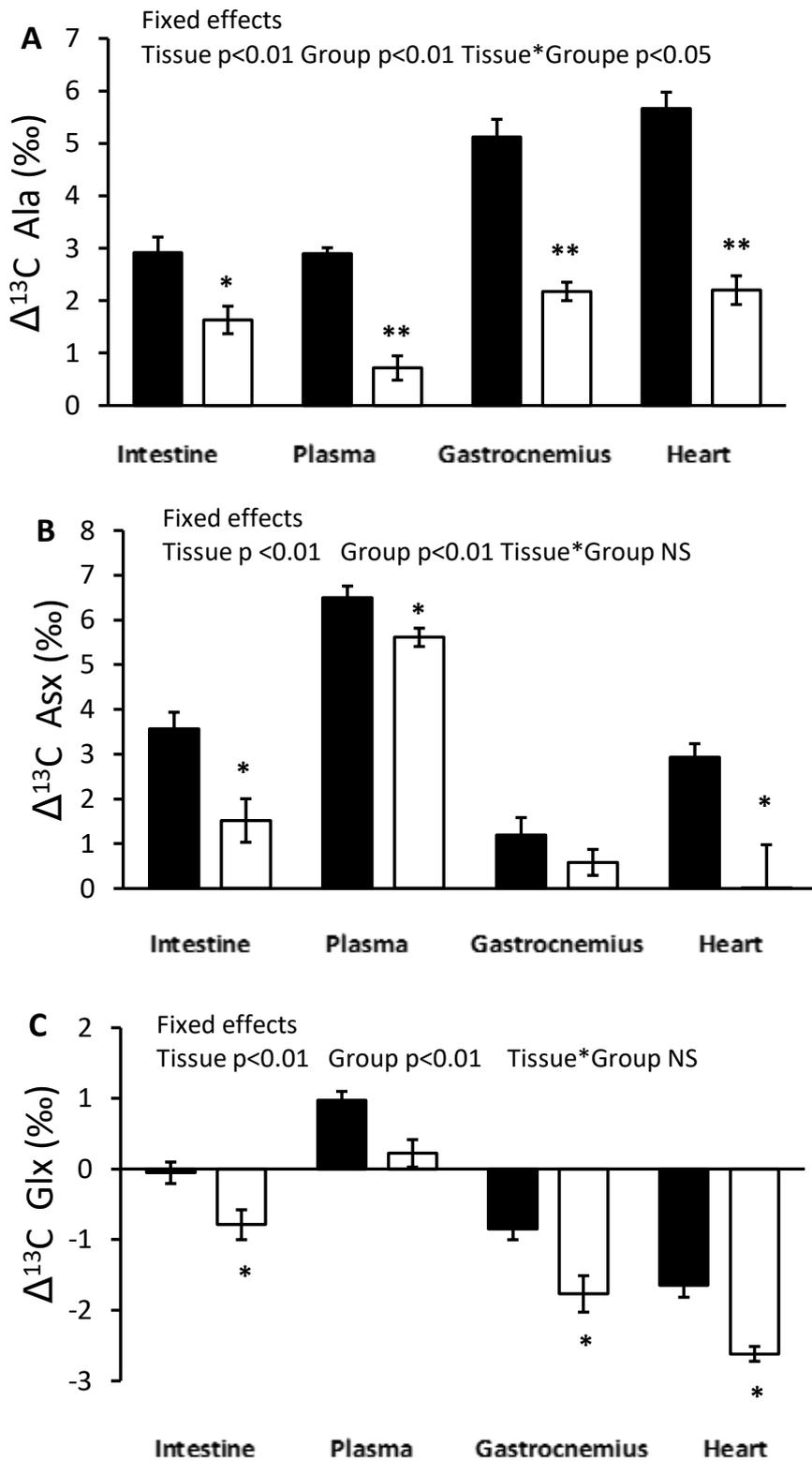




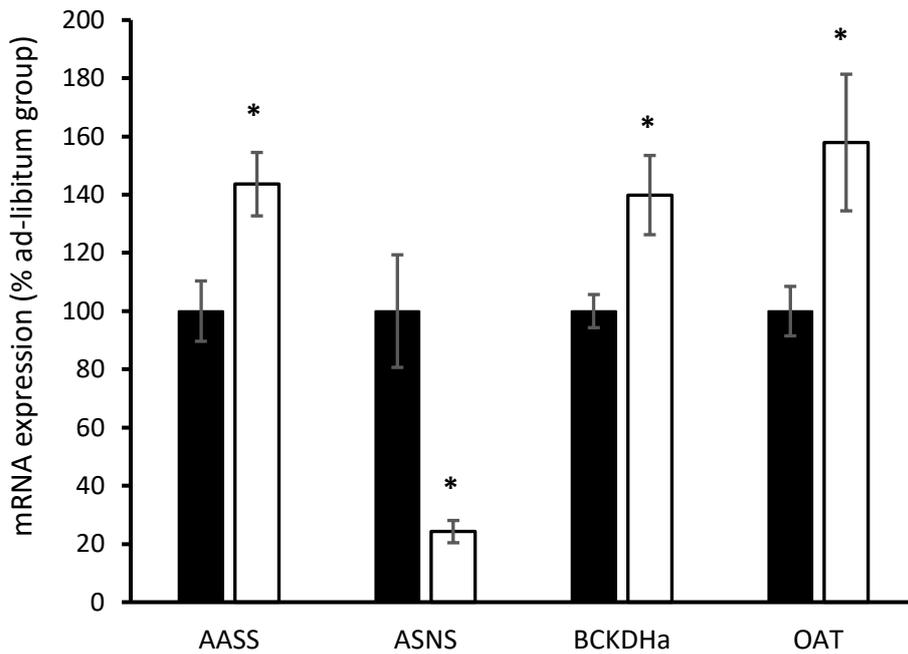
**Figure 2:** Effect of energy restriction on the <sup>15</sup>N discrimination factor of lysine in protein from different tissues, over its dietary counterparts. ■ OLE-AL group □ OLE-R group. Data are means ± SEM of n=8 rats. \* and \*\* indicates significant differences compared to OLE-AL group, p<0.05 and 0.01, respectively



**Figure 3** : Effect of energy restriction on the  $^{15}\text{N}$  discrimination factor of tissue proteins over dietary proteins. ■ OLE-AL and □ OLE-R rats. Results are means  $\pm$  SEM of  $n=12$  rats. \* different from OLE-AL, ( $p < 0.05$ )



**Figure 4:** Effect of energy restriction on the <sup>13</sup>C discrimination factor of Ala (A), Asx (B) and Glx (C) in protein from different tissues, over their dietary counterparts. ■ OLE-AL group □ OLE-R group. Data are means ± SEM of n=8 rats. \* and \*\* indicates significant differences compared to OLE-AL group, p<0.05 and 0.01, respectively



**Figure 5:** Effect of energy restriction on the expression level of mRNA coding for enzymes involved in amino acid metabolism, in the liver. AASS aminocarboxymuconate semialdehyde synthase, ASNS asparagine synthetase, BCKDHa branched chain ketoacid deshydrogenase a OAT ornithine aminotransferase. ■ OLE-AL group □ OLE-R group. Data are means  $\pm$  SEM of n=10 rats. \* indicates significant differences compared to OLE-AL group,  $p < 0.05$ .

## Supplemental materials

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
Lipids		-29.19
Carbohydrates		-15.66
Protein	5.81	-22.16
Ala	6.18	-22.09
Asx	7.31	-21.61
Glx	8.41	-18.61
Gly	6.46	-24.47
Pro	6.59	-20.51
Ile	6.16	-26.14
Leu	5.02	-32.48
Val	8.63	-29.72
Met	6.10	-24.31
Phe	8.22	-27.85
Lys	6.63	-16.88

**Supplemental table S1:** Natural abundance of heavy isotopes ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) in dietary ingredients and individual amino acids from casein (means of triplicate determination)

Gene	Primers	Sequence
AASS	Forward	GGA-GCC-CCA-TGA-ATT-AAA-AGA-A
	Reverse	ACT-TAA-CAC-CGT-CCC-ATA-CAC-TTT-C
ARG1	Forward	GGT-CCC-GCA-GCA-TTA-AGG-A
	Reverse	GGT-CCC-GCA-GCA-TTA-AGG-A
ASNS	Forward	CCA-TCA-CTG-TAC-GGA-TGA-ACC-A
	Reverse	CGG-TCA-GTC-ATC-AAG-CGT-TTC
BCKDHa	Forward	GTG-GGA-TGA-GGA-ACA-GGA-GAA-G
	Reverse	GGC-TTG-GGT-TGG-GCT-TTA-G
GLS2	Forward	CGA-CTT-GGT-GAC-CTG-CTT-TTC-T
	Reverse	TTC-AGG-GCC-GTG-GTG-AAC
GPT	Forward	AGG-GTG-GAG-TAT-GCA-GTT-CGA
	Reverse	TGG-CAC-GGA-TGA-CCT-CAG-T
HAL	Forward	AAG-ATG-TGG-TCC-CCG-AAG-AGT
	Reverse	GTG-CCA-GGC-CTT-CTT-TTG-G
OAT	Forward	TGG-TGG-CTT-ATA-TCC-CGT-GTC-T
	Reverse	TGC-TCG-CCT-GGT-TTA-ATG-GT
PYCR2	Forward	TGC-AGC-TCT-CTT-GTT-CGA-ATA-CA
	Reverse	GCT-TCC-GCT-CTC-TGC-TCA-TC
SDS	Forward	CAT-CCC-AGC-CAC-TAT-CGT-TGT
	Reverse	CAG-CAT-CTC-TCC-CAC-CAC-TTC
TAT	Forward	AAG-GCA-GTG-TGT-CCC-CAT-CT
	Reverse	TGC-AAT-CTG-AAA-ACA-CCA-TGT-CA

**Supplemental table S2:** qPCR primers used for cDNA amplifications

	Intestine	Plasma	Gastrocnemius	Heart	Tissue effect
Ala	3.87 ± 0.19	7.59 ± 0.36	6.27 ± 0.41	9.07 ± 0.42	<0.001
	4.75 ± 0.27	7.24 ± 0.37	6.70 ± 0.34	8.96 ± 0.61	
Asx	5.25 ± 0.10	6.00 ± 0.35	3.69 ± 0.15	6.43 ± 0.35	<0.001
	5.14 ± 0.42	5.48 ± 0.21	5.24 ± 0.19	6.97 ± 0.30	
Glx	4.52 ± 0.41	5.80 ± 0.32	5.34 ± 0.69	7.25 ± 0.59	<0.001
	5.40 ± 0.54	5.15 ± 0.69	5.55 ± 0.24	8.69 ± 0.40	
Gly	2.68 ± 0.36	6.28 ± 0.25	4.28 ± 0.50	5.28 ± 0.41	<0.001
	3.11 ± 0.60	5.19 ± 0.31	4.13 ± 0.58	5.37 ± 0.54	
Pro	6.12 ± 0.44	13.07 ± 0.24	5.28 ± 0.19	8.09 ± 0.30	<0.001
	6.87 ± 0.26	11.57 ± 0.37	5.17 ± 0.20	7.51 ± 0.31	
Ile	6.08 ± 0.25	4.35 ± 0.18	4.78 ± 0.65	10.17 ± 0.36	<0.001
	3.46 ± 0.55	4.15 ± 0.29	4.35 ± 0.16	10.96 ± 0.35	
Leu	5.36 ± 0.20	4.64 ± 0.18	5.38 ± 0.27	8.61 ± 0.13	<0.001
	4.41 ± 0.28	3.92 ± 0.25	5.86 ± 0.17	8.52 ± 0.37	
Val	5.33 ± 0.91	5.15 ± 0.17	3.60 ± 0.57	6.82 ± 0.27	<0.001
	2.83 ± 0.60	3.21 ± 0.43	3.30 ± 0.22	7.50 ± 0.38	
Met	2.52 ± 0.36	4.58 ± 0.29	2.80 ± 0.53	4.55 ± 0.40	<0.001
	2.61 ± 0.49	2.21 ± 0.61	3.76 ± 0.26	5.35 ± 0.52	
Phe	0.19 ± 0.19	0.89 ± 0.19	0.84 ± 0.64	0.66 ± 0.34	NS
	2.29 ± 0.22	0.26 ± 0.31	1.38 ± 0.44	1.17 ± 0.17	
Lys	-3.01 ± 0.24	-1.75 ± 0.18	-1.98 ± 0.46	-1.62 ± 0.26	<0.001
	-1.62 ± 0.28	-0.80 ± 0.41	-0.64 ± 0.29	-0.29 ± 0.17	

**Supplemental table S3** : <sup>15</sup>N discrimination factor of individual amino acids over their dietary counterparts in protein from different tissues. Mean ± SEM of n=16 rats from the OLE-AL and OLE-R rats.

		Intestine	Plasma	Gastrocnemius	Heart	Tissue effect
Ala	OLE-AL	2.91 ± 0.30	2.90 ± 0.11	5.12 ± 0.34	5.67 ± 0.31	<0.001
	OLE-R	1.63 ± 0.26	0.72 ± 0.23	2.18 ± 0.18	2.20 ± 0.27	
Asx	OLE-AL	3.56 ± 0.37	6.49 ± 0.26	1.20 ± 0.39	2.93 ± 0.91	<0.001
	OLE-R	1.52 ± 0.49	5.61 ± 0.20	0.58 ± 0.29	0.01 ± 0.97	
Glx	OLE-AL	-0.05 ± 0.15	0.97 ± 0.13	-0.85 ± 0.15	-1.65 ± 0.17	<0.01
	OLE-R	-0.79 ± 0.21	0.22 ± 0.19	-1.77 ± 0.26	-2.62 ± 0.11	
Gly	OLE-AL	4.07 ± 0.55	10.48 ± 1.22	5.28 ± 0.55	7.20 ± 1.08	<0.001
	OLE-R	3.49 ± 0.41	4.55 ± 1.41	4.81 ± 0.48	6.46 ± 0.88	
Pro	OLE-AL	2.43 ± 0.23	4.41 ± 0.04	1.18 ± 0.15	2.57 ± 0.28	NS
	OLE-R	1.86 ± 0.17	4.23 ± 0.24	1.28 ± 0.30	2.64 ± 0.32	
Ile	OLE-AL	1.10 ± 0.12	0.85 ± 0.08	1.76 ± 0.19	2.16 ± 0.09	NS
	OLE-R	1.60 ± 0.14	1.15 ± 0.19	2.31 ± 0.18	2.01 ± 0.15	
Leu	OLE-AL	1.77 ± 0.30	1.21 ± 0.10	1.64 ± 0.13	0.57 ± 0.19	NS
	OLE-R	0.92 ± 0.20	1.01 ± 0.09	1.91 ± 0.09	0.87 ± 0.24	
Val	OLE-AL	2.37 ± 0.18	1.82 ± 0.41	2.38 ± 0.31	2.52 ± 0.30	NS
	OLE-R	2.01 ± 0.40	1.97 ± 0.51	2.32 ± 0.19	3.17 ± 0.23	
Met	OLE-AL	-2.45 ± 0.28	-3.28 ± 0.15	-3.63 ± 0.12	-2.85 ± 0.34	NS
	OLE-R	-2.55 ± 0.21	-3.88 ± 0.11	-2.50 ± 0.19	-2.89 ± 0.17	
Phe	OLE-AL	0.31 ± 0.16	0.29 ± 0.04	0.23 ± 0.08	-0.13 ± 0.12	NS
	OLE-R	0.22 ± 0.10	0.10 ± 0.07	0.77 ± 0.17	-0.08 ± 0.06	
Lys	OLE-AL	-3.34 ± 0.37	-2.63 ± 0.48	-3.96 ± 0.55	-3.40 ± 0.53	<0.01
	OLE-R	-2.68 ± 0.36	-2.14 ± 0.31	-2.68 ± 0.41	-2.35 ± 0.56	

**Supplemental table S4** : <sup>13</sup>C discrimination factor of individual amino acids over their dietary counterparts in protein from different tissues. Mean ± SEM of n=8 rats from the OLE-AL and OLE-R rats, respectively.



Étude 3 : Le métabolisme protéique splanchnique et  
périphérique est différemment affecté chez un modèle rat de  
syndrome métabolique induit par l'alimentation

### **Étude 3 : Le métabolisme protéique splanchnique et périphérique est différemment affecté chez un modèle rat de syndrome métabolique induit par l'alimentation**

Olivier L. Mantha, Jean-François Huneau, Véronique Mathé, Dominique Hermier, Nadezda Khodorova, François Mariotti et Hélène Fouillet.

#### **Contexte et objectifs**

On méconnaît largement les altérations tissulaires du métabolisme des protéines et des acides aminés advenant lors du développement de l'obésité et des altérations associées du syndrome métabolique que nous avons ici étudiées chez des rats sensibles ou résistants à leur induction alimentaire.

#### **Méthodes**

Chez 42 rats Wistar, la variabilité interindividuelle de réponse phénotypique et métabolique après 4 mois de régime gras et sucré a été exploitée pour explorer les liens entre le degré de syndrome métabolique et les niveaux de protéosynthèse et de catabolisme des acides aminés dans de multiples tissus (intestin grêle, foie, plasma, reins, cœur et muscles). Un score continu de syndrome métabolique ( $Z_{MS}$ ) a été calculé comme la moyenne des z-scores des composantes individuelles du syndrome métabolique (poids, adiposité corporelle et viscérale, indice HOMA-IR et concentrations plasmatique et hépatique de triglycérides). Dans chaque tissu, le flux de protéosynthèse a été mesuré par une méthode de traceur métabolique (enrichissement isotopique au  $^2\text{H}_2\text{O}$ ), tandis que la proportion d'acides aminés orientés vers le catabolisme (versus l'anabolisme protéique) et l'adressage des macronutriments alimentaires vers les protéines tissulaires ont été déterminés par des méthodes isotopiques en abondances naturelles, en interprétant les différences de teneurs en  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  entre protéines tissulaires et macronutriments alimentaires ( $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$ ), respectivement.

## Résultats et discussion

Dans le foie, la synthèse protéique augmentait tandis que la proportion d'utilisation catabolique des acides aminés diminuait avec  $Z_{MS}$ , ces deux phénomènes contribuant à l'augmentation de la masse protéique hépatique observée chez les rats sensibles à l'induction du syndrome métabolique. En revanche, au niveau musculaire, seule une faible augmentation de la synthèse protéique avec  $Z_{MS}$  a été trouvée, et uniquement dans un des muscles (*gastrocnémien*), sans aucun effet associé sur les proportions d'utilisation catabolique des acides aminés et les masses protéiques musculaires. Les rats sensibles au syndrome métabolique avaient en outre une flexibilité métabolique altérée, attestée par un moindre adressage des lipides alimentaires vers la synthèse d'acides aminés non-indispensables dans le foie et surtout dans le muscle *tibialis anterior*.

## Conclusion

Les rats sensibles à l'induction nutritionnelle du syndrome métabolique gagnaient plus de masse grasse, mais aussi plus de masse protéique, du fait d'un plus fort anabolisme global lipidique et protéique, avec des effets différentiels selon les tissus puisque l'anabolisme protéique hépatique, mais pas musculaire, augmentait avec le degré de syndrome métabolique, probablement du fait de la résistance à l'insuline.

**Splanchnic and peripheral protein metabolism are differently affected in a rat model of diet-induced metabolic syndrome.**

Mantha O.L.<sup>1</sup>, Huneau J.F.<sup>1</sup>, Mathé V.<sup>1</sup>, Hermier D.<sup>1</sup>, Khodorova N.<sup>1</sup>, Mariotti F.<sup>1</sup>, Fouillet H.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 75005, Paris, France.

\*Corresponding author ([helene.fouillet@agroparistech.fr](mailto:helene.fouillet@agroparistech.fr))

Running title: Protein and amino acid metabolism in metabolic syndrome.

## Abstract

Little is known regarding how the metabolic syndrome (MS) impacts protein and amino acid (AA) metabolism in tissues. Using the interindividual variability in metabolic response of rats after 4 months of high-fat feeding, we explored the links between the MS degree and protein synthesis and AA catabolism in multiple tissues (small intestine, liver, plasma, kidneys, heart and muscles). A MS score ( $Z_{MS}$ ) was calculated as the average of the z-scores for individual MS components (weight, total and visceral adiposities, HOMA-IR, plasma and liver triglycerides). In each tissue, protein synthesis was measured by  $^2H_2O$  labeling, and proportion of AA catabolism (relative to protein synthesis) and nutrient routing to protein were assessed using natural nitrogen and carbon isotopic distances between tissue proteins and nutrients ( $\Delta^{15}N$  and  $\Delta^{13}C$ ). In the liver, protein synthesis increased while the proportion of AA catabolism decreased with  $Z_{MS}$ , and together contributed to higher liver protein mass in MS-prone rats. In contrast, in muscles, we found a weaker positive association between  $Z_{MS}$  and protein synthesis in the *gastrocnemius* muscle only, but no  $Z_{MS}$  effect on the proportion of AA catabolism and protein mass. MS-prone rats also had an altered metabolic flexibility attested by a lower routing of dietary lipids to non-indispensable AA synthesis in the liver and *tibialis anterior* muscle. To conclude, MS-prone rats gained more fat but also more protein mass due to an overall higher anabolism, with differential effects on tissues since the hepatic, but not the muscular, protein anabolism increased with the MS degree.

## Introduction

Western diets rich in saturated fat and sugars favor the development of obesity (Bray and Popkin, 1998) and metabolic disorders involving insulin resistance and ultimately leading to chronic diseases (Danaei et al., 2014; Giugliano et al., 2006; Hardy et al., 2012). Indeed, excess fat accumulation, especially visceral fat, is frequently associated with insulin resistance, hypertension and dyslipidemia, which cluster in the metabolic syndrome (MS), a recognized risk factor for type 2 diabetes, cardiovascular diseases and cancer (Tchernof and Despres, 2013). However, there is a high inter-individual variability in the sensitivity to high-fat (HF) diet induction of obesity and MS in both humans (Blundell et al., 2005; Levin, 2007; Stoger, 2008) and rodents (Azzout-Marniche et al., 2014; Jackman et al., 2006; Levin et al., 1997).

During the last decades, studies have focused on several metabolic alterations in the context of HF feeding and MS, but the potential impact on amino acid (AA) metabolism and protein synthesis and degradation has received little attention (Guillet et al., 2011; Katsanos and Mandarino, 2011). Numerous studies have consistently shown in humans and in animal models that obesity is associated with higher plasma concentrations of several AA including branched-chain AA, which represent early markers of the MS (Adams, 2011; Giesbertz et al., 2015; Lotta et al., 2016; Lynch and Adams, 2014; Michaliszyn et al., 2012; Newgard et al., 2009; Wang et al., 2011a; Würtz et al., 2012; Yamakado et al., 2015; Zhao et al., 2016). These increased circulating concentrations may arise from a decreased oxidation of branched-chain AA, particularly in visceral adipose tissue, which may impair lipid oxidation and favor the onset of insulin resistance (Adams, 2011; Newgard, 2012; Zhao et al., 2016). Increased circulating AA concentrations may also arise from impaired proteosynthesis and/or increased proteolysis in some tissues, but metabolic tracer studies on how these protein fluxes may be affected by the MS or its individual components (obesity, insulin resistance...) have yielded conflicting results (Guillet et al., 2011; Katsanos and Mandarino, 2011). Concerning proteolysis variations in the MS context, tracer studies at the whole-body level have found either an unchanged (Guillet et al., 2009; Halvatsiotis et al., 2002; Jensen and Haymond, 1991) or an increased proteolysis due to an impaired inhibition by insulin (Chevalier et al., 2006; Chevalier et al., 2015; Chevalier et al., 2005; Denne et al., 1995; Gougeon et al., 2008), while results from the few studies examining protein metabolism at the muscular level are even more conflicting with either increased or decreased proteolysis (Bak et al., 2016;

Denne et al., 1995; Patterson et al., 2002; Zhou et al., 2007). Regarding proteosynthesis variations in the MS context, results of the tracer studies are also inconsistent with either unchanged, reduced or even increased proteosynthesis depending on the tissue, sex, and insulin resistance level (Chevalier et al., 2015; Chevalier et al., 2005; Gougeon et al., 2008; Guillet et al., 2009; Katsanos and Mandarino, 2011; Masgrau et al., 2012; Tessari et al., 2011; Tessari et al., 2010). Such discrepancies probably relate in part to the heterogeneous presentation of the MS, with inter-studies differences in visceral adiposity and inflammation which may account for different impact on protein metabolism (Guillet et al., 2011). These discrepancies also reflect the limitations of classic tracer methods for assessing protein kinetics (Fouillet et al., 2002).

In this regard, animal models exhibiting a large interindividual variability in their sensitivity to diet-induced MS, such as the prone/resistant rats that actually exhibit a large variability of metabolic response when exposed to the same induction diet (Liu et al., 2015; Morris et al., 2013; Ratner et al., 2015; Wang et al., 2011b), represent a convenient mean to explore the relationships between the alterations in tissue protein kinetics and the MS degree. Moreover, the natural abundances of stable nitrogen (N) and carbon (C) isotopes in tissue proteins constitute new biomarkers of tissue AA metabolism, and useful complements to metabolic tracer for exploring MS-induced alterations in both AA metabolism and protein kinetics. Dietary protein N is the sole source of body protein N, but body proteins are naturally enriched in the heavier stable N isotope ( $^{15}\text{N}$ ) over dietary protein. This  $^{15}\text{N}$  bioaccumulation ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) is globally due to discrimination against this heavy isotope during N waste formation and particularly during urea production, and exhibits great variations between tissues and subjects (Cantalapiedra-Hijar et al., 2015; Poupin et al., 2011; Poupin et al., 2014). Indeed,  $\Delta^{15}\text{N}$  values vary amongst tissues and subjects as a result of their particular AA metabolism, due to the existence of several isotope effects associated with the different metabolic pathways in tissues such as AA oxidation as well as protein turnover, so that variations in different fluxes of the catabolic or anabolic use of AA can result in  $\Delta^{15}\text{N}$  variations (Martinez del Rio and Wolf, 2005; Poupin et al., 2014). We have hence shown by mechanistic modeling that  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements in tissue proteins represent integrated biomarkers of the tissue AA partitioning between oxidation and protein synthesis (Poupin et al., 2014). Consistently, it has been experimentally shown that  $\Delta^{15}\text{N}$  in liver-synthesized plasma proteins increases with liver AA oxidation, and thus reflects AA anabolic use efficiency and dietary protein quality (Cantalapiedra-Hijar et al., 2016; Cantalapiedra-Hijar et al., 2015; Wheadon et al., 2014), and that  $\Delta^{15}\text{N}$  in accessible

pools (hair, plasma and urine) increase with peripheral proteolysis and/or liver AA oxidation during undernutrition (Barboza and Parker, 2006; Deschner et al., 2012; Fuller et al., 2005; Hatch et al., 2006; Lee et al., 2012; Mekota et al., 2006). In contrast, the heavier stable C isotope ( $^{13}\text{C}$ ) only modestly bioaccumulates and its natural abundance in tissues mostly reflects that of the diet and is informative about the dietary origin of tissue AA (Fernandes et al., 2012; Kurle et al., 2014; McCutchan et al., 2003; O'Brien, 2015; Wolf et al., 2015). Indeed, because in contrast to N which is mainly provided by dietary proteins, C is present in each macronutrient with distinctive natural  $^{13}\text{C}$  abundances, and  $^{13}\text{C}$  abundances in tissue proteins can be used to trace the contribution of each nutrient to the synthesis of non-indispensable AA in the body, which may vary with to nutritional and metabolic conditions (Fernandes et al., 2012; Kurle et al., 2014; Mantha et al., 2018; Wolf et al., 2015).

In this study, after 4 mo of HF feeding in 42 Wistar rats, we explored the links between the MS degree and the extent of protein synthesis and amino acid metabolism in numerous tissues, as assessed by isotopic methods at either enriched or natural abundance levels, respectively. The protein synthesis rates were calculated using a  $^2\text{H}_2\text{O}$  tracer method, while  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  natural abundances in tissue proteins were used to assess the proportion of tissue AA used for oxidation rather than protein synthesis and the relative utilization of nutrients for tissue AA synthesis, respectively.

## Methods

### *Animals and diet*

Male Wistar rats ( $n = 48$ ) weighting  $253 \pm 7.6$  g (Envigo, France) were kept on their breeding diet (2018S, Envigo) and adapted to housing conditions (individual housing, 12h light-dark cycle) for a week. Six rats were then euthanized as described below for tissue baseline isotopic analyses (day 0) and 42 rats were switched to a western-type HF diet with *ad libitum* access to food and drinking water for 4 months. The diet provided 21% of its energy as protein, 54% as lipids and 25% as carbohydrates (CHO), of which 14% as starch and 11% as sucrose (Table S1). Sucrose came from sugar cane for one third of the rats, from sugar beet for another third and from a 50/50 mix of cane and beet for the last third. On day 6, hair was collected by shaving a small area ( $\approx 4$  cm<sup>2</sup>) of the back and newly grown hair was collected from the same area every 2 weeks. At 3, 9, 24, and 66 days of HF feeding, blood was drawn from the tail vein following an overnight fast. After centrifugation, plasma and red blood cells were rapidly aliquoted, frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C. After 4 months, a bolus of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O saline ( $20.3 \pm 1.2$ g per kg at 99.9 at%, Euriso-top) was administered intraperitoneally under isoflurane light anesthesia ~44h prior to euthanasia. Blood was drawn from the tail vein 2h after the bolus injection and rats were given access to drinking water enriched in <sup>2</sup>H at 5 at% afterward until euthanasia. At baseline ( $n = 6$ ), and 4 months later ( $n = 42$ ), euthanasia was performed after an overnight fast. Briefly, rats were deeply anesthetized by isoflurane inhalation, blood was drawn from the inferior vena cava after laparotomy and death was induced by rupture of the aorta. Multiple tissues (small intestine, liver, plasma, kidneys, heart, *gastrocnemius* and *tibialis anterior* muscles, epididymal and subcutaneous adipose tissues) were then collected, rinsed, weighted, snap-frozen in liquid N<sub>2</sub>, and stored at -80°C until further analyses.

### *Food intake and weight gain efficiency*

Body weight and food intake were measured weekly throughout the experiment. Food intake relative to body weight (g of diet/100 g of body weight/d, %/d) and weight-gain efficiency (weight gain/food intake since the HF diet feeding onset, %) were calculated for each one-week period as well as for the whole 4-months study.

### *Metabolic and phenotypic classification*

Following the 4-mo of HF feeding, the rats were fully characterized metabolically. Plasma insulin concentration was measured by ELISA (Merckodia, Sweden) and plasma glucose concentration was measured with the glucose oxidase method (Randox, UK). HOMA-IR was calculated as the product of insulin ( $\mu\text{U/ml}$ ) and glucose ( $\text{mg/dl}$ ) levels and scaled so that the mean HOMA-IR of MS-resistant rats equal 1 (Cacho et al., 2008). Triglyceride concentrations were measured in plasma and liver homogenates using enzymatic colorimetric assays (Randox, UK).

The degree of MS was quantified using six individual components of obesity, insulin resistance or lipid dysmetabolism: weight, body adiposity (g of body fat / g of body weight), visceral adiposity (g of visceral fat / g of body weight), HOMA-IR, and liver and plasma triglyceride levels. These six individual components were standardized into z-scores ((raw value – mean) / standard deviation) and their average was used as a continuous variable for the degree of MS ( $Z_{\text{MS}}$ , the MS score). Unsupervised hierarchical clustering on these individual components was also used to partition the rats into homogeneous phenotypic groups.

### *Tissue protein extraction and masses*

Frozen tissues were pulverized with a pestle and mortar under liquid  $\text{N}_2$ . Proteins were precipitated with trichloroacetic acid (10%, 7  $\mu\text{L}$  per mg of tissue). Twice, following centrifugation (10,000g, 4°C, 20min), the supernatant containing free AA was removed, combined and stored at -20°C until isotopic analysis, and the protein pellets were washed with trichloroacetic acid (10%) and freeze-dried. Thereafter, the protein pellets were delipidated using 1:1 ethanol:ether. Twice, the proteins were mixed on a tube rotator for 1h with the solvent mixture and the solvent was discarded after a brief centrifugation (1000g, 20°C, 5min). Solvent traces were eliminated by centrifugal evaporation and protein pellets were stored at room temperature until isotopic analyses. The protein yield per mg of fresh tissue was determined from the weight of delipidated proteins relative to the amount of tissue treated. Adipose tissue was first homogenized in 0.9% NaCl using an Ultra-Turrax homogenizer (T25 digital, IKA). Following centrifugation (2000g, 2°C, 20min), the infranatant containing the proteins was collected using a syringe and needle. Adipose tissue proteins were further precipitated with trichloroacetic acid (100%, 100  $\mu\text{L}$  per g of fresh tissue) and thereafter treated as described for other tissues. Hair was delipidated as described for tissue

proteins and analyzed without further treatment. The faeces were freeze-dried and pulverized, and the resulting powder analyzed without further treatment.

For each tissue, the protein mass (mg N) was determined from the weight of the tissue, the protein yield per mg of fresh tissue, and the nitrogen percentage in protein measured by elemental analysis (Vario Micro Cube; Elementar).

#### *Natural abundances of stable N and C isotopes in tissue proteins*

C and N isotopic compositions of samples were measured with an isotope-ratio mass spectrometer (Isoprime; VG Instruments) coupled to an elemental analyzer (Vario Micro Cube; Elementar). Tyrosine was used for calibration and drift correction. The natural abundances of N and C stable isotopes in samples were expressed relative to standards (atmospheric N<sub>2</sub> for <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N and Vienna Pee Dee Belemnite for <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, respectively) using the delta notation:

$$\delta (\text{‰}) = 1000 \times (R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}) / R_{\text{standard}} \quad [1]$$

where  $\delta$  is the parts-per-thousand difference in ratio of heavy to light isotopes (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N and <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) in the samples ( $R_{\text{sample}}$ ) and standards ( $R_{\text{standard}}$ ). We measured  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in the proteins of the different tissues sampled, in the faeces, and also in dietary proteins, CHO and lipids.  $\delta^{15}\text{N}$  values of tissue proteins were expressed relative to the  $\delta$  value of dietary proteins using the capital delta notation ( $\Delta^{15}\text{N}_{\text{tissue proteins}} = \delta^{15}\text{N}_{\text{tissue proteins}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{dietary proteins}}$ ).

For a subset of tissues (liver, intestine, and *tibialis anterior* muscle) in a subset of rats ( $n=21$ ), isotopic analyses of individual AA from tissue proteins were performed by gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry at UC Davis Stable Isotope Facility as previously described (Walsh et al., 2014). Briefly, extracted tissue proteins were hydrolyzed at 150°C in 6M HCL for 70min under N<sub>2</sub> headspace. The resulting AA were dried in a 60°C heating block under a stream of N<sub>2</sub>, and resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of 0.1M HCL. Methoxycarbonyl AA methyl esters (AA-MCF) were prepared by reacting 100  $\mu\text{L}$  of AA solution and 20  $\mu\text{L}$  of internal reference (norleucine) with 15  $\mu\text{L}$  methyl chloroformate. AA-MCF were extracted in 100  $\mu\text{L}$  chloroform dried with 0.1 mg of sodium sulfate. AA-MCF were separated on a Agilent DB-23 column (30 m x 0.25 mm ID, 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) and combusted at 1000°C. The water was removed from the N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> produced with a nafion™ dryer and their  $\delta$  values were measured using a Delta V Advantage isotope ratio mass spectrometer (ThermoFisher).

### *Protein synthesis rates*

As fully described in supplemental text 1, tissue protein fractional synthesis rate (FSR) was determined in two ways, using two stable isotope tracer techniques at enriched or natural abundance levels: for most tissues, we used a  $^2\text{H}_2\text{O}$  labeling method to estimate the mean FSR (mean value over both postprandial and postabsorptive periods) over the last ~2d of HF feeding, while for the tissues regularly sampled throughout the 4-mo of HF feeding (namely, plasma, red blood cells and hair), we used a  $\delta^{15}\text{N}$  diet-shift method to estimate mean FSR over the whole 4-mo experiment.

Briefly, the  $^2\text{H}_2\text{O}$  method consisted in the  $^2\text{H}$  labeling of precursor and product of protein synthesis (Belloto et al., 2007; Busch et al., 2006; Gasier et al., 2010), and the  $^2\text{H}$  enrichment was measured in free and protein-bound alanine of sampled tissues after body water had been enriched by  $^2\text{H}_2\text{O}$  administration for ~2d ( $1.87 \pm 0.02\text{d}$ ). Protein-bound AA were extracted from tissue proteins by hydrolysis in 6M HCL (0.1ml per mg) for 24h at  $110^\circ\text{C}$ . Protein-bound and free AA were passed through a 0.45- $\mu\text{m}$  syringe filter (Nalgene, ThermoFisher), applied to a Dowex H+ resin (50WX8, sigma) in a Pasteur pipette plugged with glass wool, and eluted with 1 ml of 4M  $\text{NH}_4\text{OH}$  and 3ml of  $\text{H}_2\text{O}$ . One mL of the eluate containing the AA was dried by centrifugal evaporation and reacted with 100  $\mu\text{l}$  of 1:1 *N,N*-dimethylformamide dimethyl acetal (Methyl-8 Reagent, Thermofisher): acetonitrile for 20 min at  $100^\circ\text{C}$ . The solution was injected in a GC/MS (6890/5973, Agilent) in the electron impact mode and selective ion monitoring of  $m/z$  99,100, 158, and 159 was performed.

Enrichments were calculated based on a standard curve of known enrichments corrected for variations in abundance as previously described (Patterson et al., 1998). Protein FSR and absolute synthesis rates (ASR) were calculated as:

$$\text{FSR } [\%/d] = 100 \times \ln \left( \frac{E_{AA} - E_{P0} [\text{at}\%]}{E_{AA} - E_P [\text{at}\%]} \right) / t [\text{d}] \quad [2]$$

$$\text{ASR } [\text{mg}/d] = (\text{FSR } [\%/d] / 100) \times \text{tissue proteins } [\text{mg}] \quad [3]$$

where  $t$  (d) is the time of  $^2\text{H}_2\text{O}$  exposure from  $^2\text{H}_2\text{O}$  injection to tissue sampling,  $E_{AA}$  (at%) is the  $^2\text{H}$  enrichment of tissue free alanine,  $E_P$  and  $E_{P0}$  (at%) are the enrichments of protein-bound alanine at time  $t$  and before  $^2\text{H}_2\text{O}$  injection, respectively (with  $E_{P0}$  measured in 6 rats euthanized at baseline). As demonstrated in supplemental text 1, equation [2] was derived for allowing reliable

FSR estimations at any time during  $E_P$  exponential rise-to-plateau kinetics, so that it can be applied to both slowly turning-over proteins (which are after 2d in the initial part of their kinetics and have a quasi-linear increase in  $E_P$ ) and rapidly turning-over proteins (which are in the later part of their kinetics and have a non-linear increase in  $E_P$ ).

With the  $\delta^{15}\text{N}$  diet-shift method, we analyzed tissue protein  $\delta^{15}\text{N}$  exponential rise-to-plateau kinetics from the shift to the HF diet until the end of the experiment. The shift to the HF diet resulted in a slight natural increase in dietary  $\delta^{15}\text{N}$ , because the HF diet contained casein whereas the breeding diet was mostly based on vegetable protein having a lower  $\delta^{15}\text{N}$ . By capturing the whole  $\delta^{15}\text{N}$  diet-shift kinetics, this method allowed estimation of mean FSR values over the whole 4-mo period of HF feeding. The post-diet shift  $\delta^{15}\text{N}$  kinetics in tissue proteins were carefully analyzed as described elsewhere for such incorporation data (Martinez del Rio and Anderson-Sprecher, 2008; Martinez del Rio and Carleton, 2012): for each tissue protein, we compared the ability of exponential models of increasing order to fit the data and selected the best model on the basis of objective statistical criteria. In particular, using the small-sample Akaike information criterion, we compared the fits obtained from the following mono- and bi-exponential models (Martinez del Rio and Anderson-Sprecher, 2008):

$$\text{Mono-exponential model: } \delta(t) = \delta_{\infty} + (\delta_0 - \delta_{\infty}) \times \exp^{-(\text{FSR}/100) \times t} \quad [4]$$

$$\text{Bi-exponential model: } \delta(t) = \delta_{\infty} + (\delta_0 - \delta_{\infty}) \times [ p \times \exp^{-(\text{FSR}_1/100) \times t} + (1-p) \times \exp^{-(\text{FSR}_2/100) \times t} ] \quad [5]$$

where  $t$  (d) is the time since the HF diet-shift,  $\delta(t)$  (‰) is the  $\delta^{15}\text{N}$  value of the tissue protein at time  $t$ ,  $\delta_0$  and  $\delta_{\infty}$  (‰) are the  $\delta^{15}\text{N}$  initial and final equilibrium values, respectively. In the mono-exponential model, the protein pool is supposed to be kinetically homogenous with FSR (%/d) its fractional synthesis rate, while in the bi-exponential model, the protein pool is supposed to consist of two distinct protein pools having different turnover rates, with  $\text{FSR}_1$  and  $\text{FSR}_2$  (%/d) their respective fractional synthesis rates and  $p$  and  $(1-p)$  their respective proportions in the whole protein pool. The FSR estimates were further used to calculate the time required for tissue proteins to reach 95% of their new isotopic equilibrium after the shift to the HF diet ( $T_{95\%}$ ). Models equations, model selection and  $T_{95\%}$  calculations are further explained in supplemental text 1.

*Tissue AA allocation between anabolic and catabolic pathways*

Using a multi-compartmental analysis of multi-tissue  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements in rats, we previously showed that tissue protein  $\Delta^{15}\text{N}$  vary as a function of  $p_{\text{ox}}$ , the proportion of tissue AA that are directed towards oxidation rather than used for protein synthesis (Poupin et al., 2014). In particular, at isotopic steady state, we have showed the following relationship:  $\Delta^{15}\text{N} = -p_{\text{ox}} \times \varepsilon_{\text{ox}} + C$ , with  $\varepsilon_{\text{ox}}$  being the isotopic fractionation associated with AA oxidation and C a constant that depends on the  $\Delta^{15}\text{N}$  of the AA supplied to the tissue. According to our model mechanistic analysis of  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements, we have showed that all tissues except muscle have a negative  $\varepsilon_{\text{ox}}$ , so that a rise in  $\Delta^{15}\text{N}$  levels indicates an increase in  $p_{\text{ox}}$  in all tissues except muscle, where in contrast it is indicative of a reduction in  $p_{\text{ox}}$  because of its opposite (positive) sign of  $\varepsilon_{\text{ox}}$ . This was validated experimentally in energy-restricted rats experiencing a general protein wasting in liver and muscles by  $p_{\text{ox}}$  stimulation, which resulted in opposite effects on the  $\Delta^{15}\text{N}$  of liver-synthesized and muscular proteins: the association between  $p_{\text{ox}}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$  was positive for the liver-synthesized, both constitutive and exported, proteins but negative in the cardiac and gastrocnemius muscles (Huneau et al., in press). Our model prediction for the  $\Delta^{15}\text{N}$  and  $p_{\text{ox}}$  relationship in splanchnic tissues was further validated experimentally by combining AA tracers and arteriovenous balance methods in ruminants: we showed that the  $\Delta^{15}\text{N}$  of plasma proteins, which are synthesized in the splanchnic bed and mainly in liver, linearly increases with splanchnic AA metabolism and oxidation and liver urea production (Cantalapiedra-Hijar et al., 2015). In the present study, the  $Z_{\text{SM}}$ -driven  $\Delta^{15}\text{N}$  variations were interpreted in terms of  $p_{\text{ox}}$  variations, in the light of these previous modeling (Poupin et al., 2014) and experimental (Cantalapiedra-Hijar et al., 2015) results.

#### *Contribution of nutrients to tissue AA synthesis*

Even though dietary proteins are preferentially routed to tissue proteins as AA, dietary lipids and CHO are used for the biosynthesis of non-indispensable AA and thus also routed to protein synthesis (Fernandes et al., 2012; Kurle et al., 2014; Mantha et al., 2018), the degree of which could vary with the extent of MS. Four months after the switch from the breeding to HF diet, by hypothesizing an isotopic steady state due to the entire renewal of tissue proteins, the  $\delta^{13}\text{C}$  of tissue proteins represents the sum of dietary macronutrient  $\delta^{13}\text{C}$  values weighted by their respective contributions to C in tissue proteins (routing coefficients), plus the difference in  $\delta^{13}\text{C}$  between diet and tissue proteins due to isotopic fractionation along metabolic pathways (the trophic step):

$$\delta^{13}\text{C}_T = p \times (\delta^{13}\text{C}_P + \text{TS}_P) + c \times (\delta^{13}\text{C}_C + \text{TS}_C) + (1-p-c) \times (\delta^{13}\text{C}_L + \text{TS}_L) \quad [6]$$

$$\delta^{13}\text{C}_T = p \times \delta^{13}\text{C}_P + c \times \delta^{13}\text{C}_C + (1-p-c) \times \delta^{13}\text{C}_L + \text{TS} \quad [7]$$

where  $\delta^{13}\text{C}_T$ ,  $\delta^{13}\text{C}_P$  and  $\delta^{13}\text{C}_C$ , and  $\delta^{13}\text{C}_L$  are the  $\delta^{13}\text{C}$  values of proteins in a tissue and of dietary proteins, CHO, and lipids, respectively,  $p$ ,  $c$ , and  $(1-p-c)$  are the proportions of dietary proteins, CHO and lipids routed to C in tissue proteins (the routing coefficients), respectively,  $\text{TS}_P$ ,  $\text{TS}_C$ , and  $\text{TS}_L$  are the macronutrient-specific trophic steps on dietary protein, CHO and lipids, respectively, and  $\text{TS}$  is the global trophic step ( $\text{TS} = p \times \text{TS}_P + c \times \text{TS}_C + (1-p-c) \times \text{TS}_L$ ).

The 3 unknowns of equation [7] are the parameters  $p$ ,  $c$  and  $\text{TS}$  (the routing coefficients and global trophic step). We hypothesized that these parameter values were similar in rats having a similar phenotype (i.e., resistant or sensitive to obesity or MS), but may vary between phenotypes. To identify its 3 parameters, equation [7] has to be solved for 3 different values. To this aim, rats were randomly allocated into 3 groups receiving diets with the same nutrient composition but with different  $\delta^{13}\text{C}_C$  values: the natural isotopic difference between sucrose originating from sugar cane and sugar beet was used to obtain 3 diets with distinct  $\delta^{13}\text{C}_C$  values. For each tissue, parameter estimation was first conducted on the individual data of all rats, by multiple linear regression using the `lsqin` function of Matlab (Matlab 7.5, The Mathworks, Natick, USA), so as to obtain mean parameter estimates over the whole population. Moreover, as these parameter values could vary between the phenotypes identified by hierarchical clustering, we conducted an analysis of the residuals of the individual fits obtained from the mean parameter estimates: we searched for systematic differences in residuals between phenotypes and for significant correlations between residuals and  $Z_{\text{MS}}$ , indicating a phenotype effect on parameter values. In the tissues where such an effect was detected, parameter estimation was conducted on each phenotype group (which all contained rats from each of the 3 dietary  $\delta^{13}\text{C}_C$  groups).

This method was applied to  $\delta^{13}\text{C}$  values measured in tissue proteins and also in some of their individual AA, glutamate and glutamine (Glx). This respectively allowed estimation of the routing coefficients to all protein-bound AA and of the specific routing coefficients to protein-bound Glx in tissues.

### *Statistical analyses*

Results were expressed as mean  $\pm$  SD. *P* values  $\leq$  0.05 were considered significant. Analyses were performed using SAS version 9.1 (SAS Institute, Cary, NC). Individual MS components (weight, total and visceral adiposities, HOMA-IR, plasma and liver triglycerides) were checked for normality (PROC UNIVARIATE). Phenotypes (R, OP and SMP) were identified by unsupervised hierarchical clustering based on individual MS components (PROC CLUSTER with Ward's method). Differences between phenotypes in MS components and in tissue protein mass and synthesis rates were identified using ANOVAs (PROC GLM) with post-hoc comparisons. The 4-mo kinetics of body weight, food intake and weight gain efficiency were analyzed using repeated-measures ANOVAs (PROC MIXED) with time as repeated factor and phenotype as a between-group factor, with post-hoc comparisons in case of significant interaction between time and phenotype. Associations of  $Z_{MS}$  with tissue protein synthesis rates and  $\Delta^{15}N$  values were assessed with linear regressions (PROC REG). For multiple comparisons, the false discovery rate (FDR) was controlled at 5% using the Benjamini-Hochberg procedure (Benjamini and Hochberg, 1995).

## Results

### *Metabolic and phenotypic characterization*

As reported in Table 1, after 4 mo of HF feeding, there was a large interindividual variability in the individual MS components and rats differed in terms of body composition (CV of 10-15 % for body weight, body adiposity and visceral adiposity) and more widely in terms of metabolic parameters (CV of 27-62% for HOMA-IR, liver and plasma triglyceride levels). As shown in Figure 1, the MS score  $Z_{MS}$ , the average of the z-scores for the six MS individual components, varied between -1.28 and 1.64 over the population, and 3 numerically balanced phenotypes, representing approximately a third of the rats each, were identified using hierarchical classification based on the MS individual components: MS-resistant (R,  $n = 15$ ), healthy obese being obese-prone only (OP,  $n = 13$ ) and MS-prone (MSP,  $n = 14$ ). The intermediary OP phenotype was closer to the R than to the MSP phenotype (Figure 1B), and  $Z_{MS}$  was respectively of  $-0.73 \pm 0.40$ ,  $-0.11 \pm 0.22$  and  $0.89 \pm 0.35$  for the R, OP and MSP phenotypes (Figure 1A). Differences between phenotypes are further detailed in Figure S1. Compared to R rats, body weight and body and visceral adiposities were higher in OP rats and even more in MSP rats (Figure S1A-C). In contrast, HOMA-IR and plasma and liver triglycerides were only elevated in MSP rats (Figure S1D-F), which were the sole rats with liver steatosis (hepatic lipid content of  $12.7 \pm 3.2$  % in MSP rats vs  $8.3 \pm 1.9$  % in both R and OP rats).

### *Food intake and weight gain efficiency*

As presented in Figure 2, body weight (Figure 2A) increased while food intake relative to body weight (Figure 2B) and weight gain efficiency (Figure 2C) decreased during the 4 mo of HF feeding. For body weight and relative food intake, there were significant effects of time, phenotype and their interactions. Body weight was higher in MSP vs R rats from day 7 and onward, in OP vs R rats from day 21 and onward, and in MSP vs OP rats from day 63 and onward. Relative food intake was higher in OP vs R rats during the first week and in MSP vs R rats during the first 3 weeks, upon which it was similar in the 3 phenotypes. When considering overall values over the whole 4-mo period of HF feeding, relative food intake was higher in MSP vs R rats, and intermediate in O rats. For weight gain efficiency, there were significant effects of time and phenotype but no significant interaction. Weight gain efficiency decreased similarly in all phenotypes but was slightly consistently higher in MSP and OP rats compared to R rats, thus

resulting in a higher overall weight gain efficiency for the whole 4-mo period of HF feeding (Figure 2C).

#### *Masses and synthesis rates of tissue proteins*

As shown in Figure 3, the liver, kidney and heart protein masses measured after 4 mo of HF feeding, and the liver and kidney protein ASR measured during the last 2d differed between phenotypes. In the liver, the protein mass and ASR were similar in OP and R rats, but the protein mass was 33% and 19% higher in MSP rats compared to R and OP rats, respectively, while the protein ASR was 44% and 27% higher, respectively. Compared to R rats, MSP rats also had a 13% (22%) higher protein mass (ASR) in the kidneys, and a 10% higher protein mass in the heart. In contrast, there was no difference between phenotypes in protein mass and ASR of skeletal muscles.

#### *Natural abundances of stable N isotopes in tissue proteins*

$\Delta^{15}\text{N}$  values in the tissue protein sampled after 4-mo of HF feeding are presented in Table S2. By analyzing the  $\delta^{15}\text{N}$  kinetics in regularly sampled protein pools after the shift to the HF diet (Figure S2), we identified a single kinetically-homogenous pool for RBC and hair proteins, but two protein pools with distinct (a fast and a slow) FSR values for plasma proteins which mix proteins of intestinal and hepatic origins (with fast and slow turn over, respectively). The FSR identified as such represented averaged FSR over the whole 4-mo period of HF feeding (i.e., 4-mo FSR), and the times necessary to reach  $\delta^{15}\text{N}$  equilibrium ( $T_{95\%}$ ) were found of  $47 \pm 26\text{d}$ ,  $79 \pm 38\text{d}$  and  $134 \pm 13\text{d}$  for hair, plasma and red blood cell proteins, respectively.

#### *Associations between MS score and indicators of protein and AA metabolism in tissues*

For the different tissues, the slopes of the regressions of the different indicators of protein synthesis (FSR and ASR estimated at the end and over the whole (4-mo FSR) 4-mo period of HF feeding) and AA metabolism ( $\Delta^{15}\text{N}$  that sign  $p_{\text{ox}}$ , the proportion of AA catabolism vs anabolism) over the MS score ( $Z_{\text{MS}}$ ) are presented in Table 2. For the liver, the synthesis of both constitutive and exported proteins increased with  $Z_{\text{MS}}$ , as indicated by positive associations between  $Z_{\text{MS}}$  and liver protein ASR ( $\beta= 13.80$ ), plasma protein ASR ( $\beta= 17.11$ ), plasma protein FSR ( $\beta= 0.074$ ) and plasma protein 4-mo FSR ( $\beta= 0.006$ ). Concurrently, in the liver, the proportion of AA catabolism decreased with  $Z_{\text{MS}}$ , as indicated by negative associations between  $Z_{\text{MS}}$  and liver ( $\beta= -0.085$ ) and plasma ( $\beta= -0.089$ ) protein  $\Delta^{15}\text{N}$ . In contrast, for skeletal muscles, we only observed a weaker

positive association between  $Z_{MS}$  and the protein ASR ( $\beta= 0.66$ ) and FSR ( $\beta= 0.004$ ) of the *gastrocnemius* muscle with no associated effect on the proportion of AA catabolism, and we found no effect for the *tibialis anterior* muscle, as for the heart and small intestine.  $Z_{MS}$  was also positively associated with kidney protein ASR ( $\beta= 3.68$ ), and negatively with epididymal adipose tissue ( $\beta= -0.070$ ), RBC ( $\beta= -0.051$ ), and hair ( $\beta= -0.104$ ) protein  $\Delta^{15}N$ .

Analyses of the  $\delta^{15}N$  of individual AA from tissue proteins confirmed that the proportion of AA catabolism decreased as  $Z_{MS}$  increased in the liver, but stayed unchanged in the *tibialis anterior* muscle and the small intestine (Table S4). Indeed,  $Z_{MS}$  was negatively associated with the  $\delta^{15}N$  of numerous protein-bound AA in the liver, namely Asx ( $\beta = -0.767$ ), Glx ( $\beta = -0.897$ ), Pro ( $\beta = -0.376$ ), Met ( $\beta = -1.048$ ) and Phe ( $\beta = -0.672$ ). In contrast, a negative association between  $Z_{MS}$  and  $\delta^{15}N$  was only observed for protein-bound Glx ( $B= -0.841$ ) and Leu ( $B= -0.360$ ) in the small intestine and no association was observed for AA from the *tibialis anterior* muscle.

Figure 4 shows the correlations between the  $\Delta^{15}N$  and FSR values for each tissue protein. We found negative associations between the protein  $\Delta^{15}N$  and FSR in plasma, RBC and hair ( $-0.49 \leq R \leq -0.40$ ,  $p < 0.01$ ), and between the protein  $\Delta^{15}N$  and ASR in liver ( $R = -0.33$ ,  $p < 0.05$ ). In the opposite, we found a positive association between the protein  $\Delta^{15}N$  and FSR in heart ( $R = 0.30$ ,  $p < 0.05$ ). No relationship was observed between the protein  $\Delta^{15}N$  and FSR in small intestine, liver and skeletal muscles.

#### *Nutrient use for AA synthesis*

The  $\delta^{13}C$  values of protein and protein-bound AA from the tissues analyzed after 4-mo of HF feeding are listed in Table S3. These values were used to estimate the contributions of macronutrients to C in tissue proteins (i.e. nutrient routing), by direct AA deposition or AA synthesis. Table 3 presents the routing of each macronutrient toward tissue proteins and toward protein-bound Glx in these proteins. All tissue proteins were preferentially sourced from dietary proteins, with dietary protein, CHO and lipid routings that averaged  $72.6 \pm 2.8\%$ ,  $10.4 \pm 1.1\%$  and  $17.0 \pm 1.7\%$ , respectively, across the tissues. In addition, there was no effect of the phenotype on nutrient routing to all AA in liver, *gastrocnemius* and *tibialis anterior* muscles, heart, kidney and RBC proteins, but MSP rats routed slightly more dietary lipids than R rats to small intestinal proteins (absolute increase of 1%). Concerning nutrient routing to Glx in tissue proteins, dietary protein routing averaged  $47.2 \pm 13.4\%$  across tissues and MSP rats routed less dietary lipids than

R rats to Glx in the proteins of the liver and the *tibialis anterior* muscle (absolute decreases of 2.6% and 9.9%, respectively).

## Discussion

In this study, by taking advantage of the inter-individual variability in diet-induced MS sensitivity of Wistar outbred rats, we explored if MS-prone rats exhibit alterations in their tissue protein and AA metabolism compared to MS-resistant rats fed the same HF diet. This allowed us to specifically study the MS-associated metabolic alterations apart from any confounding dietary factor, in contrast to other studies where MS effects are generally studied by comparing animals fed different diets (e.g., high- vs normal-fat diets). In addition, in our study, we did not include only rats with the two extreme phenotypes as in classical prone/resistant-based studies (Giles et al., 2016), but also kept animals with intermediate phenotypes in the population to increase the study's statistical power. After 4 months of HF-feeding, the degree of MS was assessed for each animal using a continuous score ( $Z_{MS}$ ), and compared to the extent of protein synthesis fluxes (FSR and ASR, the fractional and absolute synthesis fluxes) and proportions of AA catabolism ( $p_{ox}$ , the proportion of AA directed towards oxidation rather than used for protein synthesis) measured in various tissues by isotopic methods at enriched and natural abundance levels, respectively. Indeed, protein FSR and ASR were measured by  $^2H_2O$  labeling, while  $p_{ox}$  was estimated from protein  $\Delta^{15}N$  measurements (i.e., natural differences in  $^{15}N$  enrichment between tissue and dietary proteins) based on previous knowledge issued from a compartmental model from our group that explains the complex functioning of the body's  $\Delta^{15}N$  system (Poupin et al., 2014). In addition, we developed a routing model analysis of protein  $\Delta^{13}C$  measurements (i.e., natural differences in  $^{13}C$  enrichment between tissue proteins and nutrients) to estimate the respective contributions of macronutrients to C in tissue proteins, and in particular the use of C issuing from dietary lipid beta-oxidation for the biosynthesis of non-indispensable AA.

### *Tissue protein $\Delta^{15}N$ and $\Delta^{13}C$ interpretation*

A necessary condition to validate our modeling interpretations of tissue protein  $\Delta^{15}N$  and  $\Delta^{13}C$  data was that sufficient time had elapsed for complete elemental and isotopic turnover of tissue proteins since the introduction of the HF diet, i.e.  $\Delta^{15}N$  and  $\Delta^{13}C$  were no longer evolving but had reached their final equilibrium values with the HF diet. In our study, nearly all body proteins except RBC had very likely reached their isotopic equilibrium after 120 d, since the times necessary to reach  $\Delta^{15}N$  and  $\Delta^{13}C$  equilibrium ( $T_{95\%}$ ) in rat tissues have been reported to range from less than or about 50 d in small intestine, liver and plasma to about 100 d in muscles (Arneson

and MacAvoy, 2005; Kraeer et al., 2014; Kurle, 2009; MacAvoy et al., 2006; MacAvoy et al., 2005), whereas a longer  $T_{95\%}$  of 130-180 d has been reported for RBC (Kurle, 2009; Poupin et al., 2014). Accordingly, in the present study, analysis of the protein  $\Delta^{15}\text{N}$  kinetics in pools regularly sampled resulted in  $T_{95\%}$  values of  $47 \pm 26\text{d}$ ,  $79 \pm 38\text{d}$  and  $134 \pm 13\text{d}$  for proteins of hair, plasma and RBC, respectively. This indicated that of all the studied tissues, only RBC had not achieved isotopic equilibrium but were very close to it, since RBC isotopic values had reached 91-95 % of their final equilibrium values at 120 d.

We thus interpreted the MS-associated  $\Delta^{15}\text{N}$  variations in terms of  $p_{\text{ox}}$  variations as follows: a  $\Delta^{15}\text{N}$  rise indicated a  $p_{\text{ox}}$  increase in all tissues except muscle, where it indicated in contrast a  $p_{\text{ox}}$  reduction as supported by our mechanistic model analysis of multi-tissue  $\Delta^{15}\text{N}$  measurements in rat (Poupin et al., 2014) and experimental results in ruminant (Cantalapiedra-Hijar et al., 2015) and rat (Huneau et al., in press). As  $p_{\text{ox}}$  reflects the ratio of AA oxidation to protein synthesis, the above-mentioned relationships between  $p_{\text{ox}}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$  must translate into inverse relationships between protein synthesis and  $\Delta^{15}\text{N}$ . In line with this, in the present study we were able to evidence opposite relationships between  $\Delta^{15}\text{N}$  and protein synthesis (FSR and/or ASR) in liver and muscle proteins, with negative associations for liver exported and constitutive proteins and in contrast positive associations for cardiac muscle protein (Fig. 4).

We also interpreted our protein  $\Delta^{13}\text{C}$  measurements using a routing model for estimating the respective contributions of macronutrients to C in tissue proteins (i.e., the routing coefficients of equation [7]). Numerical identification of the 3 routing model parameters required the use of 3 distinct  $\delta^{13}\text{C}$  signatures for a given macronutrient, and CHO (sucrose) was the only ingredient for which there may be  $\delta^{13}\text{C}$  differences without any difference in nutritional characteristics. By using the natural isotopic difference between cane and beet sucrose, rats were allocated into 3 groups receiving diets with largely distinct  $\delta^{13}\text{C}$  values but similar nutrient composition, and we were able for the first time to distinguish the respective routings of the 3 macronutrients. As expected, we found a major and stable contribution of dietary protein, with  $73 \pm 3\%$  of tissue protein C originating from dietary protein across all tissue proteins and rats, which is strictly consistent with the mean values and minor inter-tissue variations reported in the literature for protein routing under adequate protein intake (Fernandes et al., 2012; Hobbie, 2017; Kurle et al., 2014; MacAvoy et al., 2006; Mantha et al., 2018). Moreover, under our HF feeding conditions, we found that lipids

contributed to nutrient routing more than CHO ( $17 \pm 2\%$  vs  $10 \pm 1\%$  across the different tissues and rats), and in the same proportion as their dietary occurrence (i.e., dietary lipids contributed to 62% of non-protein C routed to tissue proteins, and to 62% of C in non-protein dietary macronutrients). These mean values and minor inter-tissue variations for lipid and CHO routings probably reflect the fact that almost all tissues are reliant on a mix of energy fuels during the postprandial period and more on lipids during the post-absorptive period. In a previous rat study, lipids were found to contribute to the routing of C from non-protein macronutrients less than their contribution to non-protein C in the diet under HF feeding, but the nutrient routing estimation was done under simplifying assumptions that could have biased the estimates (Mantha et al., 2018). In the present study, the nutrient routing estimation was more reliable theoretically, even if our choice of labeling CHO, which turned out to be a minor contributor to nutrient routing in our experimental conditions, unfortunately led in practice to limited  $\delta^{13}\text{C}$  differences in tissue proteins between diet groups (the  $\sim 3.5\text{‰}$  between-groups  $\delta^{13}\text{C}$  differences in dietary CHO led to only  $\sim 0.35\text{‰}$  between-groups  $\delta^{13}\text{C}$  differences in tissue proteins, and even smaller differences in individual AA of tissue proteins). This was sufficient to ensure a reliable estimation of the nutrient routing to tissue proteins, because the  $0.35\text{‰}$  between-group  $\delta^{13}\text{C}$  differences were higher than the  $0.05\text{‰}$  experimental noise associated to  $\delta^{13}\text{C}$  measurements by EA-IRMS. In contrast, because of the higher experimental noise associated to  $\delta^{13}\text{C}$  measurements in individual AA by GC-C-IRMS ( $0.2\text{-}0.8\text{‰}$  depending on individual AA), we encountered several numerical problems when estimating the nutrient routing to individual non-indispensable AA in tissue proteins. As a consequence, only the results for Glx, the most abundant non-indispensable AA in tissues for which most reliable estimates were obtained, are presented here.

#### *MS sensitivity: characteristics and determinants*

After 4 mo of HF feeding, there was a large variability in each individual MS component, with rats differing in body composition and obesity (CV of 10-15%) and even more in their metabolic parameters (CV of 30-60%). Classification identified 3 different phenotypes, namely resistant (R), obese-prone (OP) and MS-prone (MSP) rats, each representing approximately one third of the population, and characterized by a progressive increase of obesity in the OP and MSP phenotypes and by metabolic alterations in the MSP phenotype only. More precisely, compared to OP rats, MSP rats were characterized by higher subcutaneous and visceral adiposities, and by liver

steatosis and insulin resistance. The OP phenotype thus corresponds to a condition of metabolically healthy obesity that concerned half of all the obese rats (OP and MSP), close to its reported prevalence in humans (Jung et al., 2015; Lassale et al., 2018). It remains unclear whether metabolically healthy obesity constitutes a sustained or transient condition, and follow-up studies in human indicate that a third of metabolically healthy obese ends up developing a MS (Caleyachetty et al., 2017; Jung et al., 2017; Lassale et al., 2018). Even though the intermediary OP phenotype was actually closer to R than MSP (Figure 1A), it is likely that the continuation of HF feeding beyond 4 months would have resulted in a change from OP to MSP phenotype in several rats.

Furthermore, in our experimental conditions, the determinants of obesity development were both behavioral and metabolic, since they involve a higher food intake relative to body weight during the first weeks and a lower metabolic capacity to dissipate the dietary energy in excess throughout the study as indicated by the higher overall weight gain efficiency in obese (OP and MSP) compared to non-obese (R) rats (Figure 2). The sensitivity to diet-induced obesity has many origins that are still a matter of debate. While most studies report a higher energy intake in prone compared to resistant rats, at least during the first weeks following the introduction of the HF diet (Azzout-Marniche et al., 2014; Commerford et al., 2001; Dourmashkin et al., 2006; Jackman et al., 2010; Paulino et al., 2009; Tulipano et al., 2004), a higher basal metabolic rate or lipid oxidation in resistant compared to prone rats, prior or soon after the introduction of the HF diet, were also observed in some studies (Commerford et al., 2000; Dourmashkin et al., 2006; Ji and Friedman, 2008; Ratner et al., 2015). If the identification of the mechanisms accounting for phenotype differences is beyond the scope of this study, our results suggest that the sensitivity to obesity might be explained by a higher energy intake during the first weeks of HF feeding followed by metabolic adaptation differences between obesity-resistant (R) and -prone (OP and MSP) rats, leading to increased energy storage and weight gain in the latter. MS development in MSP rats probably resulted from the metabolic alterations associated to their more severe obesity.

#### *MS-associated effects on tissue protein and AA metabolism*

In the liver, the synthesis of both constitutive and plasma-exported proteins increased with the MS degree, as indicated by positive associations between  $Z_{MS}$  and both fractional rates (FSR) and fluxes (ASR) of protein synthesis in liver and plasma that were estimated either at the end or

over the whole 4-mo HF feeding period (Table 2). Interestingly, the positive association between  $Z_{MS}$  (measured at the end of the 4-mo period of HF feeding) and the 4-mo FSR of plasma protein (averaged FSR over the whole 4-mo period of HF feeding) indicates that in MS-prone rats, the liver protein anabolism increased early after the introduction of the HF diet. The fact that liver protein masses and synthesis fluxes were 35-45% higher in MS-prone compared to resistant rats, but similar in healthy obese and resistant rats (Fig. 3), suggests that the stimulation of liver protein anabolism occurs in the context of MS associated dysregulations and is not merely a consequence of obesity. It is in line with the enhanced synthesis of liver-synthesized plasma fibrinogen that has been reported in the MS context, with a ~50% greater ASR in obese with hyperinsulinemia (Tessari et al., 2010) and a ~50% greater FSR in obese children with insulin resistance (Balagopal et al., 2002) compared to controls subjects. A higher liver protein synthesis in MS-prone rats was likely in the specific context of our study, as it encompassed the early phase of the MS development where the gain in fat mass comes with a concomitant gain in lean mass, as observed here and reported elsewhere (Masgrau et al., 2012). Our finding that liver protein anabolism was not stimulated by obesity alone is also in line with the unchanged liver protein masses and synthesis rates that have been reported in healthy obese rats without associated MS after a short 5-wks exposition to an HF diet (Adechian et al., 2009), and also in obese mice after a longer HF diet exposition (Anderson et al., 2008).

In contrast, in all the studied skeletal muscles, protein mass and synthesis were similar across phenotypes, although protein synthesis (both FSR and ASR) slightly increased with the MS degree in the *gastrocnemius* muscle. Results regarding the effect of obesity and MS on muscular protein synthesis are scares and rather inconsistent. In human, Guillet et al. reported a decrease in both total and mitochondrial protein FSR in the skeletal muscle of obese compared to lean men (Guillet et al., 2009), whereas according to Chevalier et al., skeletal muscle protein FSR did not differ between lean and obese men (Chevalier et al., 2015). In rats, most studies have shown that in the short term (3-6 weeks), diet-induced obesity is associated with an increase in muscle mass and muscle protein FSR (Chanseume et al., 2007; Estornell et al., 1994; Estornell et al., 1995; Masgrau et al., 2012), although one study reported no difference between obese and lean rats (Adechian et al., 2009). These increases appear transitory since in the long term (24 weeks), muscle mass and protein FSR no longer differed between lean and obese rats, suggesting that the early anabolic period associated with the onset of obesity was followed by a late anabolic resistance

period (Masgrau et al., 2012). The 17-weeks duration of the present study might have been sufficient to reach this late anabolic resistance period and to explain the absence of differences in muscular protein mass and synthesis across phenotypes. Moreover, when increasing study power by considering the 42 rats as a single population, we did not observe any link between the MS score and protein synthesis in the glycolytic *tibialis anterior* muscle that usually showed the most important anabolic response during the initiation of obesity (Chansemaume et al., 2007; Estornell et al., 1995; Masgrau et al., 2012). In contrast, a small but significant positive relationship still persisted between protein synthesis and the MS degree in the mixed (both glycolytic and oxidative) *gastrocnemius* muscle, highlighting the differences between muscles in their metabolic response to obesity, reported in most of the above-mentioned studies. This relationship was too weak, however, to translate into a difference in protein synthesis or mass between phenotypes.

Therefore, one of the most prominent result of the present study is that the MS onset was associated with an increased protein synthesis and increased protein mass in the liver but not in the skeletal muscles. In line with this liver protein synthesis increase, we observed a liver  $p_{ox}$  decrease with the MS degree, as indicated by negative associations between  $Z_{MS}$  and the  $\Delta^{15}N$  of both constitutive and exported liver proteins measured at the end of the 4-mo HF feeding period (Table 2). As  $p_{ox}$  reflects the ratio of AA oxidation to protein synthesis, our results indicate that in MS-prone compared to resistant rats, hepatic protein synthesis increased more than hepatic AA oxidation, illustrating the clear anabolic orientation of the liver protein metabolism. Since  $p_{ox}$  is a ratio, the protein synthesis increase is sufficient to explain the  $p_{ox}$  decrease in the liver, and our results do not allow to further discuss how the MS impacts the absolute flux of liver AA oxidation. In contrast, in skeletal muscles, the absence of relationship between  $\Delta^{15}N$  and  $Z_{MS}$  indicates that  $p_{ox}$  remained unchanged during the MS development. Because muscle protein synthesis did not differ across phenotypes, this suggests that muscle AA oxidation did not change with the MS degree. Very few studies have examined the MS effect on AA oxidation in muscle, with inconsistent results (Jang et al., 2016; Lerin et al., 2016; Mantha et al., 2018; She et al., 2013). Using the same  $\Delta^{15}N$  approach as in the present study, we have recently reported a change in  $p_{ox}$  in the small intestine and muscle of HF-fed obese rats (Mantha et al., 2018). However, in contrast to the present study where all rats were fed the same HF diet, the difference in  $p_{ox}$  was observed between HF-fed obese rats and lean rats fed a normal-fat, carbohydrate-based diet. In these conditions, the metabolic changes were both the consequence of the switch from a carbohydrate-

based diet to a lipid-based diet and of the MS induction. This may explain the differences observed between the present study and the previous one (Mantha et al., 2018). Lastly, in the small intestine, we found that protein synthesis and AA oxidation did not change with the MS degree. At our knowledge, there is no comparable data in the literature.

#### *MS-associated effects on nutrient routing and metabolic flexibility*

As assessed by our routing model analysis of  $\Delta^{13}\text{C}$  measurements in tissue protein Glx, the use of dietary lipid C for non-indispensable AA synthesis was lower in MSP than R rats in two tissues, muscle and, to a lesser extent, liver. Because the lipid C flux toward AA involves fatty acid beta-oxidation resulting in acetyl-CoA production, and the subsequent production of 4 and 5C intermediates through the tricarboxylic acid cycle (Fernandes et al., 2012; Mantha et al., 2018), our results suggest a reduced lipid oxidation in the muscle and liver of MS-prone rats. This decreased lipid oxidation could be a consequence of a greater mitochondrial efficiency in MS-prone rats, less fatty acids being required to produce the same amount of energy because of a tighter coupling in the mitochondria (Crescenzo et al., 2015). A reduction of lipid oxidation has previously been reported in rats prone vs resistant to obesity under HF diet (Jackman et al., 2006), and is a likely explanation for the higher weight gain efficiency we observed in obesity-prone (both OP and MSP) versus -resistant rats. Indeed, when overfeeding fat, the ability to adjust fat oxidation to fat intake is less precise than it is for CHO or protein (Jackman et al., 2006; Schutz et al., 1989), and the individual sensitivity to obesity and MS onset involves processes related to dietary lipid partitioning between oxidation and storage: resistance requires ability to increase fat oxidation in response to increased fat intake, whereas sensitivity involves alteration of this normal metabolic flexibility, the inability to match fat oxidation to lipid intake inducing fat accumulation and potentially leading to insulin resistance (Chang et al., 1990; Even et al., 2011; Galgani et al., 2008; Giles et al., 2016). Interestingly, we found that among the studied tissues, impaired metabolic flexibility was mostly observed in the muscle of MS-prone rats, in line with the fact that a defective lipid oxidation in muscle can progressively lead to fat accumulation in muscle and insulin resistance (Galgani et al., 2008; Kelley et al., 1999). Unfortunately, the metabolic flexibility was here investigated in only one muscle, the *tibialis anterior* muscle that is predominantly glycolytic, and we would probably have found an even more altered metabolic flexibility in the *soleus* muscle that is predominantly oxidative.

In conclusion, the present study shows that the HF-diet induced MS onset is associated with an increase in protein synthesis in the liver. In contrast, in skeletal muscles, the lack of difference in protein synthesis across phenotypes suggests that after 4 months of HF feeding, MS-prone rats are beyond the first anabolic phase described in the literature and have entered the anabolic resistance phase. Moreover, our results support a decreased lipid oxidation in skeletal muscle of MS-prone rats, which may result in increased fat deposition in adipose tissues. A major strength of the present study is the use of the MS-resistant/prone rat model, which makes it possible to specifically link the observed metabolic modulations to the MS onset and to exclude an effect linked to dietary differences. However, because the metabolic explorations were performed after 4 months, it remains impossible to assert that the differences observed between MS-prone and -resistant rats are a consequence, or conversely a cause, of the MS onset.

## References

- Adams, S.H. (2011). Emerging Perspectives on Essential Amino Acid Metabolism in Obesity and the Insulin-Resistant State. *Adv Nutr* 2, 445-456.
- Adechian, S., Giardina, S., Remond, D., Papet, I., Buonocore, D., Gaudichon, C., Dardevet, D., Marzatico, F., and Mosoni, L. (2009). Excessive Energy Intake Does Not Modify Fed-state Tissue Protein Synthesis Rates in Adult Rats. *Obesity* 17, 1348-1355.
- Anderson, S.R., Gilge, D.A., Steiber, A.L., and Previs, S.F. (2008). Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. *Metabolism-Clinical and Experimental* 57, 347-354.
- Arneson, L.S., and MacAvoy, S.E. (2005). Carbon, nitrogen, and sulfur diet-tissue discrimination in mouse tissues. *Canadian Journal of Zoology* 83, 989-995.
- Azzout-Marniche, D., Chaumontet, C., Nadkarni, N.A., Piedcoq, J., Fromentin, G., Tome, D., and Even, P.C. (2014). Food intake and energy expenditure are increased in high-fat-sensitive but not in high-carbohydrate-sensitive obesity-prone rats. *Am J Physiol-Reg I* 307, R299-R309.
- Bak, A.M., Moller, A.B., Vendelbo, M.H., Nielsen, T.S., Viggers, R., Rungby, J., Pedersen, S.B., Jorgensen, J.O.L., Jessen, N., and Moller, N. (2016). Differential regulation of lipid and protein metabolism in obese vs. lean subjects before and after a 72-h fast. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 311, E224-E235.
- Balagopal, P., Sweeten, S., and Mauras, N. (2002). Increased synthesis rate of fibrinogen as a basis for its elevated plasma levels in obese female adolescents. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282, E899-E904.
- Barboza, P.S., and Parker, K.L. (2006). Body protein stores and isotopic indicators of N balance in female reindeer (*Rangifer tarandus*) during winter. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 628-644.
- Belloto, E., Diraison, F., Basset, A., Allain, G., Abdallah, P., and Beylot, M. (2007). Determination of protein replacement rates by deuterated water: validation of underlying assumptions. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 292, E1340-E1347.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Blundell, J.E., Stubbs, R.J., Golding, C., Croden, F., Alam, R., Whybrow, S., Le Noury, J., and Lawton, C.L. (2005). Resistance and susceptibility to weight gain: Individual variability in response to a high-fat diet. *Physiol Behav* 86, 614-622.
- Bray, G.A., and Popkin, B.M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity! *American Journal of Clinical Nutrition* 68, 1157-1173.
- Busch, R., Kim, Y.-K., Neese, R.A., Schade-Serin, V., Collins, M., Awada, M., Gardner, J.L., Beysen, C., Marino, M.E., and Misell, L.M. (2006). Measurement of protein turnover rates by heavy water labeling of nonessential amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1760, 730-744.
- Cacho, J., Sevillano, J., de Castro, J., Herrera, E., and Ramos, M.P. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E1269-1276.

- Caleyachetty, R., Thomas, G.N., Toulis, K.A., Mohammed, N., Gokhale, K.M., Balachandran, K., and Nirantharakumar, K. (2017). Metabolically Healthy Obese and Incident Cardiovascular Disease Events Among 3.5 Million Men and Women. *J Am Coll Cardiol* 70, 1429-1437.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Schiphorst, A.-M., Robins, R.J., Tea, I., and Prache, S. (2016). Natural (15)N Abundance in Key Amino Acids from Lamb Muscle: Exploring a New Horizon in Diet Authentication and Assessment of Feed Efficiency in Ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4058-4067.
- Cantalapiedra-Hijar, G., Ortigues-Marty, I., Sepchat, B., Agabriel, J., Huneau, J.-F., and Fouillet, H. (2015). Diet–animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition* 113, 1158-1169.
- Chang, S., Graham, B., Yakubu, F., Lin, D., Peters, J.C., and Hill, J.O. (1990). Metabolic Differences between Obesity-Prone and Obesity-Resistant Rats. *American Journal of Physiology* 259, R1103-R1110.
- Chanseume, E., Giraudet, C., Gryson, C., Walrand, S., Rousset, P., Boirie, Y., and Morio, B. (2007). Enhanced muscle mixed and mitochondrial protein synthesis rates after a high-fat or high-sucrose diet. *Obesity* 15, 853-859.
- Chevalier, S., Burgess, S.C., Malloy, C.R., Gougeon, R., Marliss, E.B., and Morais, J.A. (2006). The greater contribution of gluconeogenesis to glucose production in obesity is related to increased whole-body protein catabolism. *Diabetes* 55, 675-681.
- Chevalier, S., Burgos, S.A., Morais, J.A., Gougeon, R., Bassil, M., Lamarche, M., and Marliss, E.B. (2015). Protein and glucose metabolic responses to hyperinsulinemia, hyperglycemia, and hyperaminoacidemia in obese men. *Obesity (Silver Spring)* 23, 351-358.
- Chevalier, S., Marliss, E.B., Morais, J.A., Lamarche, M., and Gougeon, R. (2005). Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *The American journal of clinical nutrition* 82, 355-365.
- Commerford, S.R., Pagliassotti, M.J., Melby, C.L., Wei, Y.R., Gayles, E.C., and Hill, J.O. (2000). Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 279, E875-E885.
- Commerford, S.R., Pagliassotti, M.J., Melby, C.L., Wei, Y.R., and Hill, J.O. (2001). Inherent capacity for lipogenesis or dietary fat retention is not increased in obesity-prone rats. *Am J Physiol-Reg I* 280, R1680-R1687.
- Crescenzo, R., Bianco, F., Mazzoli, A., Giacco, A., Liverini, G., and Iossa, S. (2015). Mitochondrial efficiency and insulin resistance. *Front Physiol* 5.
- Danaei, G., Lu, Y., Singh, G.M., Carnahan, E., Stevens, G.A., Cowan, M.J., Farzadfar, F., Lin, J.K., Finucane, M.M., Rao, M., et al. (2014). Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment. *Lancet Diabetes Endo* 2, 634-647.
- Denne, S.C., Brechtel, G., Johnson, A., Liechty, E.A., and Baron, A.D. (1995). Skeletal muscle proteolysis is reduced in noninsulin-dependent diabetes mellitus and is unaltered by euglycemic hyperinsulinemia or intensive insulin therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2371-2377.
- Deschner, T., Fuller, B.T., Oelze, V.M., Boesch, C., Hublin, J.-J., Mundry, R., Richards, M.P., Ortman, S., and Hohmann, G. (2012). Identification of energy consumption and nutritional

- stress by isotopic and elemental analysis of urine in bonobos (*Pan paniscus*). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 69-77.
- Dourmashkin, J.T., Chang, G.Q., Hill, J.O., Gayles, E.C., Fried, S.K., and Leibowitz, S.F. (2006). Model for predicting and phenotyping at nonnal weight the long-term propensity for obesity in Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav* 87, 666-678.
- Estornell, E., Barber, T., and Cabo, J. (1994). Protein-Synthesis in-Vivo in Rats Fed on Lipid-Rich Liquid Diets. *British Journal of Nutrition* 72, 509-517.
- Estornell, E., Cabo, J., and Barber, T. (1995). Protein-Synthesis Is Stimulated in Nutritionally Obese Rats. *J Nutr* 125, 1309-1315.
- Even, P.C., Nadkarni, N.A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Fromentin, G., and Tome, D. (2011). Identification of behavioral and metabolic factors predicting adiposity sensitivity to both high fat and high carbohydrate diets in rats. *Front Physiol* 2.
- Fernandes, R., Nadeau, M.-J., and Grootes, P.M. (2012). Macronutrient-based model for dietary carbon routing in bone collagen and bioapatite. *Archaeological and Anthropological Sciences* 4, 291-301.
- Fouillet, H., Bos, C., Gaudichon, C., and Tome, D. (2002). Approaches to quantifying protein metabolism in response to nutrient ingestion. *J Nutr* 132, 3208s-3218s.
- Fuller, B.T., Fuller, J.L., Sage, N.E., Harris, D.A., O'Connell, T.C., and Hedges, R.E.M. (2005). Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 2497-2506.
- Galgani, J.E., Moro, C., and Ravussin, E. (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295, E1009-E1017.
- Gasier, H.G., Fluckey, J.D., and Previs, S.F. (2010). The application of  $2\text{H}_2\text{O}$  to measure skeletal muscle protein synthesis. *Nutrition & metabolism* 7, 31.
- Giesbertz, P., Padberg, I., Rein, D., Ecker, J., Höfle, A.S., Spanier, B., and Daniel, H. (2015). Metabolite profiling in plasma and tissues of ob/ob and db/db mice identifies novel markers of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 58, 2133-2143.
- Giles, E.D., Jackman, M.R., and MacLean, P.S. (2016). Modeling Diet-Induced Obesity with Obesity-Prone Rats: Implications for Studies in Females. *Front Nutr* 3.
- Giugliano, D., Ceriello, A., and Esposito, K. (2006). The effects of diet on inflammation - Emphasis on the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* 48, 677-685.
- Gougeon, R., Morais, J.A., Chevalier, S., Pereira, S., Lamarche, M., and Marliss, E.B. (2008). Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 31, 128-133.
- Guillet, C., Delcourt, I., Rance, M., Giraudet, C., Walrand, S., Bedu, M., Duche, P., and Boirie, Y. (2009). Changes in basal and insulin and amino acid response of whole body and skeletal muscle proteins in obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3044-3050.
- Guillet, C., Masgrau, A., and Boirie, Y. (2011). Is protein metabolism changed with obesity? *Curr Opin Clin Nutr* 14, 89-92.
- Halvatsiotis, P., Short, K.R., Bigelow, M., and Nair, K.S. (2002). Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2395-2404.
- Hardy, O.T., Czech, M.P., and Corvera, S. (2012). What causes the insulin resistance underlying obesity? *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 19, 81-87.

- Hatch, K.A., Crawford, M.A., Kunz, A.W., Thomsen, S.R., Eggett, D.L., Nelson, S.T., and Roeder, B.L. (2006). An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in hair. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 3367-3373.
- Hobbie, E.A. (2017). Dietary protein content and tissue type control C-13 discrimination in mammals: an analytical approach. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 31, 639-648.
- Huneau, J.F., Mantha, O.L., Hermier, D., Galmiche, G., Mathe, V., Mariotti, F., and Fouillet, H. (in press).  $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$  of proteins and amino acids are isotopic biomarkers of the metabolic orientations induced by energy restriction in obese rat. in press *In press*.
- Jackman, M.R., Kramer, R.E., MacLean, P.S., and Bessesen, D.H. (2006). Trafficking of dietary fat in obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 291, E1083-E1091.
- Jackman, M.R., MacLean, P.S., and Bessesen, D.H. (2010). Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. *Am J Physiol-Reg I* 299, R1097-R1105.
- Jang, C., Oh, S.F., Wada, S., Rowe, G.C., Liu, L., Chan, M.C., Rhee, J., Hoshino, A., Kim, B., Ibrahim, A., et al. (2016). A branched-chain amino acid metabolite drives vascular fatty acid transport and causes insulin resistance. *Nat. Med.* 22, 421-426.
- Jensen, M.D., and Haymond, M.W. (1991). Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *The American journal of clinical nutrition* 53, 172-176.
- Ji, H., and Friedman, M.I. (2008). Reduced hepatocyte fatty acid oxidation in outbred rats prescreened for susceptibility to diet-induced obesity. *Int J Obesity* 32, 1331-1334.
- Jung, C.H., Lee, M.J., Kang, Y.M., Jang, J.E., Leem, J., Hwang, J.Y., Kim, E.H., Park, J.Y., Kim, H.K., and Lee, W.J. (2015). The Risk of Incident Type 2 Diabetes in a Korean Metabolically Healthy Obese Population: The Role of Systemic Inflammation (vol 100, pg 934, 2015). *J Clin Endocr Metab* 100, 1709-1709.
- Jung, C.H., Lee, W.J., and Song, K.H. (2017). Metabolically healthy obesity: a friend or foe? *Korean J Intern Med* 32, 611-621.
- Katsanos, C.S., and Mandarino, L.J. (2011). Protein metabolism in human obesity: a shift in focus from whole-body to skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring)* 19, 469-475.
- Kelley, D.E., Goodpaster, B., Wing, R.R., and Simoneau, J.A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 277, E1130-E1141.
- Kraeer, K., Arneson, L.S., and MacAvoy, S.E. (2014). The intraspecies relationship between tissue turnover and metabolic rate in rats. *Ecol Res* 29, 937-947.
- Kurle, C.M. (2009). Interpreting temporal variation in omnivore foraging ecology via stable isotope modelling. *Functional Ecology* 23, 733-744.
- Kurle, C.M., Koch, P.L., Tershy, B.R., and Croll, D.A. (2014). The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ) in mammalian omnivores. *Isotopes in environmental and health studies* 50, 307-321.
- Lassale, C., Tzoulaki, I., Moons, K.G.M., Sweeting, M., Boer, J., Johnson, L., Huerta, J.M., Agnoli, C., Freisling, H., Weiderpass, E., et al. (2018). Separate and combined associations of

- obesity and metabolic health with coronary heart disease: a pan-European case-cohort analysis. *Eur Heart J* 39, 397-+.
- Lee, T.N., Buck, C.L., Barnes, B.M., and O'Brien, D.M. (2012). A test of alternative models for increased tissue nitrogen isotope ratios during fasting in hibernating arctic ground squirrels. *Journal of Experimental Biology* 215, 3354-3361.
- Lerin, C., Goldfine, A.B., Boes, T., Liu, M., Kasif, S., Dreyfuss, J.M., De Sousa-Coelho, A.L., Daher, G., Manoli, I., Sysol, J.R., et al. (2016). Defects in muscle branched-chain amino acid oxidation contribute to impaired lipid metabolism. *Mol Metab* 5, 926-936.
- Levin, B.E., DunnMeynell, A.A., Balkan, B., and Keeseey, R.E. (1997). Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol-Reg I* 273, R725-R730.
- Levin, E.B. (2007). Why some of us get fat and what we can do about it. *J Physiol-London* 583, 425-430.
- Liu, T.-W., Heden, T.D., Matthew Morris, E., Fritsche, K.L., Vieira-Potter, V.J., and Thyfault, J.P. (2015). High-Fat Diet Alters Serum Fatty Acid Profiles in Obesity Prone Rats: Implications for In Vitro Studies. *Lipids* 50, 997-1008.
- Lotta, L.A., Scott, R.A., Sharp, S.J., Burgess, S., Luan, J.A., Tillin, T., Schmidt, A.F., Imamura, F., Stewart, I.D., Perry, J.R.B., et al. (2016). Genetic Predisposition to an Impaired Metabolism of the Branched-Chain Amino Acids and Risk of Type 2 Diabetes: A Mendelian Randomisation Analysis. *Plos Med* 13, e1002179.
- Lynch, C.J., and Adams, S.H. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews. Endocrinology* 10, 723-736.
- MacAvoy, S.E., Arneson, L.S., and Bassett, E. (2006). Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* 150, 190-201.
- MacAvoy, S.E., Macko, S.A., and Arneson, L.S. (2005). Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology* 83, 631-641.
- Mantha, O.L., Polakof, S., Huneau, J.F., Mariotti, f., Poupin, N., Zalko, D., and Fouillet, H. (2018). Early changes in tissue amino acid metabolism and nutrient routing in rats fed a high-fat diet: evidence from natural isotope abundances of nitrogen and carbon in tissue proteins. *British Journal of Nutrition* *In press*.
- Martinez del Rio, C., and Anderson-Sprecher, R. (2008). Beyond the reaction progress variable: the meaning and significance of isotopic incorporation data. *Oecologia* 156, 765-772.
- Martinez del Rio, C., and Carleton, S.A. (2012). How fast and how faithful: the dynamics of isotopic incorporation into animal tissues. *J Mammal* 93, 353-359.
- Martinez del Rio, C., and Wolf, B.O. (2005). Mass-balance models for animal isotopic ecology. In *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates*. J.M. Starck, and T. Wang, eds. (Science Publishers, Inc.), pp. 141-174.
- Masgrau, A., Mishellany-Dutour, A., Murakami, H., Beaufrere, A.M., Walrand, S., Giraudet, C., Migne, C., Gerbaix, M., Metz, L., Courteix, D., et al. (2012). Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *The Journal of physiology* 590, 5199-5210.
- McCutchan, J.H., Lewis, W.M., Kendall, C., and McGrath, C.C. (2003). Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 102, 378-390.

- Mekota, A.-M., Grupe, G., Ufer, S., and Cuntz, U. (2006). Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 1604-1610.
- Michaliszyn, S.F., Sjaarda, L.A., Mihalik, S.J., Lee, S., Bacha, F., Chace, D.H., De Jesus, V.R., Vockley, J., and Arslanian, S.A. (2012). Metabolomic Profiling of Amino Acids and  $\beta$ -Cell Function Relative to Insulin Sensitivity in Youth. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, E2119-E2124.
- Morris, E.M., Jackman, M.R., Meers, G.M.E., Johnson, G.C., Lopez, J.L., MacLean, P.S., and Thyfault, J.P. (2013). Reduced hepatic mitochondrial respiration following acute high-fat diet is prevented by PGC-1 $\alpha$  overexpression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G868-880.
- Newgard, C.B. (2012). Interplay between Lipids and Branched-Chain Amino Acids in Development of Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 15, 606-614.
- Newgard, C.B., An, J., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Stevens, R.D., Lien, L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., et al. (2009). A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 9, 311-326.
- O'Brien, D.M. (2015). Stable isotope ratios as biomarkers of diet for health research. *Annual review of nutrition* 35, 565-594.
- Patterson, B.W., Horowitz, J.F., Wu, G.Y., Watford, M., Coppack, S.W., and Klein, S. (2002). Regional muscle and adipose tissue amino acid metabolism in lean and obese women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282, E931-E936.
- Patterson, B.W., Zhao, G., and Klein, S. (1998). Improved accuracy and precision of gas chromatography/mass spectrometry measurements for metabolic tracers. *Metabolism* 47, 706-712.
- Paulino, G., de la Serre, C.B., Knotts, T.A., Oort, P.J., Newman, J.W., Adams, S.H., and Raybould, H.E. (2009). Increased expression of receptors for orexigenic factors in nodose ganglion of diet-induced obese rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296, E898-E903.
- Poupin, N., Bos, C., Mariotti, F., Huneau, J.F., Tome, D., and Fouillet, H. (2011). The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet  $^{15}\text{N}$  discrimination factors in laboratory rats. *PLoS One* 6, e28046.
- Poupin, N., Mariotti, F., Huneau, J.F., Hermier, D., and Fouillet, H. (2014). Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLoS computational biology* 10, e1003865.
- Ratner, C., Madsen, A.N., Kristensen, L.V., Skov, L.J., Pedersen, K.S., Mortensen, O.H., Knudsen, G.M., Raun, K., and Holst, B. (2015). Impaired oxidative capacity due to decreased CPT1b levels as a contributing factor to fat accumulation in obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R973-982.
- Schutz, Y., Flatt, J.P., and Jequier, E. (1989). Failure of Dietary-Fat Intake to Promote Fat Oxidation - a Factor Favoring the Development of Obesity. *American Journal of Clinical Nutrition* 50, 307-314.
- She, P., Olson, K.C., Kadota, Y., Inukai, A., Shimomura, Y., Hoppel, C.L., Adams, S.H., Kawamata, Y., Matsumoto, H., Sakai, R., et al. (2013). Leucine and protein metabolism in obese Zucker rats. *PLoS One* 8, e59443.

- Stoger, R. (2008). The thrifty epigenotype: an acquired and heritable predisposition for obesity and diabetes? *Bioessays* 30, 156-166.
- Tchernof, A., and Despres, J.P. (2013). Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiological Reviews* 93, 359-404.
- Tessari, P., Cecchet, D., Cosma, A., Puricelli, L., Millionini, R., Vedovato, M., and Tiengo, A. (2011). Insulin resistance of amino acid and protein metabolism in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 30, 267-272.
- Tessari, P., Cosma, A., Vettore, M., Millionini, R., Puricelli, L., Cogo, P., Cecchet, D., Carnielli, V., and Kiwanuka, E. (2010). Fibrinogen kinetics and protein turnover in obese non-diabetic males: effects of insulin. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26, 50-58.
- Tulipano, G., Vergoni, A.V., Soldi, D., Muller, E.E., and Cocchi, D. (2004). Characterization of the resistance to the anorectic and endocrine effects of leptin in obesity-prone and obesity-resistant rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* 183, 289-298.
- Walsh, R.G., He, S., and Yarnes, C.T. (2014). Compound-specific  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis of amino acids: a rapid, chloroformate-based method for ecological studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 28, 96-108.
- Wang, T.J., Larson, M.G., Vasan, R.S., Cheng, S., Rhee, E.P., McCabe, E., Lewis, G.D., Fox, C.S., Jacques, P.F., Fernandez, C., et al. (2011a). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* 17, 448-U483.
- Wang, X., Choi, J.-W., Joo, J.I., Kim, D.H., Oh, T.S., Choi, D.K., and Yun, J.W. (2011b). Differential expression of liver proteins between obesity-prone and obesity-resistant rats in response to a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 106, 612-626.
- Wheadon, N.M., McGee, M., Edwards, G.R., and Dewhurst, R.J. (2014). Plasma nitrogen isotopic fractionation and feed efficiency in growing beef heifers. *Br. J. Nutr.* 111, 1705-1711.
- Wolf, N., Newsome, S.D., Peters, J., and Fogel, M.L. (2015). Variability in the routing of dietary proteins and lipids to consumer tissues influences tissue-specific isotopic discrimination. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 29, 1448-1456.
- Würtz, P., Mäkinen, V.-P., Soininen, P., Kangas, A.J., Tukiainen, T., Kettunen, J., Savolainen, M.J., Tammelin, T., Viikari, J.S., Rönnemaa, T., et al. (2012). Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults. *Diabetes* 61, 1372-1380.
- Yamakado, M., Nagao, K., Imaizumi, A., Tani, M., Toda, A., Tanaka, T., Jinzu, H., Miyano, H., Yamamoto, H., Daimon, T., et al. (2015). Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population. *Scientific reports* 5, 11918.
- Zhao, X., Han, Q., Liu, Y., Sun, C., Gang, X., and Wang, G. (2016). The Relationship between Branched-Chain Amino Acid Related Metabolomic Signature and Insulin Resistance: A Systematic Review. *J Diabetes Res* 2016, 2794591.
- Zhou, Q., Du, J., Hu, Z., Walsh, K., and Wang, X.H. (2007). Evidence for adipose-muscle cross talk: opposing regulation of muscle proteolysis by adiponectin and Fatty acids. *Endocrinology* 148, 5696-5705.

Table 1. Variability in the individual components of metabolic syndrome.

	Mean	CV	min - max
Body weight (g)	607.7	10.6%	489.0 - 743.0
Adiposity (%)	18.4	15.2%	14.2 - 24.7
Visceral adiposity (%)	7.9	11.8%	6.0 - 9.9
HOMA-IR	1.3	61.4%	0.2 - 3.6
Plasma triglycerides (mmol/L)	1.0	26.9%	0.5 - 1.9
Liver triglycerides ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )	73.9	33.5%	38.1 - 121.0

Table 2. Single associations between the metabolic syndrome score ( $Z_{MS}$ ) and different indicators of protein synthesis (FSR and ASR) and amino acid metabolism ( $\Delta^{15}N$ ) in tissues<sup>1</sup>.

	$\beta$	SE	<i>p</i>
Small intestine			
Protein FSR	0.051	0.026	0.06
Protein $\Delta^{15}N$	-0.050	0.028	0.08
Liver			
Protein FSR	-0.065	0.046	0.16
Protein ASR	13.80	1.83	<0.0001*
Protein $\Delta^{15}N$	-0.085	0.026	<0.01*
Plasma			
Protein 4-mo FSR <sup>2</sup>	0.006	0.002	<0.001*
Protein FSR	0.074	0.025	<0.01*
Protein ASR	17.12	6.26	<0.01*
Protein $\Delta^{15}N$	-0.089	0.021	<0.0001*
Kidneys			
Protein FSR	0.013	0.008	0.10
Protein ASR	3.68	0.82	<0.0001*
Protein $\Delta^{15}N$	-0.058	0.026	<0.05
Heart			
Protein FSR	0.001	0.004	0.85
Protein ASR	0.15	0.10	0.12
Protein $\Delta^{15}N$	-0.048	0.044	0.28
Skeletal muscles			
G muscle protein FSR	0.004	0.002	<0.01*
G muscle protein ASR	0.66	0.24	<0.05*
G muscle protein $\Delta^{15}N$	-0.004	0.065	0.95
TA muscle protein FSR	-0.002	0.003	0.42
TA muscle protein ASR	-0.04	0.12	0.75
TA muscle protein $\Delta^{15}N$	-0.034	0.037	0.36
AT			
Epididymal AT protein $\Delta^{15}N$	-0.070	0.023	<0.01*
Subcutaneous AT protein $\Delta^{15}N$	-0.052	0.032	0.11
Red blood cells			
Protein 4-mo FSR <sup>2</sup>	0.0006	0.0004	0.15
Protein $\Delta^{15}N$	-0.051	0.016	<0.01*
Hair			

Protein 4-mo FSR <sup>2</sup>	0.006	0.004	0.16
Protein $\Delta^{15}\text{N}$ <sup>3</sup>	-0.104	0.030	<0.01*

<sup>1</sup> Values are simple regression coefficients ( $\beta$ , and their standard error, SE) between  $Z_{MS}$  (the score of metabolic syndrome) and tissue protein  $\Delta^{15}\text{N}$  (natural  $^{15}\text{N}$  enrichment over the diet) or FSR or ASR (fractional and absolute synthesis rates, respectively). FSR and ASR values were measured by  $^2\text{H}_2\text{O}$  labeling over the last ~2 days of high fat feeding unless indicated otherwise. <sup>2</sup> 4 mo- FSR is the FSR over the whole 4-mo period of high-fat feeding, determined using  $\delta^{15}\text{N}$  kinetics in pools regularly sampled after the diet shift (plasma, red blood cells and hair, see methods and supplemental text 1). In plasma where two protein pools with distinct (fast and slow) FSR values were identified, presented FSR values are those for the slowly turning over protein pool which is of hepatic origin. <sup>3</sup> Measured in hair grown during the last 2 weeks of high-fat feeding. \*Significant controlling the FDR at 5%. G, *gastrocnemius*; TA, *tibialis anterior*; AT, adipose tissue.

Table 2

Table 3. Nutrient routing to amino acids in tissue proteins.

		Small Intestine	Liver	TA muscle	G muscle	Heart	Kidney	RBC
To all amino acids (%):								
Protein	R	70.5	68.4	74.6	75.0	75.2	72.3	71.4
	MSP	69.0						
CHO	R	11.2	12.0	9.7	9.5	9.4	10.5	10.9
	MSP	11.8						
Lipid	R	18.3	19.6	15.7	15.5	15.3	17.1	17.7
	MSP	19.2						
To Glx (%):								
Protein	R	52.8	55.4	26.2				
	MSP		59.6	42.2				
CHO	R	17.9	17.0	28.1				
	MSP		15.4	22.0				
Lipid	R	29.3	27.6	45.7				
	MSP		25.0	35.8				

Nutrient routing values are the respective contributions (%) of dietary macronutrients to C in tissue proteins, by direct AA deposition for dietary protein or AA synthesis for dietary CHO and lipid (i.e., the routing coefficients,  $p$ ,  $c$ ,  $1-p-c$  of equation [7], see Materials and Methods). G, *gastrocnemius*; TA, *tibialis anterior*; RBC, red blood cells. Nutrient routing values were calculated for all amino acids in all tissue proteins, and for glutamine and glutamate (Glx) in some tissue proteins. Values for extreme phenotypes (R, resistant; MSP, metabolic syndrome prone) are reported when a significant phenotype effect was detected, i.e., for all amino acids in small intestine and for Glx in TA muscle (FDR-adjusted  $p$  values < 5%) and liver (FDR-adjusted  $p$  value < 10%). Otherwise, values for the whole population are reported.

## Figure legends

### Figure 1

Phenotypic groups identified by hierarchical classification based on the individual components of metabolic syndrome (A): R, resistant ( $n = 15$ ); OP, healthy obese being obese-prone only ( $n = 13$ ); MSP, metabolic syndrome prone ( $n = 14$ ). Boxplot of the score of metabolic syndrome ( $Z_{MS}$ ) by phenotypic groups (B): boxes represent the interquartile range (the difference between the 75th and the 25th percentiles), center lines correspond to the medians (50th percentile), and whiskers extend to 1.5 times the interquartile range.

### Figure 2

Evolution by phenotypic groups of body weight (A), food intake relative to body weight (B), and weight gain efficiency (C) during 4 months of high-fat feeding. R, resistant ( $n = 15$ ); OP, healthy obese being obese-prone only ( $n = 13$ ); MSP, metabolic syndrome prone ( $n = 14$ ). \* $P < 0.05$  R vs MSP. \*\*  $P < 0.05$  R vs OP. #  $P < 0.05$  OP vs MSP. Overall values for the whole 4-mo period of high-fat feeding were calculated as the area under the curve for food intake and as the ratio of total weight gain to total food intake for weight gain efficiency. Different letters indicate significant differences in overall values between groups ( $P < 0.05$ ).

### Figure 3

Tissue protein masses (A) and absolute synthesis rates (ASR, B). R, resistant ( $n = 15$ ); OP, healthy obese being obese-prone only ( $n = 13$ ); MSP, metabolic syndrome prone ( $n = 14$ ); G, *gastrocnemius*; TA, *tibialis anterior*. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

### Figure 4

Correlations between fractional synthesis rates (FSR) and natural abundances of nitrogen stable isotopes ( $\Delta^{15}N$ ) in plasma (A), heart (B), red blood cell (RBC, C) and hair (D) proteins. Closed circles represent the FSR measured by  $^2H_2O$  labeling over the last ~2 days of high-fat feeding. Open circles represent the FSR for the whole 4-mo of high-fat feeding determined using  $\delta^{15}N$  kinetics in pools regularly sampled after the diet shift (see methods and supplemental text 1).  $^1\Delta^{15}N$  measured in hair grown during the last 2 weeks of high-fat feeding.

### Figure S1

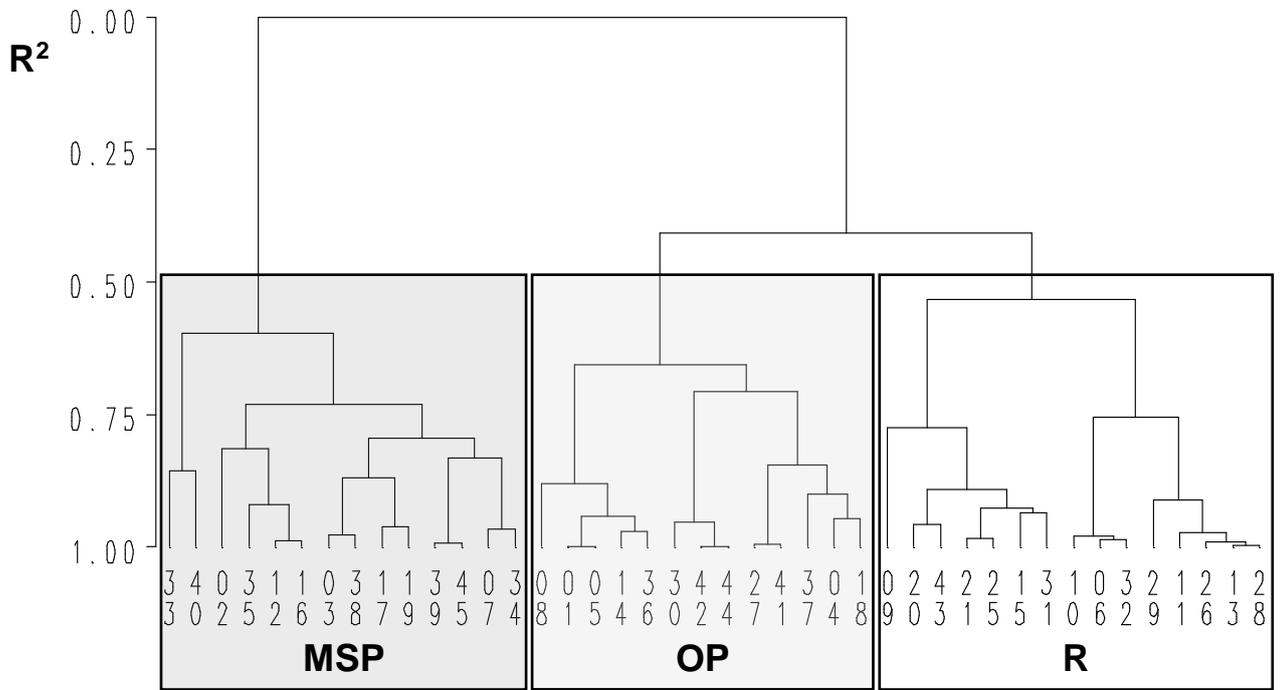
Differences across phenotypes in body composition (A, B, C) and metabolic (D, E, F) variables used for computing the score of metabolic syndrome and for determining phenotypes. R, resistant (open bars,  $n = 15$ ); OP, healthy obese being obese-prone only (grey bars,  $n = 13$ ); MSP, metabolic syndrome prone (black bars,  $n = 14$ ). TG, triglycerides. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

### Figure S2

Natural abundances of nitrogen stable isotopes ( $\delta^{15}\text{N}$ ) kinetics in plasma, red blood cell (RBC), and hair proteins during the 4-mo after the shift to the high-fat diet. Experimental data (circles) are means  $\pm$  SD of  $\delta^{15}\text{N}$  measurements ( $n = 6$  for time 0 and  $n = 42$  for other sampling times), with hair  $\delta^{15}\text{N}$  measured in hair grown during the last 2 weeks. Experimental data were fitted (lines) using mono-exponential (RBC and hair) or bi-exponential (plasma) models (see material and methods and supplemental text 1).

**Figure 1**

**A**



**B**

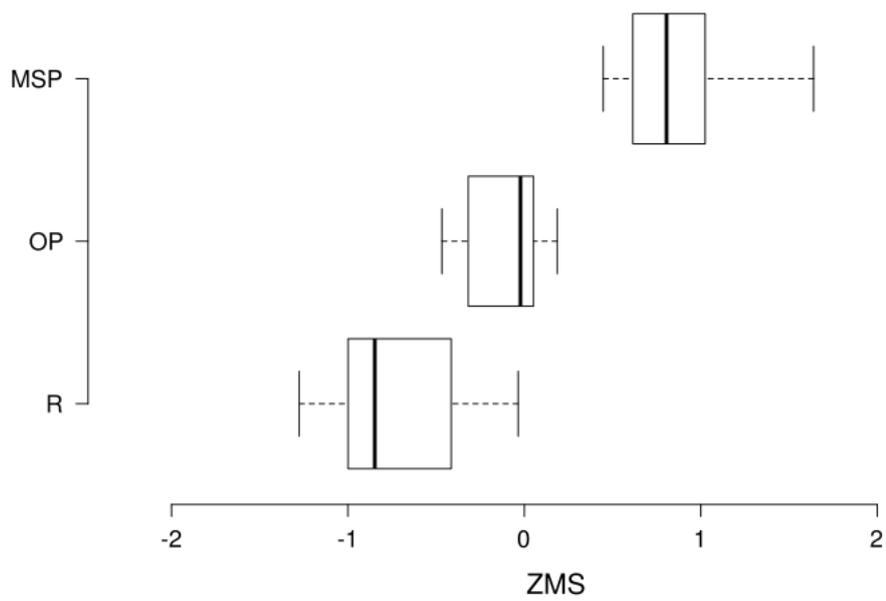


Figure 2

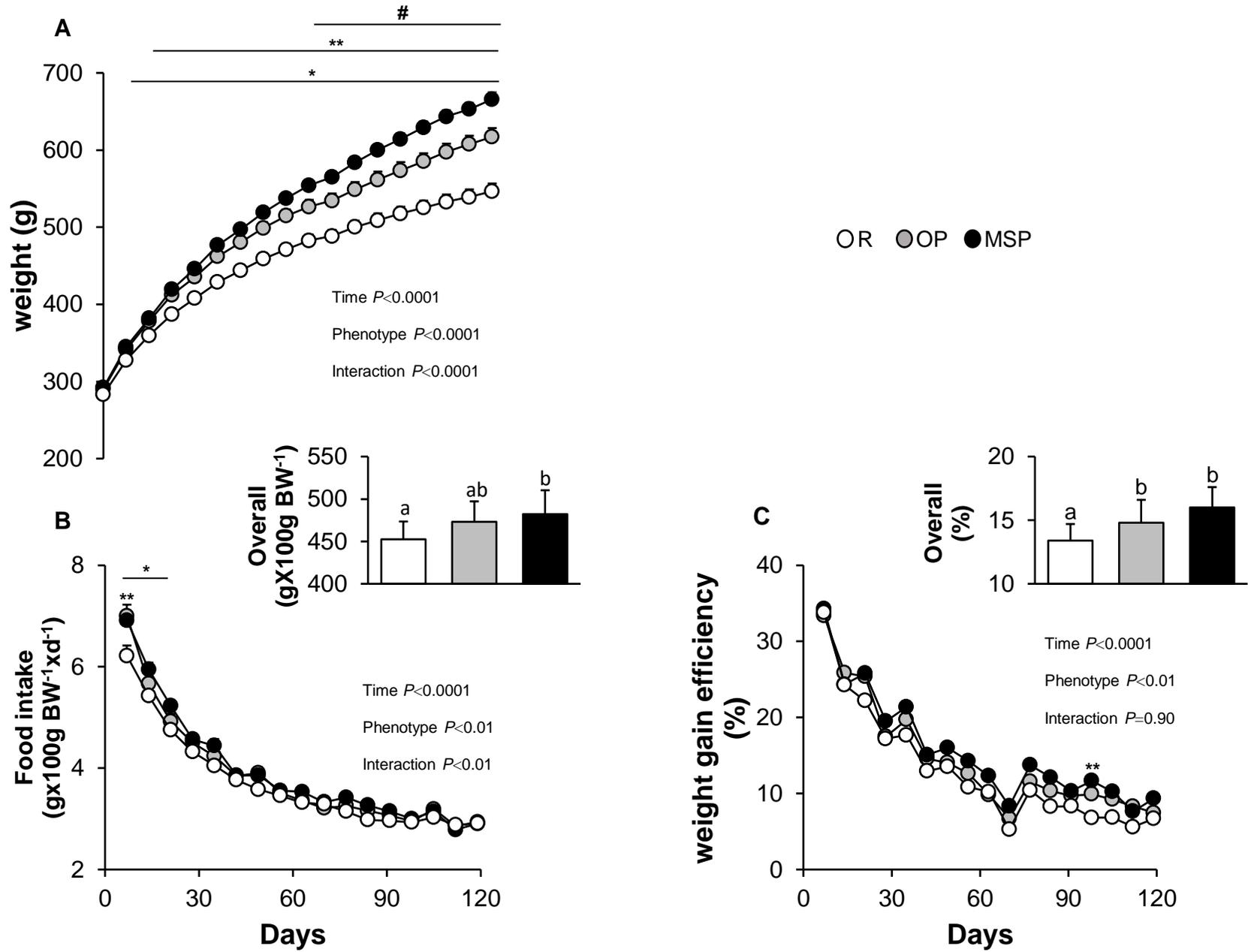


Figure 3

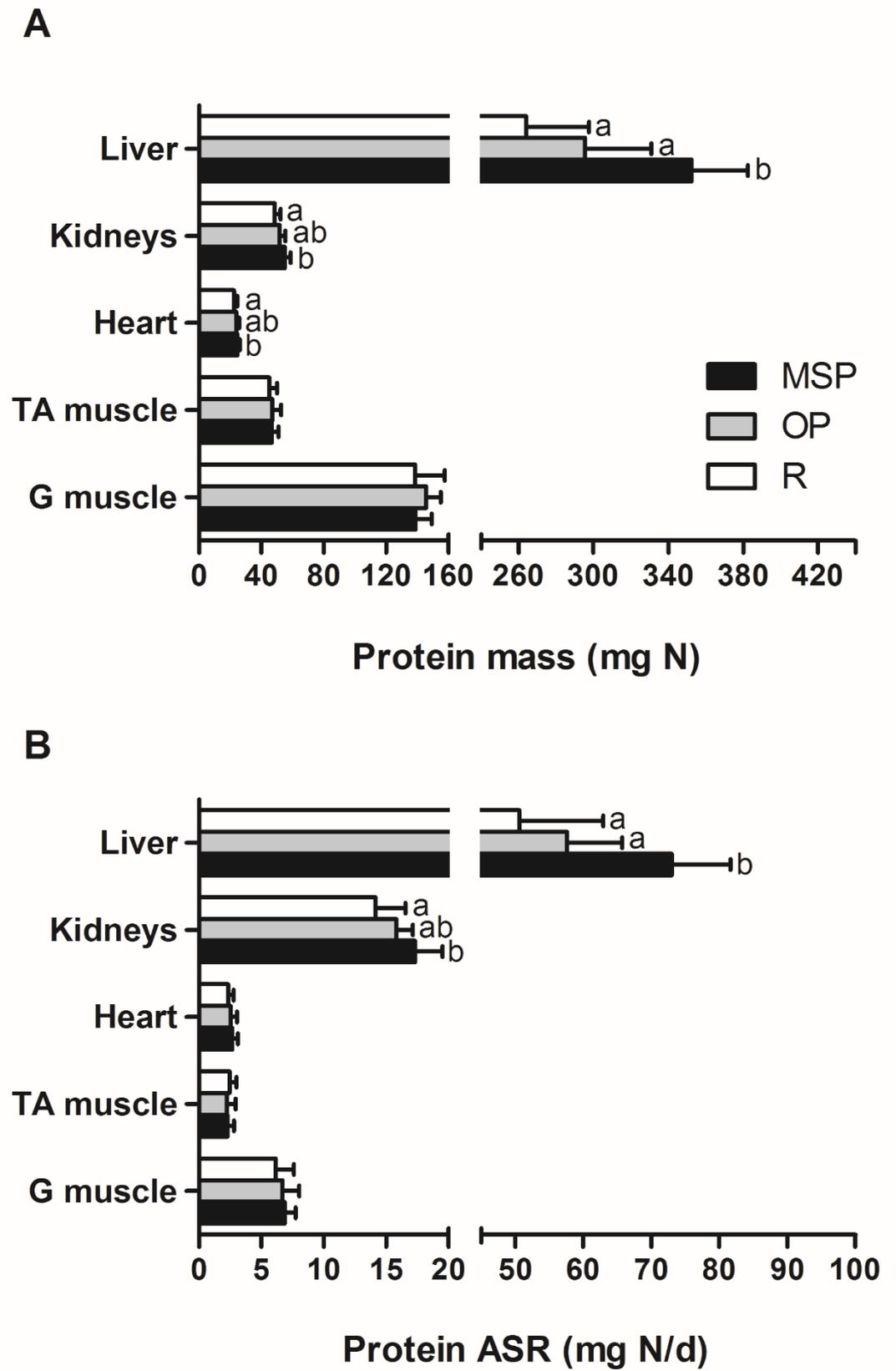
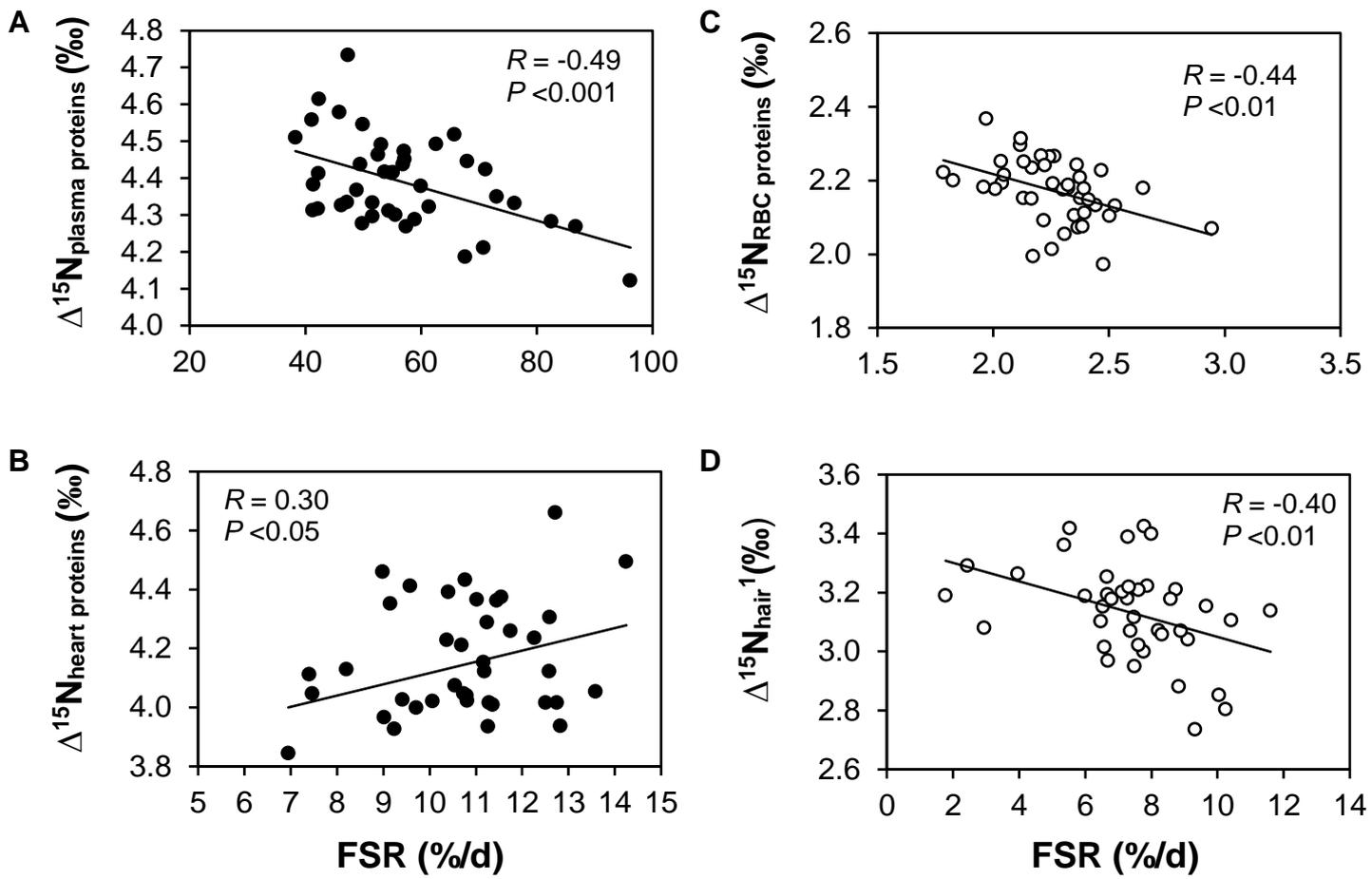


Figure 4



- FSR measured over the final 2 days using  $^2\text{H}_2\text{O}$  labelling
- FSR measured over 4 months using natural  $\delta^{15}\text{N}$  variations after the shift to the high-fat diet

## Supplemental data

Table S1. Nutrient and isotopic compositions of the diet.

---

Nutrients (wt%)	
Casein-HCL	26.3
L-Cystein	0.4
Corn starch	17.5
Sucrose	14.3
Lard	28.0
Soy oil	2.0
AIN-93G mineral mix	4.0
AIN-93VX vitamin mix	1.3
Choline chloride	0.3
$\alpha$ -Cellulose	6.0
Isotopes (‰)	
$\delta^{15}\text{N}$	
Proteins	6.23
$\delta^{13}\text{C}$	
Proteins	-22.35
Lipids	-24.44
Carbohydrates	
Sugar cane diet	-11.59
Sugar beet diet	-18.29
50/50 mix diet	-14.94

---

Table S2. Natural abundances of nitrogen stable isotopes ( $n = 42$ ).

	Protein $\Delta^{15}\text{N}$ (‰)	
Liver	3.93	$\pm 0.14$
Plasma	4.39	$\pm 0.12$
Small intestine	1.86	$\pm 0.14$
Kidneys	2.46	$\pm 0.13$
Heart	4.14	$\pm 0.21$
TA muscle	2.67	$\pm 0.18$
G muscle	2.53	$\pm 0.31$
Epididymal AT	2.73	$\pm 0.12$
Subcutaneous AT	2.92	$\pm 0.16$
Red blood cells	2.17	$\pm 0.09$
Hair <sup>1</sup>	3.13	$\pm 0.16$

G, *gastrocnemius*; TA, *tibialis anterior*; AT, adipose tissue.

<sup>1</sup> Measured in hair grown during the last 2 wks of high-fat feeding.

Table S3. Natural abundances of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) stable isotopes in the tissues analyzed presented as a function of dietary sucrose isotopic composition.

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
	Dietary sucrose					
	Sugar cane		50/50 mix		Sugar beet	
<b>Proteins</b>						
Liver	-19.46	$\pm 0.08$	-19.91	$\pm 0.10$	-20.26	$\pm 0.08$
Small intestine	-19.82	$\pm 0.12$	-20.27	$\pm 0.11$	-20.60	$\pm 0.11$
Plasma	-19.40	$\pm 0.11$	-19.73	$\pm 0.10$	-20.15	$\pm 0.10$
Kidneys	-19.76	$\pm 0.08$	-20.09	$\pm 0.07$	-20.47	$\pm 0.08$
Heart	-20.07	$\pm 0.08$	-20.39	$\pm 0.08$	-20.71	$\pm 0.09$
TA muscle	-19.97	$\pm 0.14$	-20.31	$\pm 0.23$	-20.61	$\pm 0.13$
G muscle	-19.88	$\pm 0.23$	-20.19	$\pm 0.20$	-20.54	$\pm 0.18$
S Muscle	-19.95	$\pm 0.24$	-20.28	$\pm 0.19$	-20.56	$\pm 0.18$
Red blood cell	-20.41	$\pm 0.08$	-20.75	$\pm 0.05$	-21.14	$\pm 0.06$
Hair	-18.53	$\pm 0.13$	-19.00	$\pm 0.15$	-19.51	$\pm 0.11$
Epididymal AT	-19.86	$\pm 0.08$	-20.22	$\pm 0.10$	-20.65	$\pm 0.06$
Subcutaneous AT	-19.57	$\pm 0.22$	-19.96	$\pm 0.10$	-20.33	$\pm 0.10$
<b>Protein-bound amino acids</b>						
<b>Liver</b>						
Ala	-16.01	$\pm 0.52$	-17.50	$\pm 0.39$	-19.9	$\pm 0.74$
Asx	-13.34	$\pm 1.76$	13.23	$\pm 1.06$	-14.00	$\pm 1.59$
Glx	-14.36	$\pm 0.67$	-15.24	$\pm 0.43$	-15.36	$\pm 0.35$
Gly	-9.07	$\pm 01.14$	-8.72	$\pm 1.51$	-10.46	$\pm 1.86$
Ile	-25.55	$\pm 0.47$	-25.64	$\pm 0.81$	-25.73	$\pm 1.18$
Leu	-29.81	$\pm 0.61$	-31.23	$\pm 1.49$	-30.87	$\pm 1.07$
Lys	-18.76	$\pm 1.45$	-19.66	$\pm 0.33$	-18.00	$\pm 2.04$
Met	-27.25	$\pm 0.41$	-27.01	$\pm 0.57$	-27.20	$\pm 0.32$
Phe	-27.69	$\pm 0.37$	-27.59	$\pm 0.12$	-27.45	$\pm 0.46$
Pro	-15.17	$\pm 0.93$	-14.89	$\pm 0.57$	-14.81	$\pm 0.49$
Val	-26.81	$\pm 0.33$	-26.69	$\pm 0.46$	-26.62	$\pm 0.15$
Thr	-7.22	$\pm 1.72$	-8.02	$\pm 0.72$	-8.23	$\pm 1.13$
<b>Small intestine</b>						
Ala	-16.82	$\pm 0.65$	-18.37	$\pm 0.40$	-20.53	$\pm 0.35$
Asx	-15.81	$\pm 0.79$	-16.35	$\pm 0.74$	-16.99	$\pm 0.72$
Glx	-14.05	$\pm 0.51$	-15.03	$\pm 0.74$	-15.29	$\pm 0.83$
Gly	-13.42	$\pm 1.20$	-12.77	$\pm 0.78$	-14.47	$\pm 1.33$
Ile	-25.15	$\pm 0.97$	-24.42	$\pm 0.91$	-24.80	$\pm 0.64$
Leu	-30.51	$\pm 0.61$	-30.47	$\pm 0.91$	-30.38	$\pm 0.40$
Lys	-19.03	$\pm 0.46$	-18.87	$\pm 0.47$	-19.19	$\pm 0.57$
Met	-24.62	$\pm 0.77$	-24.57	$\pm 0.61$	-25.08	$\pm 0.47$
Phe	-27.33	$\pm 0.39$	-27.29	$\pm 0.37$	-27.37	$\pm 0.29$
Pro	-15.39	$\pm 0.65$	-15.82	$\pm 0.96$	-15.44	$\pm 0.49$
Val	-27.01	$\pm 0.56$	-26.69	$\pm 0.40$	-27.07	$\pm 0.51$
Thr	-12.78	$\pm 2.59$	-12.03	$\pm 2.67$	-13.14	$\pm 2.72$

TA muscle

Ala	-13.53	±1.13	-15.89	±1.05	-17.37	±0.52
Asx	-16.16	±1.28	-17.07	±0.82	-18.25	±0.66
Glx	-15.66	±0.91	-16.72	±0.80	-17.11	±0.60
Gly	-14.91	±5.17	-17.40	±4.13	-16.03	±4.59
Ile	-24.18	±0.51	-24.94	±0.94	-24.57	±0.96
Leu	-30.06	±0.77	-29.96	±0.38	-30.21	±0.48
Lys	-19.37	±1.16	-19.45	±0.97	-19.54	±0.46
Met	-25.23	±0.71	-25.58	±0.85	-25.67	±0.83
Phe	-27.44	±0.12	-27.37	±0.22	-27.43	±0.24
Pro	-17.53	±1.24	-17.82	±1.58	-17.73	±1.56
Val	-26.89	±0.59	-27.61	±1.38	-26.99	±0.47
Thr	-10.81	±2.61	-10.37	±1.43	-10.08	±0.31

---

Table S3

Table S4. Single associations between the metabolic syndrome score ( $Z_{MS}$ ) and natural abundances of nitrogen stable isotopes ( $\delta^{15}N$ ) in tissue protein-bound amino acids.

	<i>B</i>	SE	<i>p</i>
Liver proteins			
Ala	-0.502	0.233	<0.05
Asx	-0.767	0.212	<0.01*
Glx	-0.897	0.184	<0.0001
Gly	-0.548	0.233	<0.05
Ile	-0.327	0.128	<0.05
Leu	-0.264	0.137	0.07
Lys	-0.855	0.222	<0.01*
Met	-1.048	0.203	<0.0001*
Phe	-0.672	0.122	<0.0001*
Pro	-0.376	0.122	<0.01*
Val	-0.228	0.126	0.08
Small intestine proteins			
Ala	-0.424	0.231	0.08
Asx	0.175	0.207	0.41
Glx	-0.841	0.170	<0.0001*
Gly	0.311	0.153	0.06
Ile	-0.170	0.128	0.20
Leu	-0.360	0.090	<0.001*
Lys	0.128	0.170	0.46
Met	-0.191	0.200	0.35
Phe	-0.212	0.120	0.09
Pro	-0.122	0.124	0.33
Val	-0.139	0.057	<0.05
TA muscle proteins			
Ala	0.102	0.121	0.41
Asx	0.065	0.135	0.63
Glx	0.390	0.170	<0.05
Gly	0.776	0.331	<0.05
Ile	0.145	0.112	0.21
Leu	0.089	0.115	0.45
Lys	0.140	0.166	0.41
Met	-0.166	0.104	0.13
Phe	0.296	0.191	0.14
Pro	0.215	0.103	0.05
Val	-0.022	0.098	0.83

TA, tibialis anterior.\* Significant controlling the FDR at 5%.

Figure S1

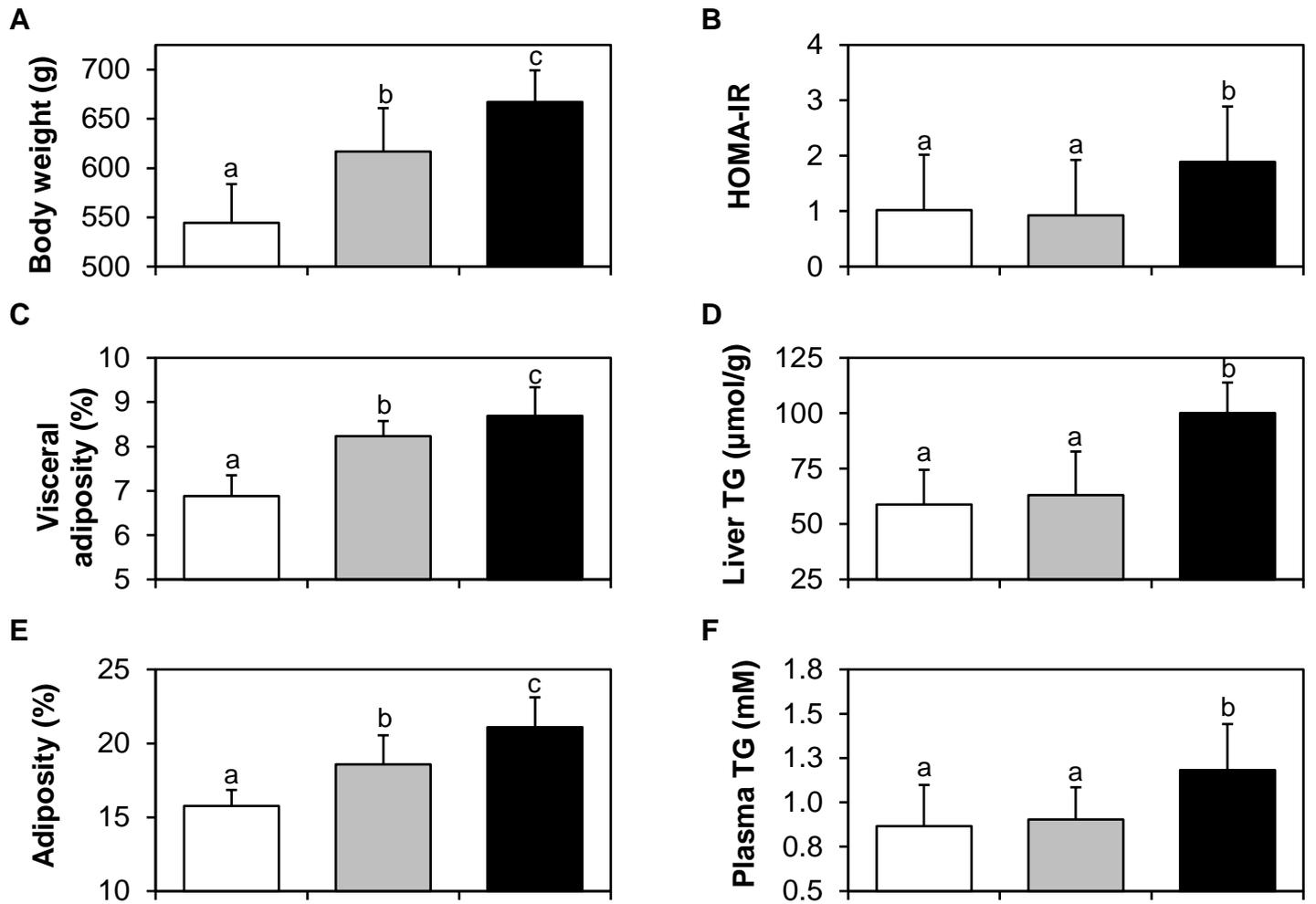
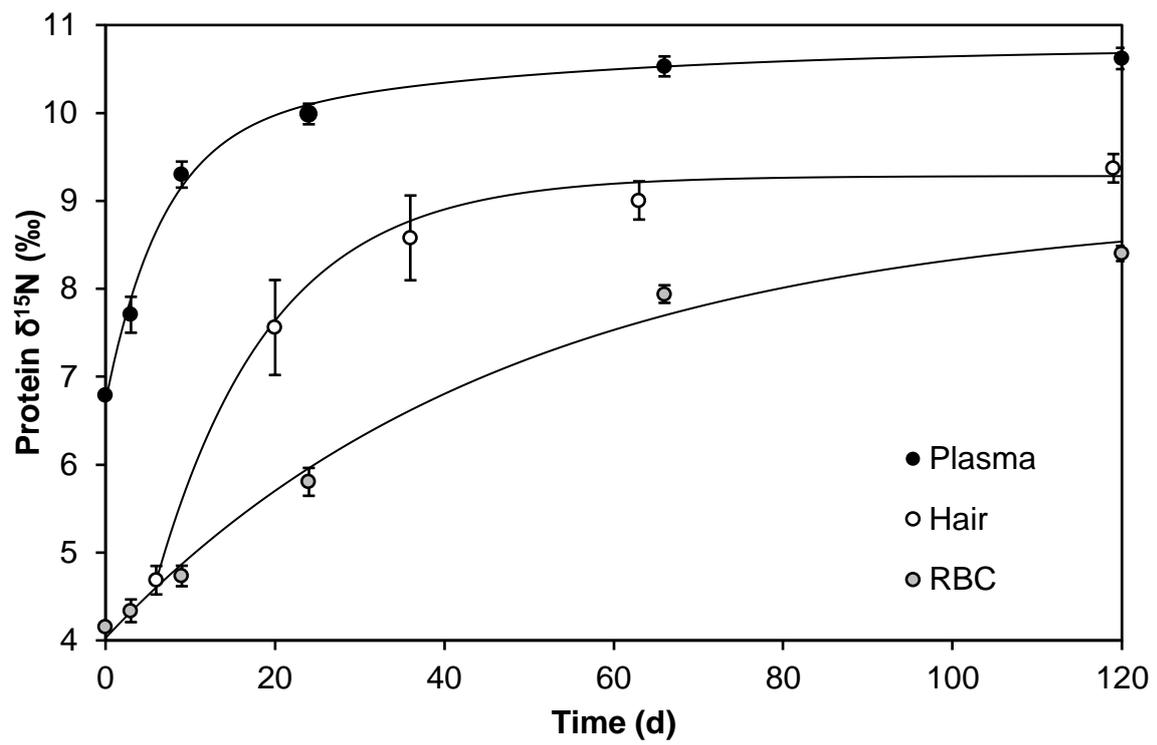


Figure S2



## **Text S1. Calculations of tissue protein synthesis rates**

### **General equation of isotopic incorporation in tissue proteins**

With the two tracer techniques we used for measuring tissue protein synthesis rates, i.e.,  $^2\text{H}_2\text{O}$  labeling at enriched abundance levels <sup>(1; 2; 3)</sup> and  $\delta^{15}\text{N}$  diet-shift at natural abundance levels <sup>(4; 5)</sup>, under the hypothesis that the tissue protein pool is kinetically homogeneous (i.e., not made from different proteins having markedly different turnover rates), enrichment in the tissue protein pool follows a mono-exponential rise-to-plateau kinetics according to the following general equation <sup>(5)</sup>:

$$E_P(t) = E_{P\infty} + (E_{P0} - E_{P\infty}) \times \exp^{-(FSR/100) \times t} \quad [1]$$

where  $E_P(t)$ ,  $E_{P0}$  and  $E_{P\infty}$  are the protein  $^2\text{H}$  (at%) or  $^{15}\text{N}$  (‰) enrichment at time  $t$ , zero (basal value before enrichment) and infinite (final equilibrium value),  $FSR$  ( $\%/d^{-1}$ ) is the protein fractional synthesis rate (which is also equal to the sum of the protein rates of breakdown and net accretion), and  $t$  (d) the time.

### **$^2\text{H}_2\text{O}$ precursor-product labeling method**

For minimizing precursor-labeling gradients,  $^2\text{H}$  enrichments ( $E$ , at%) were measured in tissue free ( $E_{AA}$ ) and protein-bound ( $E_P$ ) alanine, a rapidly turning-over amino acid that is rapidly labeled by transaminations. Indeed, it has been previously shown that  $^2\text{H}$  enrichments in free alanine of plasma and tissues are all rapidly stable over the  $^2\text{H}_2\text{O}$  exposure period, and that the final enrichment in a given product ( $E_{P\infty}$  in the considered tissue) equals the stable enrichment of its precursor ( $E_{AA}$  in the considered tissue) <sup>(1)</sup>. In our study, for each tissue sampled at euthanasia, basal  $E_{P0}$  was measured in the rats ( $n=6$ ) euthanized at time zero without  $^2\text{H}_2\text{O}$  exposure, and  $E_{AA}$  and  $E_P$  were measured in the rats ( $n=42$ ) euthanized after the  $\sim 2d$   $^2\text{H}_2\text{O}$  exposure (from  $^2\text{H}_2\text{O}$  injection to tissue sampling) at the end of the 4-mo high-fat (HF) feeding period. Using these measured enrichments, we calculated the tissue protein FSR by solving eq. [1] at a single time point, the time  $t$  of the end of  $^2\text{H}_2\text{O}$  exposure, as:

$$FSR [\%/d] = 100 \times \ln ( (E_{AA} - E_{P0} [\text{at}\%]) / (E_{AA} - E_P [\text{at}\%]) ) / t [\text{d}] \quad [2]$$

and the tissue protein absolute synthesis rate (ASR) was then calculated as the product of its FSR and pool size:

$$ASR [\text{mg}/d] = (FSR [\%/d] / 100) \times \text{tissue protein} [\text{mg}] \quad [3]$$

These FSR and ASR values represented the mean postprandial and postabsorptive values, over ~2d of  $^2\text{H}_2\text{O}$  exposure, in the tissues of rats at the end of the HF diet exposure.

### $\delta^{15}\text{N}$ diet-shift method

The shift to the HF diet resulted in a slight increase in the  $^{15}\text{N}$  natural enrichment ( $\delta^{15}\text{N}$ , ‰) of dietary protein, because the HF diet contained casein whereas the breeding diet was mostly based on vegetable protein of lower  $\delta^{15}\text{N}$  value. We analyzed the repeated  $\delta^{15}\text{N}$  measurements made in the proteins of the tissues regularly sampled during 4 mo after the HF diet shift (namely, plasma, red blood cells and hair), for estimating the mean FSR values of these tissue proteins over a more integrated time frame than in the  $^2\text{H}_2\text{O}$  labeling method (i.e., mean values over the whole 4-mo period of HF diet exposure with the  $\delta^{15}\text{N}$  diet-shift method, vs mean values at the end – on the last ~2d – of the 4-mo exposure with the  $^2\text{H}_2\text{O}$  method). The post-diet shift  $\delta^{15}\text{N}$  kinetics in tissue proteins were carefully analyzed as described elsewhere for such incorporation data <sup>(4; 5)</sup>, by testing the hypothesis of kinetic homogeneity of eq. [1]: for each tissue protein, we compared the ability of exponential models of increasing order to fit the data and selected the best model on the basis of objective statistical criteria. In particular, we compared the fits obtained from mono- and bi-exponential models having the following equations:

$$\text{Mono-exponential model: } \delta(t) = \delta_{\infty} + (\delta_0 - \delta_{\infty}) \times \exp^{-(\text{FSR}/100) \times t} \quad [4]$$

$$\text{Bi-exponential model: } \delta(t) = \delta_{\infty} + (\delta_0 - \delta_{\infty}) \times [p \times \exp^{-(\text{FSR}_1/100) \times t} + (1-p) \times \exp^{-(\text{FSR}_2/100) \times t}] \quad [5]$$

where  $t$  (d) is the time since the HF diet-shift,  $\delta(t)$  (‰) is the  $\delta^{15}\text{N}$  value of the tissue protein at time  $t$ ,  $\delta_0$  and  $\delta_{\infty}$  (‰) are the  $\delta^{15}\text{N}$  initial and final equilibrium values, respectively. In the mono-exponential model, the protein pool is supposed to be kinetically homogenous with FSR (%/d) its fractional synthesis rate, while in the bi-exponential model, the protein pool is supposed to consist of two distinct protein pools having different turnover rates, with  $\text{FSR}_1$  and  $\text{FSR}_2$  (%/d) their respective fractional synthesis rates and  $p$  and  $(1-p)$  their respective proportions in the whole protein pool.

For each studied tissue protein, parameters of each model (i.e.,  $\delta_{\infty}$ ,  $\delta_0$  and FSR for the mono-exponential model, and  $\delta_{\infty}$ ,  $\delta_0$ ,  $\text{FSR}_1$ ,  $\text{FSR}_2$  and  $p$  for the bi-exponential model) were estimated using a non-linear fitting procedure (fit function, Matlab 7.5, The Mathworks,

Natick, USA). Then, the best model was selected using the small-sample Akaike Information criterion (AICc) value <sup>(4)</sup>:

$$AICc = n \times [ \ln (2\pi) + 1 + \ln (SSE / n) ] + 2 \times k + [ 2 \times k \times (k+1) / (n-k-1) ] \quad [6]$$

where SSE is the error sum of squares, n the number of data points and k the number of parameters in the model.

The bi-exponential model was selected if its AICc value was sufficiently lower (i.e., 2 point lower <sup>(4)</sup>) than that of the mono-exponential model. Once the model selected, the corresponding FSR value(s), which represented mean values from the start to the end to the HF diet exposure, were not used to calculate ASR over such a large time frame but the time required for tissue proteins to reach 95% of their new isotopic equilibrium after the HF diet shift (T<sub>95%</sub>). T<sub>95%</sub> was differently estimated according to the model selected. For mono-exponential models, T<sub>95%</sub> was directly calculated as:

$$T_{95\%} (d) = \ln (1/0.05) / (FSR [\%/d] / 100) \quad [7]$$

For bi-exponential models, T<sub>95%</sub> estimation required the numerical resolution under Matlab of the following equation <sup>(5)</sup>:

$$0.05 = p \times \exp^{- (FSR_1/100) \times t} + (1-p) \times \exp^{- (FSR_2/100) \times t} \quad [8]$$

## References:

1. Belloto E, Diraison F, Basset A *et al.* (2007) Determination of protein replacement rates by deuterated water: validation of underlying assumptions. *Am J Physiol-Endoc M* **292**, E1340-E1347.
2. Busch R, Kim YK, Neese RA *et al.* (2006) Measurement of protein turnover rates by heavy water labeling of nonessential amino acids. *Bba-Gen Subjects* **1760**, 730-744.
3. Gasier HG, Fluckey JD, Previs SF (2010) The application of 2H<sub>2</sub>O to measure skeletal muscle protein synthesis. *Nutr Metab (Lond)* **7**, 31.
4. Martinez del Rio C, Anderson-Sprecher R (2008) Beyond the reaction progress variable: the meaning and significance of isotopic incorporation data. *Oecologia* **156**, 765-772.
5. Martinez del Rio C, Carleton SA (2012) How fast and how faithful: the dynamics of isotopic incorporation into animal tissues. *J Mammal* **93**, 353-359.





# 3 DISCUSSION GENERALE



### 3.1 Approches et articulation des travaux

Cette thèse avait pour objectif général d'identifier quelles altérations tissulaires du métabolisme des protéines et des AA accompagnent l'induction nutritionnelle du syndrome métabolique, grâce à des interprétations mécanistiques des variations naturelles de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires que nous pensions capables de constituer de nouveaux biomarqueurs isotopiques du métabolisme des AA tissulaires.

Au niveau méthodologique, les résultats de cette thèse (i) valident notre hypothèse de départ, issue des travaux préalables de l'équipe, sur les variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires, en montrant qu'elles peuvent effectivement s'interpréter en termes de modulations de la répartition des AA tissulaires entre leurs voies d'utilisation anaboliques (vers la synthèse protéique) et cataboliques (vers la désamination oxydative), et (ii) permettent une avancée méthodologique pour l'analyse des  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires, en montrant qu'elle permet d'estimer l'adressage métabolique des macronutriments alimentaires, et notamment l'utilisation des nutriments non protéiques (glucides et lipides) pour la synthèse d'AA non indispensables.

Au niveau thématique, nous avons utilisé ces nouveaux biomarqueurs isotopiques de l'adressage métabolique (i) des AA tissulaires entre leurs voies anaboliques et cataboliques d'utilisation ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et (ii) des nutriments non protéiques vers la synthèse d'AA non indispensables ( $\delta^{13}\text{C}$ ) dans trois études menées chez le rat dans le contexte : (i) d'une fonte protéique induite par une restriction énergétique (1<sup>ère</sup> étude), et (ii) du développement nutritionnel du syndrome métabolique (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> études). L'objectif était de répondre à deux questions complémentaires, mais distinctes : quelles réorientations du métabolisme des protéines et des AA sont spécifiquement induites dans les différents tissus entre rats consommant un régime gras et sucré *vs* témoin (2<sup>ème</sup> étude), et qu'est-ce qui distingue les rats résistants ou sensibles au sein d'une population de rats soumis à un même régime gras et sucré

où on constate d'importantes différences individuelles de sensibilité à l'induction du syndrome métabolique (3<sup>ème</sup> étude) ?

Ces trois études nous ont permis de valider et d'améliorer progressivement l'interprétation des  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $\Delta^{13}\text{C}$ , avec (i) pour les  $\Delta^{15}\text{N}$ , une validation dans un contexte de fonte (1<sup>ère</sup> étude) ou d'accrétion (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> études) protéique, avec confrontation à des données de flux de protéosynthèse tissulaires (3<sup>ème</sup> étude), obtenues par l'utilisation conjointe d'une méthode de traceur métabolique en abondances enrichies (marquage au  $\text{D}_2\text{O}$ ), et (ii) pour les  $\Delta^{13}\text{C}$ , le passage d'une interprétation qualitative (1<sup>ère</sup> étude), à une interprétation quantitative sous hypothèse simplificatrice (2<sup>ème</sup> étude), puis sans hypothèse simplificatrice grâce à un protocole expérimental adapté (3<sup>ème</sup> étude).

### 3.2 Interprétation des $\Delta^{15}\text{N}$ des protéines tissulaires en termes d'adressage métabolique des AA tissulaires entre leurs voies anaboliques et cataboliques d'utilisation

Notre hypothèse de départ, issue des travaux préalables de l'équipe, était que la différence de  $\delta^{15}\text{N}$  entre protéines tissulaires et alimentaires ( $\Delta^{15}\text{N}$ ) varie en fonction de  $p_{\text{ox}}$ , la proportion d'AA tissulaires orientée vers l'oxydation, plutôt que vers la synthèse protéique (225): selon les prédictions de ce modèle multicompartimental d'analyse mécanistique et dynamique des  $\Delta^{15}\text{N}$  multitissulaires, une augmentation du  $\Delta^{15}\text{N}$  indique une augmentation de  $p_{\text{ox}}$  dans tous les tissus sauf le muscle où, en revanche, elle indique une réduction de  $p_{\text{ox}}$  du fait de son signe opposé du fractionnement isotopique associé au catabolisme des AA. En effet, dans la plupart des tissus, le catabolisme des AA favorise l'élimination tissulaire du  $^{14}\text{N}$  et donc

la rétention de  $^{15}\text{N}$  en raison des effets isotopiques associés aux réactions de transamination et désamination alors que, lors du catabolisme, le muscle libère dans la circulation certains des AA les plus enrichis en  $^{15}\text{N}$  comme Ala et Gln, ce qui pourrait favoriser l'élimination du  $^{15}\text{N}$  du muscle (225). En outre, la prédiction concernant la relation entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $p_{\text{ox}}$  dans les tissus splanchniques a déjà été validée expérimentalement chez le ruminant, où nous avons montré, en combinant des méthodes de traceur métabolique et de bilan artérioveineux, que le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines plasmatiques, qui sont synthétisées dans la zone splanchnique et principalement dans le foie, augmentent linéairement avec l'oxydation splanchnique des AA et la production hépatique d'urée (339).

Globalement, les résultats de cette thèse sont parfaitement en accord avec ces précédents résultats de modélisation ou expérimentaux chez le ruminant, notamment en ce qui concerne la région splanchnique, où nos résultats permettent de valider plus avant l'existence d'une association positive entre  $\Delta^{15}\text{N}$  et  $p_{\text{ox}}$  chez le rat. Par exemple, dans les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> études, cette association a été montrée par l'analyse des corrélations entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  et l'efficacité anabolique protéique (accrétion protéique tissulaire rapportée à l'apport protéique alimentaire, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> étude) ou les taux relatif (FSR) et absolu (ASR) de synthèse protéique tissulaire (3<sup>ème</sup> étude) : le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines hépatiques, qu'elles soient constitutives ou exportées vers le plasma, était négativement corrélé à l'utilisation anabolique des AA hépatiques, et donc positivement corrélé à leur efficacité d'utilisation catabolique ( $p_{\text{ox}}$ ). En effet, dans les études 2 et 3, nous avons montré l'existence de corrélations négatives entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines constitutives du foie et (i) leur efficacité anabolique ( $R = -0,56$ ;  $P < 0,001$  dans l'étude 2 et  $R = -0,44$ ;  $P < 0,01$  dans l'étude 3), et (ii) leur ASR ( $R = -0,33$ ;  $P < 0,05$  dans l'étude 3). Des corrélations négatives ont aussi été montrées entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines hépatiques exportées et leur FSR et leur ASR ( $R = -0,49$ ;  $P < 0,001$  et  $R = -0,49$ ;  $P < 0,001$ ; respectivement, dans l'étude 3). Symétriquement, dans l'étude 1, nous avons montré que l'utilisation catabolique

accrue des AA hépatiques induite par une restriction énergétique se traduisait par des augmentations conjointes des  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines hépatiques constitutives et exportées (protéines plasmatiques) et de l'urine (de +0,23 à +0,44‰).

Ces résultats sont cohérents avec les prédictions du modèle préalablement développé par notre équipe (225), dont les simulations pour l'embranchement hépatique, illustrées en Figure 28, indiquent que le  $\Delta^{15}\text{N}$  des protéines et de l'urée produites au niveau hépatique augmentent parallèlement et linéairement lorsque  $p_{\text{ox}}$  augmente. Nous avons aussi été à même, en mesurant l'expression hépatique d'ARNm codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme des AA (ornithine aminotransférase et déshydrogénase des céto-acides ramifiés) et notamment dans l'oxydation de la lysine (aminocarboxymuconate semialdéhyde synthétase), de confirmer que l'augmentation du  $\Delta^{15}\text{N}$  induite par la restriction énergétique, et notamment du  $\Delta^{15}\text{N}$  de la lysine des protéines plasmatiques et de l'intestin grêle, signe une augmentation du catabolisme des AA dans les tissus splanchniques (1<sup>ère</sup> étude).

C'est dans les tissus splanchniques, et notamment dans le foie, que nos résultats ont le mieux confirmé le lien entre le  $\Delta^{15}\text{N}$  protéique et l'adressage catabolique des AA ( $p_{\text{ox}}$ ), probablement car c'est dans ces tissus splanchniques que nous rencontrons le plus de différences inter-individuelles de  $p_{\text{ox}}$  du fait de nos conditions expérimentales. Nous avons ainsi validé notre hypothèse de départ d'une corrélation positive entre  $\Delta^{15}\text{N}$  protéique et  $p_{\text{ox}}$  dans les tissus splanchniques. Nos résultats permettent aussi de valider une autre hypothèse de départ concernant la corrélation cette fois négative entre  $\Delta^{15}\text{N}$  protéique et  $p_{\text{ox}}$  dans les muscles.

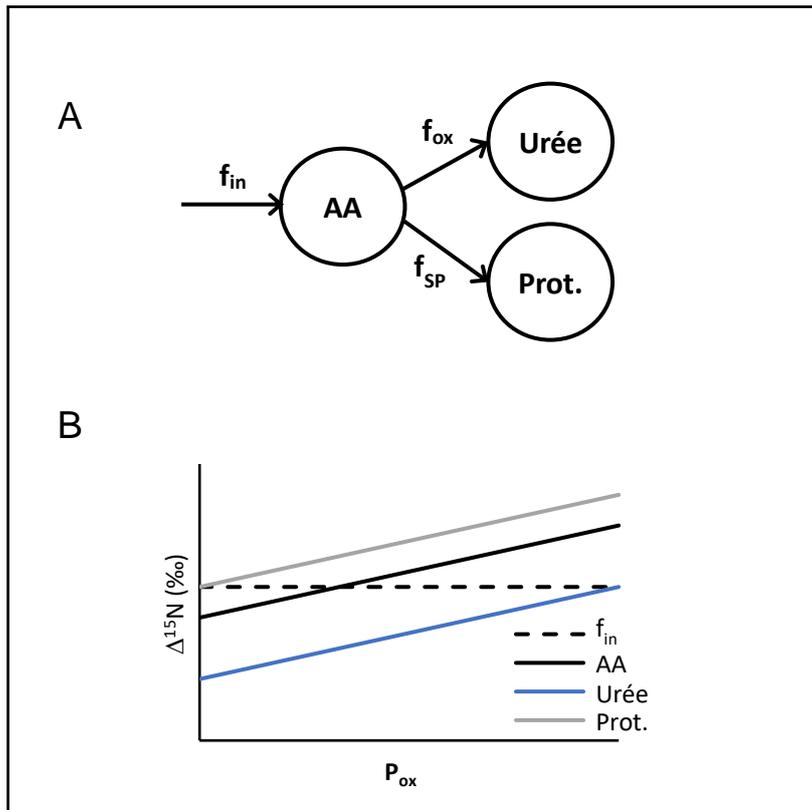


Figure 28. Adapté de (349). Évolution des  $\Delta^{15}\text{N}$  dans les protéines hépatiques et l'urine en fonction de  $p_{\text{ox}}$ . A. Embranchement métabolique hépatique conduisant, à partir des acides aminés (**AA**) précurseurs, à la synthèse de protéines (**Prot.**) et d'urée ( $f_{\text{in}}$ , flux entrant d'AA;  $f_{\text{SP}}$ , flux d'utilisation des AA pour la synthèse protéique;  $f_{\text{ox}}$ , flux d'oxydation des AA). B. Évolution des  $\Delta^{15}\text{N}$  de ces compartiments, à l'état stationnaire élémentaire et isotopique, en fonction de  $p_{\text{ox}}$ , la proportion d'AA orientés vers l'oxydation plutôt que la synthèse protéique ( $p_{\text{ox}} = f_{\text{ox}} / (f_{\text{ox}} + f_{\text{SP}})$ ). Ces simulations ont été opérées en considérant  $\{\epsilon_{f_{\text{ox}}} = -2 ; \epsilon_{f_{\text{SP}}} = +1 ; \Delta^{15}\text{N}f_{\text{in}} = 5\}$  où  $\epsilon$  est l'effet isotopique.

Dans l'étude 1 sur la restriction énergétique, nous avons ainsi observé que les muscles qui connaissaient une perte significative de leur masse protéique, du fait d'augmentations de leurs  $p_{ox}$ , montraient une chute significative de leur  $\Delta^{15}N$  (-0,32 et -0,17‰ pour les  $\Delta^{15}N$  du cœur et du muscle gastrocnémien subissant des pertes de masse protéique de -17% et -7%, respectivement), tandis que les muscles qui ne subissaient pas de fonte protéique gardaient des valeurs de  $\Delta^{15}N$  inchangées. Dans cette étude, on observait donc bien une corrélation négative entre  $p_{ox}$  et  $\Delta^{15}N$  dans deux muscles, contrairement à la corrélation positive qui était observée dans le foie (+0,25 à +0,45‰ pour les  $\Delta^{15}N$  des protéines hépatiques constitutives et exportées connaissant des pertes de -17% et -20% de masse protéique, respectivement, du fait d'une augmentation du  $p_{ox}$  hépatique).

Symétriquement, dans les deux autres études, nous avons également montré l'existence de corrélations positives entre (i) le  $\Delta^{15}N$  des protéines du muscle gastrocnémien et la masse maigre ( $R = 0,45$ ;  $P < 0,01$  dans l'étude 2) et (ii) le  $\Delta^{15}N$  des protéines du cœur et le FSR, l'ASR et l'efficacité anabolique protéique du cœur ( $R = 0,30$ ;  $P < 0,05$ ;  $R = 0,30$ ;  $P < 0,05$  et  $R = 0,39$ ;  $P < 0,05$  dans l'étude 3). Dans ces deux études, une diminution de  $p_{ox}$ , du fait d'une augmentation de l'adressage des AA vers la protéosynthèse, était associée à une augmentation du  $\Delta^{15}N$  dans les tissus musculaires concernés.

Dans leur ensemble, les résultats de nos 3 études valident que les corrélations entre  $p_{ox}$  et  $\Delta^{15}N$  sont de sens opposés dans les muscles (corrélation négative) et les autres tissus comme le foie (corrélation positive), ce qui est lié à leurs signes opposés de fractionnement isotopique associé au catabolisme des AA ( $\epsilon_{fox} > 0$  dans les muscles et  $< 0$  dans les autres tissus).

### 3.3 Interprétation des $\delta^{13}\text{C}$ des protéines tissulaires en termes d'adressage métabolique des nutriments vers les protéines tissulaires

Le carbone des protéines tissulaires a plusieurs origines possibles. Leur  $\delta^{13}\text{C}$  signe donc l'environnement isotopique alimentaire global puisque les différences de  $\delta^{13}\text{C}$  entre les macronutriments alimentaires sont importantes par rapport au fractionnement isotopique dans les voies métaboliques impliquées. En effet, bien que les AA des protéines alimentaires soient adressés métaboliquement vers les protéines tissulaires et fournissent ainsi l'essentiel du carbone protéique, les lipides et les glucides alimentaires peuvent également être utilisés pour la synthèse des AA non indispensables et fournir des carbones pour la synthèse protéique, tel que formalisé par les équations de la Figure 29. Des données isotopiques issues de plusieurs études réalisées dans différentes conditions nutritionnelles ont été mises à profit pour déterminer la contribution  $\alpha$  des protéines alimentaires et  $1-\alpha$  des autres macronutriments énergétiques au  $\delta^{13}\text{C}$  du collagène, en utilisant l'équation suivante (268):

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{collagène}} = \text{TS} + \alpha \times \delta^{13}\text{C}_{\text{protéines}} + (1 - \alpha) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{énergie}}$$

où  $\delta^{13}\text{C}_{\text{collagène}}$ ,  $\delta^{13}\text{C}_{\text{protéine}}$  et  $\delta^{13}\text{C}_{\text{énergie}}$  sont les  $\delta^{13}\text{C}$  du collagène tissulaire, des protéines alimentaires et de l'énergie (glucides + lipides) alimentaires, respectivement, mesurés expérimentalement, et TS et  $\alpha$ , qui sont à déterminer, sont le saut trophique du carbone lié au fractionnement isotopique dans les voies métaboliques et la proportion de carbone d'origine protéique déposé dans les protéines tissulaires.

$\delta^{13}C_P$ :  $\delta^{13}$  des protéines alimentaires       $TS_P$ : saut trophique des protéines alimentaires

$\delta^{13}C_G$ :  $\delta^{13}$  des glucides alimentaires       $TS_G$ : saut trophique des glucides alimentaires

$\delta^{13}C_L$ :  $\delta^{13}$  des lipides alimentaires       $TS_L$ : saut trophique des lipides alimentaires

$\delta^{13}C_{PT}$ :  $\delta^{13}$  des protéines d'un tissu       $TS$ : saut trophique global

$c$ : contribution des glucides alimentaires au carbone protéique des tissus

$p$ : contribution des protéines alimentaires au carbone protéique des tissus

$1 - p - c$ : contribution des lipides alimentaires au carbone protéique des tissus

$$\delta^{13}C_{PT} = p \times (\delta^{13}C_P + TS_P) + c \times (\delta^{13}C_G + TS_G) + (1 - p - c) \times (\delta^{13}C_L + TS_L) \quad 1$$

$$TS = p \times TS_P + c \times TS_G + (1 - p - c) \times TS_L \quad 2$$

$$\delta^{13}C_{PT} = (p \times \delta^{13}C_P) + (c \times \delta^{13}C_G) + (1 - p - c) \times \delta^{13}C_L + TS \quad 3$$

Figure 29. Équations originales permettant de déterminer les contributions des macronutriments alimentaires au carbone protéique des tissus. Les 3 inconnus de l'équation 3 ( $p$ ,  $c$  et  $TS$ ) ont été déterminés dans la 3<sup>e</sup> étude grâce à un protocole expérimental adapté qui consistait à utiliser 3 sources de saccharose (canne à sucre, betterave à sucre ou mélange 50:50 des deux) afin d'obtenir 3 régimes ayant la même composition en macronutriments mais 3 différentes valeurs de  $\delta^{13}C$  pour les glucides (distinctes d'au moins 3,5‰ entre régimes). Dans la 2<sup>e</sup> étude, afin de déterminer  $c$  et  $1-p-c$ , nous avons fait l'hypothèse que  $p$  et  $TS$  de l'équation 3 étaient constants entre les régimes normolipidique et hyperlipidique ayant la même teneur en protéines.

L'estimation de  $\alpha$  a été faite à partir de l'ensemble des données disponibles et en considérant que TS est constant d'une étude à l'autre. Dans ces conditions, les auteurs ont montré que les protéines alimentaires contribuent à ~75% du carbone du collagène, le reste provenant des glucides et des lipides alimentaires, et que ces proportions varient peu selon la composition du régime sauf pour les régimes nettement déficients ou excessifs en protéines (268).

Nos résultats issus des équations de la Figure 29 confirment que la contribution des protéines alimentaires est de l'ordre de 75% et qu'elle est assez stable quelle que soit la protéine tissulaire considérée (contribution des protéines alimentaires au carbone des protéines tissulaires de  $74,2 \pm 2,4\%$ ;  $n = 9$  tissus dans l'étude 2 et de  $72,8 \pm 2,8\%$ ;  $n = 7$  tissus dans l'étude 3).

De plus, dans les études 2 et 3, nous avons tiré parti des différences de  $\delta^{13}\text{C}$  des différents macronutriments et des différences de composition des régimes alimentaires utilisés pour estimer pour la première fois les contributions respectives des glucides et des lipides alimentaires au carbone des protéines tissulaires. Nos résultats montrent que pour un régime normolipidique (2<sup>e</sup> étude) les contributions des glucides et lipides aux carbones protéiques des tissus sont respectivement de  $22,4 \pm 3,1\%$  et  $3,4 \pm 0,3\%$  et que la consommation d'un régime hyperlipidique se traduit par une moindre contribution des glucides (comprise entre  $13,7\% \pm 1,3\%$  et  $10,4 \pm 1,1\%$  dans les études 2 et 3, respectivement) et une contribution plus importante des lipides ( $12,1 \pm 1,1\%$  à  $17,0 \pm 1,7\%$  pour les études 2 et 3, respectivement) aux carbones protéiques.

Dans l'étude 1, des estimations chiffrées n'ont pas été réalisées, d'une part, parce que l'état stationnaire isotopique n'était pas atteint, et d'autre part, parce que le protocole expérimental ne le permettait pas soit en ayant des différences de  $\delta^{13}\text{C}$  entre les mêmes

macronutriments des différents régimes comme dans l'étude 2 ou, idéalement, soit en ayant 3 niveaux de  $\delta^{13}\text{C}$  par régime comme dans l'étude 3. Néanmoins, le plus faible  $\delta^{13}\text{C}$  par rapport au groupe témoin des protéines tissulaires du groupe en restriction énergétique, essentiellement en restriction de l'apport glucidique, reflète une contribution plus importante des lipides aux carbones protéiques puisque les lipides alimentaires ont le plus faible  $\delta^{13}\text{C}$ .

La mesure des  $\delta^{13}\text{C}$  d'AA individuels par GC-C-IRMS a aussi été utilisée pour estimer pour la première fois la contribution des protéines, glucides et lipides alimentaires au carbone d'AA incorporés dans les protéines tissulaires (3<sup>e</sup> étude). Nous avons ainsi mis en évidence une moindre contribution des protéines alimentaires au carbone des AA pouvant être synthétisés *de novo* à partir de carbones issus des glucides et des lipides alimentaires avec une contribution des protéines de  $53,0 \pm 8,5\%$  ; une contribution des lipides de  $29,2 \pm 5,3\%$  et une contribution des glucides de  $17,9 \pm 3,2\%$  au carbone de la Glx des protéines de l'intestin grêle, du foie et du muscle *tibialis* antérieur (moyennes et écarts-types pour les 3 tissus).

Par ailleurs, de telles mesures du  $\delta^{13}\text{C}$  d'AA ont permis, de façon qualitative, d'observer une diminution de l'adressage des glucides alimentaires vers certains AA non indispensables lors d'une restriction énergétique essentiellement due à une restriction de l'apport glucidique (avec parfois une diminution du  $\Delta^{13}\text{C}$  de Ala, Asx, et Glx des protéines du plasma, de l'intestin grêle, du gastrocnémien et du cœur et aucun effet sur le  $\Delta^{13}\text{C}$  de Gly, Pro, Ile, Leu, Val, Met, Phe et Lys des protéines de ces 4 tissus (1<sup>e</sup> étude)).

### 3.4 Identification des altérations tissulaires du métabolisme des protéines et des AA lors de l'exposition à un régime gras et sucré

Le premier objectif de ce travail était d'identifier les tissus dont le métabolisme des AA et des protéines est modifié lors de l'exposition à un régime gras et sucré (2<sup>ème</sup> étude). Le modèle utilisé consistait à exposer des rats Spague Dawley à un régime gras et sucré potentiellement inducteur du syndrome métabolique, avec une exposition périnatale via l'alimentation de la mère, et/ou post-sevrage pendant 4 mois.

Nous avons pu identifier qu'une exposition prolongée, pendant la période périnatale et post-sevrage, à un régime gras et sucré affecte les  $\Delta^{15}\text{N}$  et donc les  $p_{\text{ox}}$  de 3 tissus, avec davantage d'oxydation des AA dans l'intestin grêle et au contraire une moindre oxydation dans le muscle *tibialis* antérieur et le tissu adipeux. Pour le tissu adipeux, cette réorientation du métabolisme des AA a été observée dans le cas d'une exposition limitée à la phase périnatale ou post-sevrage, tandis que pour l'intestin grêle et le muscle *tibialis* antérieur, cette réorientation du métabolisme des AA n'a été observée qu'après une exposition prolongée couvrant à la fois les périodes périnatale et post-sevrage.

Effectivement, à la lumière des travaux préalables de modélisation de notre groupe (225)(Figure 28), les augmentations de  $\Delta^{15}\text{N}$  protéique observées dans l'intestin grêle (+0,4‰) et le muscle *tibialis* antérieur (+0,3‰) chez les rats ayant été exposés à un régime gras et sucré pendant les périodes périnatale et post-sevrage, comparativement à chez les rats exposés à un régime normolipidique ont été différenciellement interprétées, soit comme une augmentation de  $p_{\text{ox}}$  dans l'intestin et une diminution de  $p_{\text{ox}}$  dans le muscle. Le tissu adipeux n'ayant pas été inclus dans le modèle (225), l'interprétation de l'augmentation de son  $\Delta^{15}\text{N}$  protéique (+0,3‰) était moins évidente. Étant donné que de multiples études ont démontré une expression et une

activité réduites d'enzymes impliquées dans le catabolisme des AA ramifiés dans le tissu adipeux dans le contexte de l'obésité et de la résistance à l'insuline (30, 350, 351), nous avons interprété l'augmentation de  $\Delta^{15}\text{N}$  protéique du tissu adipeux comme une diminution de  $p_{\text{ox}}$  lors de l'exposition à un régime gras et sucré induisant le syndrome métabolique.

Cette 2<sup>e</sup> étude nous a également permis de montrer que les adressages respectifs des glucides et des lipides alimentaires vers les protéines tissulaires, via les voies de synthèse d'AA non indispensables, varient selon les proportions de ces macronutriments dans l'alimentation. Il est intéressant de noter que lors de l'alimentation normolipidique, les lipides ont contribué à l'adressage des nutriments non-protéiques vers les protéines tissulaires en proportion de leur occurrence alimentaire dans les nutriments non-protéique (13%) tandis que lors de l'alimentation hyperlipidique, les lipides ont davantage contribué à l'adressage des nutriments non-protéiques (47%), mais pas en proportion avec leur occurrence alimentaire dans les nutriments non-protéiques (67%). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les lipides, comparativement aux glucides, n'ont pas accès à toutes les voies de synthèse d'AA non indispensables.

En effet, certains AA sont synthétisés à partir de précurseurs à 3 carbones surtout produits lors de la glycolyse alors que d'autres AA proviennent de précurseurs à 4 et 5 carbones produits lors du cycle de l'acide citrique qui est alimenté à la fois par les lipides et les glucides via l'acétyl-CoA. Nos résultats démontrent ainsi que le  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines est un marqueur intégré de l'utilisation des macronutriments énergétiques pour les biosynthèses issues du cycle de l'acide citrique et à des fins de production d'ATP.

### 3.5 Identification des différences tissulaires de métabolisme des protéines et des AA entre rats résistants ou sensibles au développement nutritionnel du syndrome métabolique

Le second objectif était d'identifier les modulations métaboliques tissulaires spécifiques entre rats résistants ou sensibles à l'induction nutritionnelle, par un régime gras et sucré, du syndrome métabolique (3<sup>ème</sup> étude). Le modèle utilisé, classiquement connu comme le modèle sensible/résistant, consistait à caractériser la diversité métabolique après 4 mois d'exposition à un régime gras et sucré. À cette fin, un score individuel de syndrome métabolique ( $Z_{SM}$ ) a été calculé comme la moyenne des z scores de composantes du syndrome métabolique (le poids, l'adiposité totale et viscérale, l'indice HOMA et les concentrations de triglycérides hépatiques et plasmatiques).

Dans le foie, nous avons ainsi identifié que la synthèse protéique augmentait tandis que la proportion d'AA catabolisée diminuait avec  $Z_{SM}$ . Ces réponses contribuaient au pool protéique hépatique plus gros des rats en syndrome métabolique. En effet, l'ASR protéique du foie était positivement associé à  $Z_{MS}$  ( $\beta = 13,80$ ;  $P < 0,0001$ ) tandis que  $p_{ox}$  y était négativement associé puisque le  $\Delta^{15}N$  y était négativement associé ( $\beta = -0,085$ ;  $P < 0,01$ ) (tel qu'illustré à la Figure 28).

En revanche, en ce qui concerne le muscle, nous avons trouvé une association positive plus faible entre  $Z_{MS}$  et la synthèse protéique d'un seul muscle, le gastrocnémien ( $\beta = 0,66$ ;  $P < 0,05$ ), sans liens entre  $Z_{MS}$  et la proportion d'AA catabolisée et les tailles des pools protéiques des muscles. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la sensibilité au développement du syndrome métabolique lorsque l'alimentation est grasse et sucrée, en plus d'être associée à un gain d'adiposité, est associée à un gain de masse protéique, lequel résulte

d'une orientation anabolique accrue du métabolisme protéique hépatique et non du métabolisme protéique musculaire.

Cette 3<sup>e</sup> étude nous a de surcroît permis de montrer une moindre flexibilité métabolique chez les rats sensibles au développement nutritionnel du syndrome métabolique, c'est-à-dire une moindre capacité à s'adapter métaboliquement pour gérer l'excès d'apport lipidique alimentaire et éviter son accumulation dans les tissus adipeux.

Effectivement, chez les rats sensibles vs résistants au syndrome métabolique, la contribution des lipides et des glucides alimentaires au carbone de la Glx des protéines était plus faible dans le foie (15,4 vs 17,0% pour les glucides et 25,0 vs 27,6% pour les lipides) et encore plus faible dans le muscle *tibialis* antérieur (22,0 vs 28,1 pour les glucides et 35,8 vs 45,7% pour les lipides).

Ceci atteste probablement d'un métabolisme oxydatif musculaire et hépatique altéré chez les rats sensibles au développement nutritionnel du syndrome métabolique, alors que les rats y étant résistants s'acclimatent à l'alimentation hyperlipidique, en orientant davantage les lipides vers les voies oxydatives, ce qui stimule leur adressage vers les voies de synthèse d'AA non indispensables et diminue le gain d'adiposité.

### 3.6 Forces et limites de l'approche utilisée

Ces travaux démontrent premièrement l'utilité de combiner des mesures des variations naturelles de  $\delta^{15}\text{N}$  et de  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires avec un traçage au  $\text{D}_2\text{O}$  n'interférant pas avec les abondances de ces isotopes, pour étudier le métabolisme des protéines et des AA. Il devient effectivement ainsi possible de mesurer à la fois l'adressage des macronutriments alimentaires vers les protéines tissulaires, notamment via la synthèse d'AA non indispensables, à partir des nutriments énergétiques non protéiques ( $\delta^{13}\text{C}$ ), l'adressage des AA tissulaires vers l'oxydation plutôt que la synthèse protéique ( $p_{\text{ox}}$  indiqué par le  $\delta^{15}\text{N}$ , Figure 28) et les vitesses et flux de synthèse protéique (FSR et ASR mesurés par un traçage au  $\text{D}_2\text{O}$ ).

Ces mesures ont été réalisées chez un modèle animal, le rat, qui comporte certains avantages : il permet un contrôle environnemental précis, notamment de l'alimentation et de sa composition isotopique, il permet aussi un phénotypage fin par des mesures précises de la composition corporelle qui sont plus difficiles voir impossibles chez l'homme (comme la quantité totale de tissu adipeux sous-cutané et épидидymaire et la taille des pools protéiques de plusieurs tissus), et il permet enfin le prélèvement et l'analyse de plusieurs tissus ce qui est impossible chez l'homme.

Néanmoins, le rat est aussi un modèle comportant certains inconvénients pour l'étude du syndrome métabolique. Plus particulièrement, il s'avère que les rats, relativement jeunes, étaient en croissance durant les études que nous avons réalisées. Ceci pourrait expliquer la stimulation de l'anabolisme hépatique surtout et aussi musculaire observée lors du syndrome métabolique dans les études 2 et 3 et le maintien de la masse musculaire lors de la restriction énergétique dans l'étude 1 en dépit d'une fonte protéique dans le foie et l'intestin. Nos modèles sont ainsi probablement plus représentatifs des effets du syndrome métabolique et de la restriction énergétique chez l'adolescent que chez l'adulte.

Enfin, une dernière limite qu'il convient de signaler est notre choix, dans la 3<sup>ème</sup> étude, d'utiliser 3 sources de saccharose (canne à sucre, betterave à sucre ou mélange 50:50 des deux) afin d'obtenir 3 régimes ayant la même composition en macronutriments, mais 3 différentes valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  pour les glucides (distinctes d'au moins 3,5‰ entre régimes). Ce schéma expérimental nous a permis de pouvoir estimer les 3 inconnues de l'équation d'interprétation des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  tissulaires, à savoir le saut trophique et les contributions de chaque nutriment au carbone protéique de chaque tissu ( $p$ ,  $c$  et  $1-p-c$ , les contributions respectives des protéines, glucides et lipides alimentaires, Figure 29). Néanmoins, le saccharose était relativement peu présent dans le régime (143g/kg), et il s'est révélé être le contributeur minoritaire à l'adressage des nutriments vers les C protéiques tissulaires dans nos conditions expérimentales. De ce fait, le choix d'utiliser le saccharose, plutôt que d'autres nutriments pour distinguer isotopiquement les régimes, n'a résulté qu'en de faibles différences de  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires entre régimes (avec par exemple des valeurs moyennes par régime de  $-19,46 \pm 0,08\text{‰}$ ,  $-19,91 \pm 0,10\text{‰}$  et  $-20,46 \pm 0,08\text{‰}$  pour les protéines du foie, soit des différences de l'ordre de 0,5‰ entre  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires qui sont très atténuées par rapport aux différences de 3,5‰ entre  $\delta^{13}\text{C}$  des glucides alimentaires). Ces faibles écarts ont engendré des difficultés numériques pour l'estimation des paramètres  $p$ ,  $c$  et  $l$ , notamment en ce qui concerne l'interprétation des valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  des différents AA individuels des protéines tissulaires mesurées par GC-C-IRMS, qui sont davantage bruitées, pour des raisons analytiques, que les valeurs de  $\delta^{13}\text{C}$  des protéines tissulaires mesurées par EA-IRMS. Ceci a notamment conduit à ce que nous ne présentions, concernant l'adressage des nutriments vers les AA individuels des protéines tissulaires, que les résultats pour Glx et non pour les autres AA analysés.

### 3.7 Perspectives

Des analyses complémentaires sont en cours et des travaux futurs envisagés. Notamment, des mesures de l'expression de certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des AA sont en cours dans l'étude 3. Ces mesures d'expression seront mises en regard des mesures de  $\Delta^{15}\text{N}$  et de flux de synthèse protéique et pourront permettre de confirmer les réorientations métaboliques qu'elles indiquent.

Nous envisageons aussi réaliser une étude chez des animaux plus âgés, puisque le fait que nos animaux aient été en croissance limite la transposabilité de nos résultats à l'Homme.

Enfin, nous avons engagé une étude chez l'Homme pour tester si les  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  sont capables de constituer de nouveaux biomarqueurs isotopiques du diabète de type II, en signant les réorientations métaboliques liées au prolongement pathologique du syndrome métabolique. Pour ce faire, nous développons une étude cas-témoin nichée dans la cohorte Su.Vi.MAX (collaboration avec P. Galan et E. Kesse de l'U1125 EREN) : des échantillons de plasma d'individus diabétiques et sains appariés sur de nombreux paramètres (dont l'apport alimentaire, susceptible d'influencer les signatures isotopiques circulantes) seront analysés pour déterminer si les signatures isotopiques protéiques globales (EA-IRMS) et AA-spécifiques (GC-C-IRMS) permettent de discriminer les individus sains des diabétiques.



## 4 CONCLUSION



Les mesures des variations naturelles des abondances des isotopes stables de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) ont permis d'identifier des altérations du métabolisme des protéines et des AA, lors de l'induction nutritionnelle du syndrome métabolique. Plus particulièrement, cette thèse démontre qu'une alimentation grasse et sucrée augmente l'adressage des lipides alimentaires vers la synthèse d'AA, ce qui se reflète dans le  $\delta^{13}\text{C}$  protéique des tissus, et que cette alimentation peut induire une réorganisation précoce du métabolisme des AA dans certains tissus comme l'intestin grêle, le muscle et le tissu adipeux ce qui résulte en des variations de leurs  $\delta^{15}\text{N}$  protéiques. En outre, cette thèse démontre que la sensibilité individuelle au développement nutritionnel du syndrome métabolique lors d'une alimentation grasse et sucrée, est associée à des effets métaboliques différentiels entre les tissus avec un anabolisme protéique hépatique accru et un anabolisme musculaire plutôt inchangé, ce qui résulte surtout en des variations splanchniques du  $\delta^{15}\text{N}$  protéique. Les mesures du  $\delta^{13}\text{C}$  protéique ont permis d'identifier une moindre flexibilité métabolique hépatique et musculaire, résultant en un moindre adressage des lipides vers les voies de synthèse des AA chez les individus sensibles au développement du syndrome métabolique lors d'une alimentation grasse et sucrée.

Au niveau méthodologique, ce travail a permis une validation expérimentale des précédents travaux de l'équipe portant sur l'interprétation des variations de  $\delta^{15}\text{N}$  des protéines tissulaires en termes de modulations de la répartition des AA tissulaires entre leurs voies d'utilisation anaboliques et cataboliques. De plus, les variations de  $\delta^{13}\text{C}$  ont servi aux premières estimations des contributions de chacun des macronutriments alimentaires au carbone protéique des tissus avec notamment des équations originales et un protocole expérimental adapté.

Les mesures des  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  ont été couplées à un traçage au  $\text{D}_2\text{O}$  qui a permis de mesurer simultanément les flux de synthèse protéiques des différents tissus. Ce travail illustre

donc in fine l'intérêt de combiner des mesures des variations naturelles de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  avec un traçage au  $\text{D}_2\text{O}$  pour obtenir une vision globale du métabolisme des protéines et des AA et confirme que les variations de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  constituent des biomarqueurs du métabolisme des AA et de ses dysrégulations. Ceci ouvre la voie à l'utilisation de ces biomarqueurs isotopiques afin d'améliorer notre compréhension de la façon dont l'homéostasie protéique est régulée en situation normale et se dérégule lors de différentes conditions nutritionnelles et physiopathologiques.

## 5 RÉFÉRENCES



1. Fuller MF, Reeds PJ. Nitrogen cycling in the gut. *Annual review of nutrition* 1998;18:385-411. doi: 10.1146/annurev.nutr.18.1.385.
2. Erickson RH, Kim YS. Digestion and absorption of dietary protein. *Annual review of medicine* 1990;41:133-9. doi: 10.1146/annurev.me.41.020190.001025.
3. Gaudichon C, Roos N, Mahe S, Sick H, Bouley C, Tome D. Gastric emptying regulates the kinetics of nitrogen absorption from <sup>15</sup>N-labeled milk and <sup>15</sup>N-labeled yogurt in miniature pigs. *The Journal of nutrition* 1994;124(10):1970-7.
4. Peraino C, Rogers QR, Yoshida M, Chen ML, Harper AE. Observations on protein digestion in vivo. II. Dietary factors affecting the rate of disappearance of casein from the gastrointestinal tract. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 1959;37:1475-91.
5. Fouillet H, Gaudichon C, Mariotti F, Bos C, Huneau JF, Tome D. Energy nutrients modulate the splanchnic sequestration of dietary nitrogen in humans: a compartmental analysis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2001;281(2):E248-60.
6. Mahe S, Roos N, Benamouzig R, Davin L, Luengo C, Gagnon L, Gausserges N, Rautureau J, Tome D. Gastrojejunal kinetics and the digestion of [<sup>15</sup>N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *The American journal of clinical nutrition* 1996;63(4):546-52.
7. Boirie Y, Dangin M, Gachon P, Vasson MP, Maubois JL, Beaufrere B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(26):14930-5.
8. Nassl AM, Rubio-Aliaga I, Fenselau H, Marth MK, Kottra G, Daniel H. Amino acid absorption and homeostasis in mice lacking the intestinal peptide transporter PEPT1. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2011;301(1):G128-37. doi: 10.1152/ajpgi.00017.2011.
9. Wu G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *The Journal of nutrition* 1998;128(8):1249-52.
10. Neis EP, Sabrkhanly S, Hundscheid I, Schellekens D, Lenaerts K, Olde Damink SW, Blaak EE, Dejong CH, Rensen SS. Human splanchnic amino-acid metabolism. *Amino acids* 2017;49(1):161-72. doi: 10.1007/s00726-016-2344-7.
11. Buraczewska L. Secretion of nitrogenous compounds in the small intestine of pigs. *Acta physiologica Polonica* 1979;30(2):319-26.
12. Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tome D. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids* 2007;33(4):547-62. doi: 10.1007/s00726-006-0477-9.
13. Stoll B, Burrin DG, Henry J, Yu H, Jahoor F, Reeds PJ. Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets. *The Journal of nutrition* 1998;128(9):1517-24.
14. Biolo G, Tessari P, Inchiostro S, Bruttomesso D, Fongher C, Sabadin L, Fratton MG, Valerio A, Tiengo A. Leucine and phenylalanine kinetics during mixed meal ingestion: a multiple tracer approach. *The American journal of physiology* 1992;262(4 Pt 1):E455-63.
15. Yu YM, Wagner DA, Tredget EE, Walaszewski JA, Burke JF, Young VR. Quantitative role of splanchnic region in leucine metabolism: L-[1-<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N]leucine and substrate balance studies. *The American journal of physiology* 1990;259(1 Pt 1):E36-51.
16. Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE, Wolfe RR. Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *The American journal of physiology* 1999;277(3 Pt 1):E513-20.
17. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids* 2009;37(1):1-17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.
18. van der Schoor SR, Wattimena DL, Huijmans J, Vermes A, van Goudoever JB. The gut takes nearly all: threonine kinetics in infants. *The American journal of clinical nutrition* 2007;86(4):1132-8.
19. Schaart MW, Schierbeek H, van der Schoor SR, Stoll B, Burrin DG, Reeds PJ, van Goudoever JB. Threonine utilization is high in the intestine of piglets. *The Journal of nutrition* 2005;135(4):765-70.

20. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Molecular endocrinology* 2014;28(8):1221-38. doi: 10.1210/me.2014-1108.
21. Young VR, Marchini JS. Mechanisms and nutritional significance of metabolic responses to altered intakes of protein and amino acids, with reference to nutritional adaptation in humans. *The American journal of clinical nutrition* 1990;51(2):270-89.
22. Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *The Journal of nutrition* 2006;136(1 Suppl):207S-11S.
23. Frayn KN, Khan K, Coppack SW, Elia M. Amino acid metabolism in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Clinical science* 1991;80(5):471-4.
24. Watford M. Glutamine and glutamate metabolism across the liver sinusoid. *The Journal of nutrition* 2000;130(4S Suppl):983S-7S.
25. Yudkoff M. Interactions in the Metabolism of Glutamate and the Branched-Chain Amino Acids and Ketoacids in the CNS. *Neurochemical research* 2017;42(1):10-8. doi: 10.1007/s11064-016-2057-z.
26. Akashi H, Gojobori T. Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(6):3695-700. doi: 10.1073/pnas.062526999.
27. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal* 1998;336 ( Pt 1):1-17.
28. van de Poll MC, Soeters PB, Deutz NE, Fearon KC, Dejong CH. Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange. *The American journal of clinical nutrition* 2004;79(2):185-97.
29. Weiner ID, Verlander JW. Renal ammonia metabolism and transport. *Comprehensive Physiology* 2013;3(1):201-20. doi: 10.1002/cphy.c120010.
30. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nature reviews Endocrinology* 2014;10(12):723-36. doi: 10.1038/nrendo.2014.171.
31. Zheng Y, Ceglarek U, Huang T, Li L, Rood J, Ryan DH, Bray GA, Sacks FM, Schwarzfuchs D, Thiery J, et al. Weight-loss diets and 2-y changes in circulating amino acids in 2 randomized intervention trials. *The American journal of clinical nutrition* 2016;103(2):505-11. doi: 10.3945/ajcn.115.117689.
32. Braun A, Vikari A, Windisch W, Auerswald K. Transamination governs nitrogen isotope heterogeneity of amino acids in rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 2014;62(32):8008-13. doi: 10.1021/jf502295f.
33. Broer S, Broer A. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *The Biochemical journal* 2017;474(12):1935-63. doi: 10.1042/BCJ20160822.
34. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *International journal of biochemistry and molecular biology* 2013;4(1):1.
35. Bier DM. The energy costs of protein metabolism: lean and mean on Uncle Sam's team. *The Role of Protein and Amino Acids in Sustaining and Enhancing Performance* 1999:109-19.
36. Cherey Y, Attaix D, Rosolowska-Huszcz D, Belkhou R, Robin JP, Arnal M, Le Maho Y. Whole-body and tissue protein synthesis during brief and prolonged fasting in the rat. *Clinical science* 1991;81(5):611-9.
37. Chevalier L, Bos C, Gryson C, Luengo C, Walrand S, Tome D, Boirie Y, Gaudichon C. High-protein diets differentially modulate protein content and protein synthesis in visceral and peripheral tissues in rats. *Nutrition* 2009;25(9):932-9. doi: 10.1016/j.nut.2009.01.013.
38. Chevalier L, Bos C, Azzout-Marniche D, Dardevet D, Tome D, Gaudichon C. Dietary protein regulates hepatic constitutive protein anabolism in rats in a dose-dependent manner and independently of energy nutrient composition. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010;299(6):R1720-30. doi: 10.1152/ajpregu.00497.2010.
39. Danicke S, Nieto R, Lobley GE, Fuller MF, Brown DS, Milne E, Calder AG, Chen S, Grant I, Bottcher W. Responses in the absorptive phase in muscle and liver protein synthesis rates of growing rats. *Archiv fur Tierernahrung* 1999;52(1):41-52.

40. El Yousfi M, Breuille D, Papet I, Blum S, Andre M, Mosoni L, Denis P, Buffiere C, Obled C. Increased tissue protein synthesis during spontaneous inflammatory bowel disease in HLA-B27 rats. *Clinical science* 2003;105(4):437-46. doi: 10.1042/CS20020313.
41. Estornell E, Barber T, Cabo J. Protein synthesis in vivo in rats fed on lipid-rich liquid diets. *The British journal of nutrition* 1994;72(4):509-17.
42. Estornell E, Cabo J, Barber T. Protein synthesis is stimulated in nutritionally obese rats. *The Journal of nutrition* 1995;125(5):1309-15.
43. Garlick PJ, McNurlan MA, Preedy VR. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H]phenylalanine. *The Biochemical journal* 1980;192(2):719-23.
44. Goldspink DF, Kelly FJ. Protein turnover and growth in the whole body, liver and kidney of the rat from the foetus to senility. *The Biochemical journal* 1984;217(2):507-16.
45. Jepson MM, Pell JM, Bates PC, Millward DJ. The effects of endotoxaemia on protein metabolism in skeletal muscle and liver of fed and fasted rats. *The Biochemical journal* 1986;235(2):329-36.
46. Masanés R, Fernández-López J-A, Alemany M, Remesar X, Rafecas I. Effect of dietary protein content on tissue protein synthesis rates in Zucker lean rats. *Nutrition Research* 1999;19(7):1017-26.
47. McNurlan MA, Fern EB, Garlick PJ. Failure of leucine to stimulate protein synthesis in vivo. *The Biochemical journal* 1982;204(3):831-8.
48. McNURLAN MA, Garlick PJ. Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 1981;241(3):E238-E45.
49. McNurlan MA, Garlick PJ. Contribution of rat liver and gastrointestinal tract to whole-body protein synthesis in the rat. *The Biochemical journal* 1980;186(1):381-3.
50. McNurlan MA, Tomkins AM, Garlick PJ. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *The Biochemical journal* 1979;178(2):373-9.
51. Mercier S, Breuillé D, Mosoni L, Obled C, Mirand PP. Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *The Journal of nutrition* 2002;132(7):1921-8.
52. Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY, Mirand PP. Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *The American journal of physiology* 1995;268(2 Pt 1):E328-35.
53. Preedy VR, Garlick PJ. Protein synthesis in skeletal muscle of the perfused rat hemicorpus compared with rates in the intact animal. *The Biochemical journal* 1983;214(2):433-42.
54. Ruot B, Bechereau F, Bayle G, Breuille D, Obled C. The response of liver albumin synthesis to infection in rats varies with the phase of the inflammatory process. *Clinical science* 2002;102(1):107-14.
55. Yuan CL, Sharma N, Gilge DA, Stanley WC, Li Y, Hatzoglou M, Previs SF. Preserved protein synthesis in the heart in response to acute fasting and chronic food restriction despite reductions in liver and skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2008;295(1):E216-22. doi: 10.1152/ajpendo.00545.2007.
56. Fern EB, Garlick PJ. The specific radioactivity of the tissue free amino acid pool as a basis for measuring the rate of protein synthesis in the rat in vivo. *Biochemical Journal* 1974;142(2):413-9.
57. Fern EB, Garlick PJ. The specific radioactivity of the precursor pool for estimates of the rate of protein synthesis. *The Biochemical journal* 1973;134(4):1127-30.
58. Garlick PJ. Measurement of liver protein-synthetic rate. *The Biochemical journal* 1972;126(3):23P.
59. Glick Z, McNurlan MA, Garlick PJ. Protein synthesis rate in liver and muscle of rats following four days of overfeeding. *The Journal of nutrition* 1982;112(2):391-7.
60. Pain VM, Garlick PJ. Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat in vivo. *The Journal of biological chemistry* 1974;249(14):4510-4.
61. Baillie AG, Garlick PJ. Protein synthesis in adult skeletal muscle after tenotomy: responses to fasting and insulin infusion. *Journal of applied physiology* 1991;71(3):1020-4.

62. Baillie AG, Garlick PJ. Attenuated responses of muscle protein synthesis to fasting and insulin in adult female rats. *The American journal of physiology* 1992;262(1 Pt 1):E1-5.
63. Faure M, Moennoz D, Montigon F, Mettraux C, Breuille D, Ballevre O. Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *The Journal of nutrition* 2005;135(3):486-91.
64. Jepson MM, Bates PC, Millward DJ. The role of insulin and thyroid hormones in the regulation of muscle growth and protein turnover in response to dietary protein in the rat. *The British journal of nutrition* 1988;59(3):397-415.
65. Laurent BC, Moldawer LL, Young VR, Bistran BR, Blackburn GL. Whole-body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *The American journal of physiology* 1984;246(5 Pt 1):E444-51.
66. Preedy VR, McNurlan MA, Garlick PJ. Protein synthesis in skin and bone of the young rat. *The British journal of nutrition* 1983;49(3):517-23.
67. Reeds P, Palmer R, Hay S, McMillan D. Protein synthesis in skeletal muscle measured at different times during a 24 hour period. *Bioscience reports* 1986;6(2):209-13.
68. Taillandier D, Guezennec C-Y, Patureau-Mirand P, Bigard X. A high protein diet does not improve protein synthesis in the nonweight-bearing rat tibialis anterior muscle. *The Journal of nutrition* 1996;126(1):266.
69. Chikenji T, Elwyn DH, Kinney JM. Protein synthesis rates in rat muscle and skin based on lysyl-tRNA radioactivity. *Journal of Surgical Research* 1983;34(1):68-82.
70. Millward DJ, Garlick PJ, Nnanyelugo DO, Waterlow JC. The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *The Biochemical journal* 1976;156(1):185-8.
71. Obled C, Arnal M. Contribution of skin to whole-body protein synthesis in rats at different stages of maturity. *JOURNAL OF NUTRITION-BALTIMORE AND SPRINGFIELD THEN BETHESDA-* 1992;122:2167-.
72. Faure M, Moennoz D, Montigon F, Fay LB, Breuillé D, Finot PA, Ballèvre O, Boza J. Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Analytical biochemistry* 2002;307(2):244-51.
73. Faure M, Choné F, Mettraux C, Godin J-P, Béchereau F, Vuichoud J, Papet I, Breuillé D, Obled C. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. *The Journal of nutrition* 2007;137(7):1802-7.
74. Obled C, Papet I, Breuille D. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2002;5(2):189-97.
75. Samuels SE, Taillandier D, Arousseau E, Cherel Y, Le Maho Y, Arnal M, Attaix D. Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *The American journal of physiology* 1996;271(2 Pt 1):E232-8.
76. Biggs R, Booth FW. Protein synthesis rate is not suppressed in rat heart during senescence. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1990;258(1):H207-H11.
77. Jeejeebhoy KN, Bruce-Robertson A, Ho J, Sodtke U. The effect of cortisol on the synthesis of rat plasma albumin, fibrinogen and transferrin. *The Biochemical journal* 1972;130(2):533-8.
78. Papet I, Dardevet D, Sornet C, Béchereau F, Prugnaud J, Pouyet C, Obled C. Acute phase protein levels and thymus, spleen and plasma protein synthesis rates differ in adult and old rats. *The Journal of nutrition* 2003;133(1):215-9.
79. Waterlow JC, Waterlow JC. Protein turnover. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI Pub., 2006.
80. McMahan KW, McCarthy MD. Embracing variability in amino acid  $\delta^{15}\text{N}$  fractionation: mechanisms, implications, and applications for trophic ecology. *Ecosphere* 2016;7(12).
81. Wu G. Amino acids: biochemistry and nutrition: CRC Press, 2013.
82. Morris SM, Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual review of nutrition* 2002;22:87-105. doi: 10.1146/annurev.nutr.22.110801.140547.
83. Wu G. Urea synthesis in enterocytes of developing pigs. *The Biochemical journal* 1995;312 ( Pt 3):717-23.
84. Häggström M. Medical gallery of Mikael Häggström 2014. *Wikiversity Journal of Medicine* 2014;1(2).

85. Hayase K, Yokogoshi H, Yoshida A. Effect of dietary proteins and amino acid deficiencies on urinary excretion of nitrogen and the urea synthesizing system in rats. *The Journal of nutrition* 1980;110(7):1327-37.
86. Herrera E, Knopp RH, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. VI. Plasma fuels, insulin, liver composition, gluconeogenesis, and nitrogen metabolism during late gestation in the fed and fasted rat. *The Journal of clinical investigation* 1969;48(12):2260-72. doi: 10.1172/JCI106192.
87. Carey GB, Cheung C-W, Cohen NS, Brusilow S, Rajzman L. Regulation of urea and citrulline synthesis under physiological conditions. *Biochemical Journal* 1993;292(1):241-7.
88. Yamamoto S, Korin T, Anzai M, Wang MF, Hosoi A, Abe A, Kishi K, Inoue G. Comparative effects of protein, protein hydrolysate and amino acid diets on nitrogen metabolism of normal, protein-deficient, gastrectomized or hepatectomized rats. *The Journal of nutrition* 1985;115(11):1436-46.
89. Phromphetcharat V, Jackson A, Dass P, Welbourne T. Ammonia partitioning between glutamine and urea: Interorgan participation in metabolic acidosis. *Kidney international* 1981;20(5):598-605.
90. el-Khoury AE, Fukagawa NK, Sanchez M, Tsay RH, Gleason RE, Chapman TE, Young VR. Validation of the tracer-balance concept with reference to leucine: 24-h intravenous tracer studies with L-[1-<sup>13</sup>C]leucine and [15N-15N]urea. *The American journal of clinical nutrition* 1994;59(5):1000-11.
91. el-Khoury AE, Ajami AM, Fukagawa NK, Chapman TE, Young VR. Diurnal pattern of the interrelationships among leucine oxidation, urea production, and hydrolysis in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 1996;271(3):E563-E73.
92. Jackson AA, Danielsen MS, Boyes S. A noninvasive method for measuring urea kinetics with a single dose of [15N15N]urea in free-living humans. *The Journal of nutrition* 1993;123(12):2129-36.
93. Long CL, Jeevanandam M, Kinney JM. Metabolism and recycling of urea in man. *The American journal of clinical nutrition* 1978;31(8):1367-82.
94. Younes H, Demigne C, Remesy C. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *The British journal of nutrition* 1996;75(2):301-14.
95. Mariotti F, Pueyo ME, Tome D, Berot S, Benamouzig R, Mahe S. The influence of the albumin fraction on the bioavailability and postprandial utilization of pea protein given selectively to humans. *The Journal of nutrition* 2001;131(6):1706-13.
96. Younes H, Garleb KA, Behr SR, Demigné C, Rémésy C. Dietary fiber stimulates the extra-renal route of nitrogen excretion in partially nephrectomized rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1998;9(11):613-20.
97. Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Benamouzig R, Mahé S. Guar gum does not impair the absorption and utilization of dietary nitrogen but affects early endogenous urea kinetics in humans. *The American journal of clinical nutrition* 2001;74(4):487-93.
98. Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Critical reviews in environmental science and technology* 2015;45(17):1827-79. doi: 10.1080/10643389.2014.1000761.
99. Rand WM, Pellett PL, Young VR. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition* 2003;77(1):109-27.
100. Calloway DH, Odell AC, Margen S. Sweat and miscellaneous nitrogen losses in human balance studies. *The Journal of nutrition* 1971;101(6):775-86.
101. De Feo P. Fed state protein metabolism in diabetes mellitus. *The Journal of nutrition* 1998;128(2 Suppl):328S-32S.
102. Arnal M, Obled C, Attaix D, Patureau-Mirand P, Bonin D. Dietary control of protein turnover. *Diabete & metabolisme* 1987;13(6):630-42.
103. Luiking Y, Deutz N. Interorgan exchange of amino acids: what is the driving force? *Energy and Protein Metabolism and Nutrition* 2007(124):319.

104. Tessari P, Garibotto G. Interorgan amino acid exchange. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2000;3(1):51-7.
105. Brosnan JT. Interorgan amino acid transport and its regulation. *The Journal of nutrition* 2003;133(6 Suppl 1):2068S-72S.
106. Waterlow JC. The mysteries of nitrogen balance. *Nutrition research reviews* 1999;12(1):25-54. doi: 10.1079/095442299108728857.
107. Price GM, Halliday D, Pacy PJ, Quevedo MR, Millward DJ. Nitrogen homeostasis in man: influence of protein intake on the amplitude of diurnal cycling of body nitrogen. *Clinical science* 1994;86(1):91-102.
108. Quevedo MR, Price GM, Halliday D, Pacy PJ, Millward DJ. Nitrogen homeostasis in man: diurnal changes in nitrogen excretion, leucine oxidation and whole body leucine kinetics during a reduction from a high to a moderate protein intake. *Clinical science* 1994;86(2):185-93.
109. Fouillet H, Mariotti F, Gaudichon C, Bos C, Tomé D. Peripheral and splanchnic metabolism of dietary nitrogen are differently affected by the protein source in humans as assessed by compartmental modeling. *The Journal of nutrition* 2002;132(1):125-33.
110. Gaudichon C, Mahe S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Dare S, Van Oycke M, Ferriere F, Rautureau J, Tome D. Net postprandial utilization of [15N]-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *The Journal of nutrition* 1999;129(4):890-5.
111. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in cell biology* 2014;24(7):400-6. doi: 10.1016/j.tcb.2014.03.003.
112. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(23):14484-94.
113. Boirie Y, Short KR, Ahlman B, Charlton M, Nair KS. Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes* 2001;50(12):2652-8.
114. 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(6):1377-85.
115. Meek SE, Persson M, Ford GC, Nair KS. Differential regulation of amino acid exchange and protein dynamics across splanchnic and skeletal muscle beds by insulin in healthy human subjects. *Diabetes* 1998;47(12):1824-35.
116. Nair KS, Ford GC, Ekberg K, Fernqvist-Forbes E, Wahren J. Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type I diabetic patients. *The Journal of clinical investigation* 1995;95(6):2926-37. doi: 10.1172/JCI118000.
117. Abdulla H, Smith K, Atherton PJ, Idris I. Role of insulin in the regulation of human skeletal muscle protein synthesis and breakdown: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia* 2016;59(1):44-55. doi: 10.1007/s00125-015-3751-0.
118. Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, Wackerhage H, Taylor PM, Rennie MJ. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *The FASEB Journal* 2005;19(3):422-4.
119. 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. *Journal of Clinical Investigation* 1995;96(4):1722.
120. Volpi E, Ferrando AA, Yeckel CW, Tipton KD, Wolfe RR. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *The Journal of clinical investigation* 1998;101(9):2000-7. doi: 10.1172/JCI939.
121. Sheffield-Moore M, Wolfe RR, Gore DC, Wolf SE, Ferrer DM, Ferrando AA. Combined effects of hyperaminoacidemia and oxandrolone on skeletal muscle protein synthesis. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2000;278(2):E273-9.
122. Bennet W, Connacher A, Scrimgeour C, Rennie M. The effect of amino acid infusion on leg protein turnover assessed by L-[15N] phenylalanine and L-[1-13C] leucine exchange. *European journal of clinical investigation* 1990;20(1):41-50.

123. Biolo G, Tipton KD, Klein S, Wolfe RR. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. *The American journal of physiology* 1997;273(1 Pt 1):E122-9.
124. Tipton KD, Ferrando AA, Phillips SM, Doyle D, Jr., Wolfe RR. Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *The American journal of physiology* 1999;276(4 Pt 1):E628-34.
125. Carroll CC, Fluckey JD, Williams RH, Sullivan DH, Trappe TA. Human soleus and vastus lateralis muscle protein metabolism with an amino acid infusion. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2005;288(3):E479-85. doi: 10.1152/ajpendo.00393.2004.
126. Corring T, Souffrant WB, Darcy-Vrillon B, Gebhardt G, Laplace JP, Rerat A. Exogenous and endogenous contribution to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. I. Contributions of nitrogen from the exocrine pancreatic secretion and the bile. *Reproduction, nutrition, development* 1990;30(6):717-22.
127. Haman F, Zwingelstein G, Weber JM. Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *The American journal of physiology* 1997;273(6 Pt 2):R2046-54.
128. Guggenheim KY. Rudolf Schoenheimer and the concept of the dynamic state of body constituents. *The Journal of nutrition* 1991;121(11):1701-4.
129. McNurlan MA, Garlick PJ. Influence of nutrient intake on protein turnover. *Diabetes/metabolism reviews* 1989;5(2):165-89.
130. Reeds PJ, Haggarty P, Wahle KW, Fletcher JM. Tissue and whole-body protein synthesis in immature Zucker rats and their relationship to protein deposition. *The Biochemical journal* 1982;204(2):393-8.
131. Gasier HG, Riechman SE, Wiggs MP, Previs SF, Fluckey JD. A comparison of 2H<sub>2</sub>O and phenylalanine flooding dose to investigate muscle protein synthesis with acute exercise in rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2009;297(1):E252-9. doi: 10.1152/ajpendo.90872.2008.
132. Oshima T, Tamiya N. Mechanism of transaminase action. *The Biochemical journal* 1961;78:116-9.
133. Zhang XJ, Chinkes DL, Sakurai Y, Wolfe RR. An isotopic method for measurement of muscle protein fractional breakdown rate in vivo. *The American journal of physiology* 1996;270(5 Pt 1):E759-67.
134. Wolfe RR, Chinkes DL. *Isotope tracers in metabolic research: principles and practice of kinetic analysis*: John Wiley & Sons, 2005.
135. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice* 2014;2014:943162. doi: 10.1155/2014/943162.
136. Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH. The metabolic syndrome. *Endocrine reviews* 2008;29(7):777-822. doi: 10.1210/er.2008-0024.
137. Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;28(4):629-36. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151092.
138. Abajobir AA, Abate KH, Abbafati C, Abbas KM, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abera SF, Aboyans V, Abu-Raddad LJ, Abu-Rmeileh NME, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990&#x2013;2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*;390(10100):1345-422. doi: 10.1016/s0140-6736(17)32366-8.
139. Kuk JL, Ardern CI. Age and sex differences in the clustering of metabolic syndrome factors: association with mortality risk. *Diabetes care* 2010;33(11):2457-61. doi: 10.2337/dc10-0942.
140. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2006;23(5):469-80. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x.

141. Yamakado M, Nagao K, Imaizumi A, Tani M, Toda A, Tanaka T, Jinzu H, Miyano H, Yamamoto H, Daimon T, et al. Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population. *Scientific reports* 2015;5:11918. doi: 10.1038/srep11918.
142. West DB, Boozer CN, Moody DL, Atkinson RL. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *The American journal of physiology* 1992;262(6 Pt 2):R1025-32.
143. Azzout-Marniche D, Chaumontet C, Nadkarni NA, Piedcoq J, Fromentin G, Tome D, Even PC. Food intake and energy expenditure are increased in high-fat-sensitive but not in high-carbohydrate-sensitive obesity-prone rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2014;307(3):R299-309. doi: 10.1152/ajpregu.00065.2014.
144. Even PC, Nadkarni NA, Chaumontet C, Azzout-Marniche D, Fromentin G, Tome D. Identification of behavioral and metabolic factors predicting adiposity sensitivity to both high fat and high carbohydrate diets in rats. *Frontiers in physiology* 2011;2:96. doi: 10.3389/fphys.2011.00096.
145. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutrition & metabolism* 2016;13:65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.
146. Aleixandre de Artinano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *The British journal of nutrition* 2009;102(9):1246-53. doi: 10.1017/S0007114509990729.
147. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007;15(4):798-808. doi: 10.1038/oby.2007.608.
148. Wurtz P, Makinen VP, Soininen P, Kangas AJ, Tukiainen T, Kettunen J, Savolainen MJ, Tammelin T, Viikari JS, Ronnema T, et al. Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults. *Diabetes* 2012;61(6):1372-80. doi: 10.2337/db11-1355.
149. Tai E, Tan M, Stevens R, Low Y, Muehlbauer M, Goh D, Ilkayeva O, Wenner B, Bain J, Lee J. Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* 2010;53(4):757-67.
150. Pennetti V, Galante A, Zonta-Sgaramella L, Jayakar SD. Relation between obesity, insulinemia, and serum amino acid concentrations in a sample of Italian adults. *Clinical chemistry* 1982;28(11):2219-24.
151. Newgard CB, An J, Bain JR, Muehlbauer MJ, Stevens RD, Lien LF, Haqq AM, Shah SH, Arlotto M, Slentz CA. A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism* 2009;9(4):311-26.
152. Nair KS, Garrow JS, Ford C, Mahler RF, Halliday D. Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia* 1983;25(5):400-3.
153. Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PloS one* 2010;5(12):e15234. doi: 10.1371/journal.pone.0015234.
154. Felig P, Marliss E, Cahill GF, Jr. Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. *The New England journal of medicine* 1969;281(15):811-6. doi: 10.1056/NEJM196910092811503.
155. Menge BA, Schrader H, Ritter PR, Ellrichmann M, Uhl W, Schmidt WE, Meier JJ. Selective amino acid deficiency in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Regulatory peptides* 2010;160(1-3):75-80. doi: 10.1016/j.regpep.2009.08.001.
156. Cheng S, Rhee EP, Larson MG, Lewis GD, McCabe EL, Shen D, Palma MJ, Roberts LD, Dejam A, Souza AL, et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 2012;125(18):2222-31. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067827.
157. Caballero B, Finer N, Wurtman RJ. Plasma amino acids and insulin levels in obesity: response to carbohydrate intake and tryptophan supplements. *Metabolism: clinical and experimental* 1988;37(7):672-6.
158. Caballero B, Wurtman RJ. Differential effects of insulin resistance on leucine and glucose kinetics in obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 1991;40(1):51-8.

159. El-Khairi L, Ueland PM, Nygard O, Refsum H, Vollset SE. Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. *The American journal of clinical nutrition* 1999;70(6):1016-24.
160. Adams SH. Emerging perspectives on essential amino acid metabolism in obesity and the insulin-resistant state. *Adv Nutr* 2011;2(6):445-56. doi: 10.3945/an.111.000737.
161. Wang TJ, Larson MG, Vasani RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature medicine* 2011;17(4):448-53. doi: 10.1038/nm.2307.
162. McCormack SE, Shaham O, McCarthy MA, Deik AA, Wang TJ, Gerszten RE, Clish CB, Mootha VK, Grinspoon SK, Fleischman A. Circulating branched-chain amino acid concentrations are associated with obesity and future insulin resistance in children and adolescents. *Pediatric obesity* 2013;8(1):52-61. doi: 10.1111/j.2047-6310.2012.00087.x.
163. Trico D, Prinsen H, Giannini C, de Graaf R, Juchem C, Li F, Caprio S, Santoro N, Herzog RI. Elevated alpha-Hydroxybutyrate and Branched-Chain Amino Acid Levels Predict Deterioration of Glycemic Control in Adolescents. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2017;102(7):2473-81. doi: 10.1210/jc.2017-00475.
164. Geidenstam N, Spegel P, Mulder H, Filipsson K, Ridderstrale M, Danielsson AP. Metabolite profile deviations in an oral glucose tolerance test—a comparison between lean and obese individuals. *Obesity* 2014;22(11):2388-95. doi: 10.1002/oby.20868.
165. Ho JE, Larson MG, Vasani RS, Ghorbani A, Cheng S, Rhee EP, Florez JC, Clish CB, Gerszten RE, Wang TJ. Metabolite profiles during oral glucose challenge. *Diabetes* 2013;62(8):2689-98. doi: 10.2337/db12-0754.
166. Shaham O, Wei R, Wang TJ, Ricciardi C, Lewis GD, Vasani RS, Carr SA, Thadhani R, Gerszten RE, Mootha VK. Metabolic profiling of the human response to a glucose challenge reveals distinct axes of insulin sensitivity. *Molecular systems biology* 2008;4:214. doi: 10.1038/msb.2008.50.
167. Lee CC, Watkins SM, Lorenzo C, Wagenknecht LE, Il'yasova D, Chen YD, Haffner SM, Hanley AJ. Branched-Chain Amino Acids and Insulin Metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes care* 2016;39(4):582-8. doi: 10.2337/dc15-2284.
168. Forlani G, Vannini P, Marchesini G, Zoli M, Ciavarella A, Pisi E. Insulin-dependent metabolism of branched-chain amino acids in obesity. *Metabolism: clinical and experimental* 1984;33(2):147-50.
169. Qin LQ, Xun P, Bujnowski D, Daviglius ML, Van Horn L, Stamler J, He K, Group ICR. Higher branched-chain amino acid intake is associated with a lower prevalence of being overweight or obese in middle-aged East Asian and Western adults. *The Journal of nutrition* 2011;141(2):249-54.
170. Li Y-C, Li Y, Liu L-Y, Chen Y, Zi T-Q, Du S-S, Jiang Y-S, Feng R-N, Sun C-H. The ratio of dietary branched-chain amino acids is associated with a lower prevalence of obesity in young northern Chinese adults: An internet-based cross-sectional study. *Nutrients* 2015;7(11):9573-89.
171. Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, et al. Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental* 2012;61(10):1388-94. doi: 10.1016/j.metabol.2012.03.011.
172. Solerte SB, Fioravanti M, Locatelli E, Bonacasa R, Zamboni M, Basso C, Mazzoleni A, Mansi V, Geroutis N, Gazzaruso C. Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity during a long-term (60 weeks) randomized study with amino acid dietary supplements in elderly subjects with type 2 diabetes mellitus. *The American journal of cardiology* 2008;101(11A):82E-8E. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.03.006.
173. Urata Y, Okita K, Korenaga K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. The effect of supplementation with branched-chain amino acids in patients with liver cirrhosis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* 2007;37(7):510-6. doi: 10.1111/j.1872-034X.2007.00081.x.

174. Guillet C, Delcourt I, Rance M, Giraudet C, Walrand S, Bedu M, Duche P, Boirie Y. Changes in basal and insulin and amino acid response of whole body and skeletal muscle proteins in obese men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009;94(8):3044-50. doi: 10.1210/jc.2008-2216.
175. Green CR, Wallace M, Divakaruni AS, Phillips SA, Murphy AN, Ciaraldi TP, Metallo CM. Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature chemical biology* 2016;12(1):15-21. doi: 10.1038/nchembio.1961.
176. Dunn MA, Hartsook EW. Comparative amino acid and protein metabolism in obese and non-obese Zucker rats. *The Journal of nutrition* 1980;110(9):1865-79.
177. Kadota Y, Toyoda T, Kitaura Y, Adams SH, Shimomura Y. Regulation of hepatic branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in rats fed a high-fat diet. *Obesity research & clinical practice* 2013;7(6):e439-44.
178. Kadota Y, Toyoda T, Hayashi-Kato M, Kitaura Y, Shimomura Y. Octanoic acid promotes branched-chain amino acid catabolisms via the inhibition of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase in rats. *Metabolism: clinical and experimental* 2015;64(9):1157-64. doi: 10.1016/j.metabol.2015.05.014.
179. Spydevold Ø, Hokland B. Oxidation of branched-chain amino acids in skeletal muscle and liver of rat Effects of octanoate and energy state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1981;676(3):279-88.
180. Sookoian S, Pirola CJ. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. *World journal of gastroenterology* 2012;18(29):3775-81. doi: 10.3748/wjg.v18.i29.3775.
181. Newgard Christopher B. Interplay between Lipids and Branched-Chain Amino Acids in Development of Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 2012;15(5):606-14. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.024.
182. Kainulainen H, Hulmi JJ, Kujala UM. Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation. *Exercise and sport sciences reviews* 2013;41(4):194-200. doi: 10.1097/JES.0b013e3182a4e6b6.
183. Leclercq B, Seve B. Influence of adiposity (genetic or hormonal) on the metabolism of amino acids and nutritional responses. *Reproduction, nutrition, development* 1994;34(6):569-82.
184. Stepien M, Azzout-Marniche D, Even PC, Khodorova N, Fromentin G, Tome D, Gaudichon C. Adaptation to a high protein diet progressively increases the postprandial accumulation of carbon skeletons from dietary amino acids in rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2016;ajpregu 00040 2016. doi: 10.1152/ajpregu.00040.2016.
185. Solini A, Bonora E, Bonadonna R, Castellino P, DeFronzo RA. Protein metabolism in human obesity: relationship with glucose and lipid metabolism and with visceral adipose tissue. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997;82(8):2552-8. doi: 10.1210/jcem.82.8.4182.
186. Luzi L, Castellino P, DeFronzo RA. Insulin and hyperaminoacidemia regulate by a different mechanism leucine turnover and oxidation in obesity. *The American journal of physiology* 1996;270(2 Pt 1):E273-81.
187. Chevalier S, Marliss EB, Morais JA, Lamarche M, Gougeon R. Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *The American journal of clinical nutrition* 2005;82(2):355-65.
188. Welle S, Barnard RR, Statt M, Amatruda JM. Increased protein turnover in obese women. *Metabolism: clinical and experimental* 1992;41(9):1028-34. doi: 10.1016/0026-0495(92)90133-U.
189. Jensen MD, Haymond MW. Protein metabolism in obesity: effects of body fat distribution and hyperinsulinemia on leucine turnover. *The American journal of clinical nutrition* 1991;53(1):172-6.
190. Patterson BW, Horowitz JF, Wu G, Watford M, Coppack SW, Klein S. Regional muscle and adipose tissue amino acid metabolism in lean and obese women. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2002;282(4):E931-6. doi: 10.1152/ajpendo.00359.2001.

191. Katsanos CS, Mandarino LJ. Protein metabolism in human obesity: a shift in focus from whole-body to skeletal muscle. *Obesity* 2011;19(3):469-75. doi: 10.1038/oby.2010.290.
192. Gougeon R, Morais JA, Chevalier S, Pereira S, Lamarche M, Marliss EB. Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes care* 2008;31(1):128-33.
193. Staten MA, Matthews DE, Bier DM. Leucine metabolism in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1986;35(11):1249-53.
194. Tessari P, Coracina A, Kiwanuka E, Vedovato M, Vettore M, Valerio A, Zaramella M, Garibotto G. Effects of insulin on methionine and homocysteine kinetics in type 2 diabetes with nephropathy. *Diabetes* 2005;54(10):2968-76.
195. Halvatsiotis P, Short KR, Bigelow M, Nair KS. Synthesis rate of muscle proteins, muscle functions, and amino acid kinetics in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51(8):2395-404.
196. Denne SC, Brechtel G, Johnson A, Liechty EA, Baron AD. Skeletal muscle proteolysis is reduced in noninsulin-dependent diabetes mellitus and is unaltered by euglycemic hyperinsulinemia or intensive insulin therapy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1995;80(8):2371-7.
197. Luzi L, Petrides AS, De Fronzo RA. Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. *Diabetes* 1993;42(12):1868-77.
198. Barazzoni R, Kiwanuka E, Zanetti M, Cristini M, Vettore M, Tessari P. Insulin acutely increases fibrinogen production in individuals with type 2 diabetes but not in individuals without diabetes. *Diabetes* 2003;52(7):1851-6.
199. Pereira S, Marliss EB, Morais JA, Chevalier S, Gougeon R. Insulin resistance of protein metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57(1):56-63. doi: 10.2337/db07-0887.
200. Manders RJ, Koopman R, Beelen M, Gijzen AP, Wodzig WK, Saris WH, van Loon LJ. The muscle protein synthetic response to carbohydrate and protein ingestion is not impaired in men with longstanding type 2 diabetes. *The Journal of nutrition* 2008;138(6):1079-85.
201. Bak AM, Moller AB, Vendelbo MH, Nielsen TS, Viggers R, Rungby J, Pedersen SB, Jorgensen JO, Jessen N, Moller N. Differential regulation of lipid and protein metabolism in obese vs. lean subjects before and after a 72-h fast. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2016;311(1):E224-35. doi: 10.1152/ajpendo.00464.2015.
202. Villareal DT, Smith GI, Shah K, Mittendorfer B. Effect of weight loss on the rate of muscle protein synthesis during fasted and fed conditions in obese older adults. *Obesity* 2012;20(9):1780-6. doi: 10.1038/oby.2011.280.
203. Smith GI, Villareal DT, Sinacore DR, Shah K, Mittendorfer B. Muscle protein synthesis response to exercise training in obese, older men and women. *Medicine and science in sports and exercise* 2012;44(7):1259-66. doi: 10.1249/MSS.0b013e3182496a41.
204. Fillios LC, Saito S. Hepatic Protein Synthesis and Lipid Metabolism in Genetically Obese Rats. *Metabolism: clinical and experimental* 1965;14:734-45.
205. Adéchan S, Giardina S, Rémond D, Papet I, Buonocore D, Gaudichon C, Dardevet D, Marzatico F, Mosoni L. Excessive Energy Intake Does Not Modify Fed-state Tissue Protein Synthesis Rates in Adult Rats. *Obesity* 2009;17(7):1348-55.
206. Chanseume E, Giraudet C, Gryson C, Walrand S, Rousset P, Boirie Y, Morio B. Enhanced muscle mixed and mitochondrial protein synthesis rates after a high-fat or high-sucrose diet. *Obesity* 2007;15(4):853-9. doi: 10.1038/oby.2007.582.
207. Masgrau A, Mishellany-Dutour A, Murakami H, Beaufrere AM, Walrand S, Giraudet C, Migne C, Gerbaix M, Metz L, Courteix D, et al. Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *The Journal of physiology* 2012;590(20):5199-210. doi: 10.1113/jphysiol.2012.238576.
208. Anderson SR, Gilge DA, Steiber AL, Previs SF. Diet-induced obesity alters protein synthesis: tissue-specific effects in fasted versus fed mice. *Metabolism: clinical and experimental* 2008;57(3):347-54. doi: 10.1016/j.metabol.2007.10.009.
209. Southon S, Livesey G, Gee JM, Johnson IT. Differences in intestinal protein synthesis and cellular proliferation in well-nourished rats consuming conventional laboratory diets. *The British journal of nutrition* 1985;53(1):87-95.

210. Domènech M, López-Soriano FJ, Carbó N, Argilés JM. Amino acid metabolism in several tissues of the obese Zucker rat as indicated by the tissue accumulation of  $\alpha$ -amino [1-14 C] isobutyrate. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1992;110(2):155-9.
211. Shah SH, Crosslin DR, Haynes CS, Nelson S, Turer CB, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Wenner BR, Bain JR, Laferrere B, et al. Branched-chain amino acid levels are associated with improvement in insulin resistance with weight loss. *Diabetologia* 2012;55(2):321-30. doi: 10.1007/s00125-011-2356-5.
212. O'Brien DM. Stable Isotope Ratios as Biomarkers of Diet for Health Research. *Annual review of nutrition* 2015;35:565-94. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034511.
213. Tcherkez G. *Isotopie biologique: Introduction aux effets isotopiques et à leurs applications en biologie*: Tec & Doc Lavoisier, 2010.
214. Macko SA, Estep MLF, Engel MH, Hare P. Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochimica et cosmochimica acta* 1986;50(10):2143-6.
215. Melzer E, Schmidt HL. Carbon isotope effects on the pyruvate dehydrogenase reaction and their importance for relative carbon-13 depletion in lipids. *The Journal of biological chemistry* 1987;262(17):8159-64.
216. Handley L, Raven JA. The use of natural abundance of nitrogen isotopes in plant physiology and ecology. *Plant, Cell & Environment* 1992;15(9):965-85.
217. Rishavy MA, Cleland WW, Lusty CJ.  $^{15}\text{N}$  Isotope effects in glutamine hydrolysis catalyzed by carbamyl phosphate synthetase: evidence for a tetrahedral intermediate in the mechanism. *Biochemistry* 2000;39(24):7309-15.
218. Hiller DA, Singh V, Zhong M, Strobel SA. A two-step chemical mechanism for ribosome-catalysed peptide bond formation. *Nature* 2011;476(7359):236-9. doi: 10.1038/nature10248.
219. Seila AC, Okuda K, Nunez S, Seila AF, Strobel SA. Kinetic isotope effect analysis of the ribosomal peptidyl transferase reaction. *Biochemistry* 2005;44(10):4018-27. doi: 10.1021/bi047742f.
220. Silber J, Engel M, Macko S. Kinetic fractionation of stable carbon and nitrogen isotopes during peptide bond hydrolysis: experimental evidence and geochemical implications. *Chemical Geology: Isotope Geoscience Section* 1992;101(3-4):211-21.
221. Bada JL, Schoeninger MJ, Schimmelmann A. Isotopic fractionation during peptide bond hydrolysis. *Geochimica et cosmochimica acta* 1989;53(12):3337-41.
222. Hayes JM. Fractionation of carbon and hydrogen isotopes in biosynthetic processes. *Reviews in mineralogy and geochemistry* 2001;43(1):225-77.
223. Fogel ML, Cifuentes LA. *Isotope fractionation during primary production*. Edtion ed. *Organic geochemistry*: Springer, 1993:73-98.
224. Schoeller DA. Isotope fractionation: why aren't we what we eat? *Journal of Archaeological Science* 1999;26(6):667-73.
225. Poupin N, Mariotti F, Huneau JF, Hermier D, Fouillet H. Natural isotopic signatures of variations in body nitrogen fluxes: a compartmental model analysis. *PLoS computational biology* 2014;10(10):e1003865. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003865.
226. Wallin G, Åqvist J. The transition state for peptide bond formation reveals the ribosome as a water trap. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107(5):1888-93.
227. McCutchan JH, Lewis WM, Kendall C, McGrath CC. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos* 2003;102(2):378-90.
228. Caut S, Angulo E, Courchamp F. Variation in discrimination factors ( $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$ ): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. *Journal of Applied Ecology* 2009;46(2):443-53.
229. Huelsemann F, Koehler K, Braun H, Schaenzer W, Flenker U. Human dietary  $\delta^{15}\text{N}$  intake: representative data for principle food items. *American journal of physical anthropology* 2013;152(1):58-66.
230. Peterson BJ, Fry B. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematics* 1987;18(1):293-320.
231. Cantalapiedra-Hijar G, Fouillet H, Huneau JF, Fanchone A, Doreau M, Nozière P, Ortigues-Marty I. Relationship between efficiency of nitrogen utilization and isotopic nitrogen

- fractionation in dairy cows: contribution of digestion v. metabolism? *Animal* 2016;10(2):221-9. doi: 10.1017/s1751731115002025.
232. Cantalapiedra-Hijar G, Ortigues-Marty I, Sepchat B, Agabriel J, Huneau JF, Fouillet H. Diet-animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *The British journal of nutrition* 2015;113(7):1158-69. doi: 10.1017/s0007114514004449.
  233. Balter V, Simon L, Fouillet H, Lecuyer C. Box-modeling of 15N/14N in mammals. *Oecologia* 2006;147(2):212-22. doi: 10.1007/s00442-005-0263-5.
  234. Petzke KJ, Boeing H, Klaus S, Metzges CC. Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans. *The Journal of nutrition* 2005;135(6):1515-20.
  235. O'Brien DM, Kristal AR, Jeannet MA, Wilkinson MJ, Bersamin A, Luick B. Red blood cell  $\delta^{15}\text{N}$ : a novel biomarker of dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid intake. *The American journal of clinical nutrition* 2009;89(3):913-9.
  236. O'Connell TC, Hedges RE. Investigations into the effect of diet on modern human hair isotopic values. *American journal of physical anthropology* 1999;108(4):409-25.
  237. Kuhnle GG, Joosen AM, Kneale CJ, O'Connell TC. Carbon and nitrogen isotopic ratios of urine and faeces as novel nutritional biomarkers of meat and fish intake. *European journal of nutrition* 2013;52(1):389-95.
  238. Patel PS, Cooper AJ, O'Connell TC, Kuhnle GG, Kneale CK, Mulligan AM, Luben RN, Brage S, Khaw K-T, Wareham NJ. Serum carbon and nitrogen stable isotopes as potential biomarkers of dietary intake and their relation with incident type 2 diabetes: the EPIC-Norfolk study. *The American journal of clinical nutrition* 2014;100(2):708-18.
  239. Schoeller D, Klein P, Watkins J, Heim T, MacLean W.  $^{13}\text{C}$  abundances of nutrients and the effect of variations in  $^{13}\text{C}$  isotopic abundances of test meals formulated for  $^{13}\text{CO}_2$  breath tests. *The American journal of clinical nutrition* 1980;33(11):2375-85.
  240. Jahren AH, Bostic JN, Davy BM. The potential for a carbon stable isotope biomarker of dietary sugar intake. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2014;29(5):795-816.
  241. DeNiro MJ, Epstein S. Mechanism of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science* 1977;197(4300):261-3.
  242. van Leeuwen KA, Prenzler PD, Ryan D, Camin F. Gas Chromatography-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry for Traceability and Authenticity in Foods and Beverages. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2014;13(5):814-37.
  243. Bostic JN, Palafox SJ, Rottmueller ME, Jahren AH. Effect of baking and fermentation on the stable carbon and nitrogen isotope ratios of grain-based food. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2015;29(10):937-47. doi: 10.1002/rcm.7178.
  244. Morrison DJ, Dodson B, Slater C, Preston T.  $^{13}\text{C}$  natural abundance in the British diet: implications for  $^{13}\text{C}$  breath tests. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2000;14(15):1321-4.
  245. Yeung EH, Saudek CD, Jahren AH, Kao WH, Islas M, Kraft R, Coresh J, Anderson CA. Evaluation of a novel isotope biomarker for dietary consumption of sweets. *American journal of epidemiology* 2010;172(9):1045-52. doi: 10.1093/aje/kwq247.
  246. Nash SH, Kristal AR, Bersamin A, Hopkins SE, Boyer BB, O'Brien DM. Carbon and nitrogen stable isotope ratios predict intake of sweeteners in a Yup'ik study population. *The Journal of nutrition* 2013;143(2):161-5. doi: 10.3945/jn.112.169425.
  247. Minagawa M, Wada E. Stepwise enrichment of  $^{15}\text{N}$  along food chains: further evidence and the relation between  $\delta^{15}\text{N}$  and animal age. *Geochimica et cosmochimica acta* 1984;48(5):1135-40.
  248. Post DM. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 2002;83(3):703-18.
  249. Robbins CT, Felicetti LA, Sponheimer M. The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia* 2005;144(4):534-40. doi: 10.1007/s00442-005-0021-8.

250. Zanden MJV, Rasmussen JB. Variation in  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  trophic fractionation: Implications for aquatic food web studies. *Limnology and Oceanography* 2001;46(8):2061-6. doi: 10.4319/lo.2001.46.8.2061.
251. Vanderklift MA, Ponsard S. Sources of variation in consumer-diet  $\delta^{15}\text{N}$  enrichment: a meta-analysis. *Oecologia* 2003;136(2):169-82.
252. 米山忠克, 太田庸起子, 大谷武. Variations of natural  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  abundances in the rat tissues and their correlation. *Radioisotopes* 1983;32(7):330-2.
253. MacAvoy SE, Macko SA, Arneson LS. Growth versus metabolic tissue replacement in mouse tissues determined by stable carbon and nitrogen isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology* 2005;83(5):631-41.
254. Lee TN, Buck CL, Barnes BM, O'Brien DM. A test of alternative models for increased tissue nitrogen isotope ratios during fasting in hibernating arctic ground squirrels. *Journal of Experimental Biology* 2012;215(19):3354-61.
255. DeNiro MJ, Epstein S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica et cosmochimica acta* 1981;45(3):341-51.
256. Arneson LS, MacAvoy SE. Carbon, nitrogen, and sulfur diet-tissue discrimination in mouse tissues. *Canadian Journal of Zoology* 2005;83(7):989-95.
257. Kurle CM. Interpreting temporal variation in omnivore foraging ecology via stable isotope modelling. *Functional Ecology* 2009;23(4):733-44.
258. Caut S, Angulo E, Courchamp F. Discrimination factors ( $\Delta^{15}\text{N}$  and  $\Delta^{13}\text{C}$ ) in an omnivorous consumer: effect of diet isotopic ratio. *Functional Ecology* 2008;22(2):255-63.
259. Gaebler OH, Vitti TG, Vukmirovich R. Isotope effects in metabolism of  $^{14}\text{N}$  and  $^{15}\text{N}$  from unlabeled dietary proteins. *Canadian journal of biochemistry* 1966;44(9):1249-57.
260. Sick H, Roos N, Saggau E, Haas K, Meyn V, Walch B, Trugo N. Amino acid utilization and isotope discrimination of amino nitrogen in nitrogen metabolism of rat liver in vivo. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 1997;36(4):340-6.
261. Fuller BT, Petzke KJ. The dietary protein paradox and threonine  $^{15}\text{N}$ -depletion: Pyridoxal-5'-phosphate enzyme activity as a mechanism for the  $\delta^{15}\text{N}$  trophic level effect. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2017;31(8):705-18.
262. Werner RA, Schmidt H-L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry* 2002;61(5):465-84.
263. Miller J, Millar J, Longstaffe F. Carbon-and nitrogen-isotope tissue-diet discrimination and turnover rates in deer mice, *Peromyscus maniculatus*. *Canadian Journal of Zoology* 2008;86(7):685-91.
264. Robb G, Woodborne S, de Bruin P, Medger K, Bennett N. The influence of food quantity on carbon and nitrogen stable isotope values in southern African spiny mice (*Acomys spinosissimus*). *Canadian Journal of Zoology* 2015;93(5):345-51.
265. Kurle CM, Koch PL, Tershy BR, Croll DA. The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ) in mammalian omnivores. *Isotopes in environmental and health studies* 2014;50(3):307-21. doi: 10.1080/10256016.2014.908872.
266. Sare DT, Millar JS, Longstaffe FJ. Tracing dietary protein in red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*) using stable isotopes of nitrogen and carbon. *Canadian Journal of Zoology* 2005;83(5):717-25.
267. Hwang Y, Millar J, Longstaffe F. Do  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values of feces reflect the isotopic composition of diets in small mammals? *Canadian Journal of Zoology* 2007;85(3):388-96.
268. Fernandes R, Nadeau M-J, Grootes PM. Macronutrient-based model for dietary carbon routing in bone collagen and bioapatite. *Archaeological and Anthropological Sciences* 2012;4(4):291-301.
269. Naito YI, Chikaraishi Y, Drucker DG, Ohkouchi N, Semal P, Wissing C, Bocherens H. Ecological niche of Neanderthals from Spy Cave revealed by nitrogen isotopes of individual amino acids in collagen. *Journal of human evolution* 2016;93:82-90. doi: 10.1016/j.jhevol.2016.01.009.

270. Scott JH, O'Brien DM, Emerson D, Sun H, McDonald GD, Salgado A, Fogel ML. An examination of the carbon isotope effects associated with amino acid biosynthesis. *Astrobiology* 2006;6(6):867-80.
271. Hare PE, Fogel ML, Stafford TW, Mitchell AD, Hoering TC. The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *Journal of Archaeological Science* 1991;18(3):277-92.
272. Wallace CJ, Hedges RE. Nitrogen isotopic discrimination in dietary amino acids: The threonine anomaly. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2016;30(22):2442-6. doi: 10.1002/rcm.7732.
273. Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, Metges CC. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2006;20(19):2973-8. doi: 10.1002/rcm.2695.
274. Petzke KJ, Lemke S. Hair protein and amino acid  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  abundances take more than 4 weeks to clearly prove influences of animal protein intake in young women with a habitual daily protein consumption of more than 1 g per kg body weight. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2009;23(16):2411-20. doi: 10.1002/rcm.4025.
275. Petzke KJ, Boeing H, Metges CC. Choice of dietary protein of vegetarians and omnivores is reflected in their hair protein  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  abundance. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005;19(11):1392-400.
276. STETTEN Jr D. The fate of dietary serine in the body of the rat. *Journal of Biological Chemistry* 1942;144:501-6.
277. Wang W, Wu Z, Dai Z, Yang Y, Wang J, Wu G. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino acids* 2013;45(3):463-77. doi: 10.1007/s00726-013-1493-1.
278. Darling PB, Grunow J, Rafii M, Brookes S, Ball RO, Pencharz PB. Threonine dehydrogenase is a minor degradative pathway of threonine catabolism in adult humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 2000;278(5):E877-E84.
279. Munro H. Evolution of protein metabolism in mammals. *Mammalian protein metabolism* 1969;3:133-82.
280. McMahon KW, Fogel ML, Elsdon TS, Thorrold SR. Carbon isotope fractionation of amino acids in fish muscle reflects biosynthesis and isotopic routing from dietary protein. *Journal of Animal Ecology* 2010;79(5):1132-41.
281. Howland MR, Corr LT, Young SM, Jones V, Jim S, Van Der Merwe NJ, Mitchell AD, Evershed RP. Expression of the dietary isotope signal in the compound-specific  $\delta^{13}\text{C}$  values of pig bone lipids and amino acids. *International Journal of Osteoarchaeology* 2003;13(1-2):54-65.
282. Jim S, Jones V, Ambrose SH, Evershed RP. Quantifying dietary macronutrient sources of carbon for bone collagen biosynthesis using natural abundance stable carbon isotope analysis. *British Journal of Nutrition* 2006;95(06):1055-62.
283. Fantle MS, Dittel AI, Schwalm SM, Epifanio CE, Fogel ML. A food web analysis of the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*, using stable isotopes in whole animals and individual amino acids. *Oecologia* 1999;120(3):416-26.
284. O'Brien DM, Boggs CL, Fogel ML. Pollen feeding in the butterfly *Heliconius charitonia*: isotopic evidence for essential amino acid transfer from pollen to eggs. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 2003;270(1533):2631-6.
285. Newsome SD, Wolf N, Peters J, Fogel ML. Amino acid  $\delta^{13}\text{C}$  analysis shows flexibility in the routing of dietary protein and lipids to the tissue of an omnivore. *Integrative and comparative biology* 2014;54(5):890-902.
286. Poupin N, Bos C, Mariotti F, Huneau J-F, Tomé D, Fouillet H. The nature of the dietary protein impacts the tissue-to-diet  $^{15}\text{N}$  discrimination factors in laboratory rats. *PloS one* 2011;6(11):e28046. doi: 10.1371/journal.pone.0028046.
287. Deschner T, Fuller BT, Oelze VM, Boesch C, Hublin JJ, Mundry R, Richards MP, Ortmann S, Hohmann G. Identification of energy consumption and nutritional stress by isotopic and elemental analysis of urine in bonobos (*Pan paniscus*). *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2012;26(1):69-77. doi: 10.1002/rcm.5312.

288. Hobson KA, Alisauskas RT, Clark RG. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet. *Condor* 1993;388-94.
289. Chereil Y, Hobson KA, Bailleul F, Groscolas R. Nutrition, physiology, and stable isotopes: new information from fasting and molting penguins. *Ecology* 2005;86(11):2881-8.
290. Guelinckx J, Maes J, Van Den Driessche P, Geysen B, Dehairs F, Ollevier F. Changes in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  in different tissues of juvenile sand goby *Pomatoschistus minutus*: a laboratory diet-switch experiment. *Marine Ecology Progress Series* 2007;341:205-15.
291. Castillo LP, Hatch KA. Fasting increases delta<sup>15</sup>N-values in the uric acid of *Anolis carolinensis* and *Uta stansburiana* as measured by nondestructive sampling. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2007;21(24):4125-8. doi: 10.1002/rcm.3305.
292. Focken U. Stable isotopes in animal ecology: the effect of ration size on the trophic shift of C and N isotopes between feed and carcass. *Isotopes in environmental and health studies* 2001;37(3):199-211. doi: 10.1080/10256010108033296.
293. Zhao L, Schell DM, Castellini MA. Dietary macronutrients influence  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  signatures of pinnipeds: captive feeding studies with harbor seals (*Phoca vitulina*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2006;143(4):469-78.
294. Pearson SF, Levey DJ, Greenberg CH, Martinez Del Rio C. Effects of elemental composition on the incorporation of dietary nitrogen and carbon isotopic signatures in an omnivorous songbird. *Oecologia* 2003;135(4):516-23. doi: 10.1007/s00442-003-1221-8.
295. Gaye-Siessegger J, Focken U, Muetzel S, Abel H, Becker K. Feeding level and individual metabolic rate affect  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values in carp: implications for food web studies. *Oecologia* 2004;138(2):175-83.
296. Gaye-Siessegger J, Focken U, Abel H, Becker K. Starvation and low feeding levels result in an enrichment of  $^{13}\text{C}$  in lipids and  $^{15}\text{N}$  in protein of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Journal of Fish Biology* 2007;71(1):90-100.
297. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, Hedges REM. Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005;19(18):2497-506. doi: 10.1002/rcm.2090.
298. Mekota A-M, Grupe G, Ufer S, Cuntz U. Serial analysis of stable nitrogen and carbon isotopes in hair: monitoring starvation and recovery phases of patients suffering from anorexia nervosa. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006;20(10):1604-10. doi: 10.1002/rcm.2477.
299. O'Connell TC, Kneale CJ, Tasevska N, Kuhnle GG. The diet-body offset in human nitrogen isotopic values: a controlled dietary study. *Am J Phys Anthropol* 2012;149(3):426-34. doi: 10.1002/ajpa.22140.
300. Petzke KJ, Feist T, Fleig WE, Metges CC. Nitrogen isotopic composition in hair protein is different in liver cirrhotic patients. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20(19):2973-8. doi: 10.1002/rcm.2695.
301. Tea I, Martineau E, Antheaume I, Lalande J, Mauve C, Gilard F, Barille-Nion S, Blackburn AC, Tcherkez G.  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  natural isotope abundance reflects breast cancer cell metabolism. *Scientific reports* 2016;6:34251. doi: 10.1038/srep34251.
302. Doucett R, Booth R, Power G, McKinley R. Effects of the spawning migration on the nutritional status of anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*): insights from stable-isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1999;56(11):2172-80.
303. Habran S, Debier C, Crocker DE, Houser DS, Lepoint G, Bouquegneau JM, Das K. Assessment of gestation, lactation and fasting on stable isotope ratios in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Marine Mammal Science* 2010;26(4):880-95.
304. Neuberger FM, Jopp E, Graw M, Puschel K, Grupe G. Signs of malnutrition and starvation--reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair. *Forensic science international* 2013;226(1-3):22-32. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.10.037.
305. Kalhan SC, Savin SM, Adam PA. Estimation of glucose turnover with stable tracer glucose- $^{1-13}\text{C}$ . *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1977;89(2):285-94.

306. Godin JP, Ross AB, Cleroux M, Pouteau E, Montoliu I, Moser M, Kochhar S. Natural carbon isotope abundance of plasma metabolites and liver tissue differs between diabetic and non-diabetic Zucker diabetic fatty rats. *PloS one* 2013;8(9):e74866. doi: 10.1371/journal.pone.0074866.
307. McCue MD, Pollock ED. Stable isotopes may provide evidence for starvation in reptiles. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008;22(15):2307-14.
308. Hatch KA, Sacksteder KA, Treichel IW, Cook ME, Porter WP. Early detection of catabolic state via change in  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of blood proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 1995;212(3):719-26. doi: 10.1006/bbrc.1995.2030.
309. Williams CT, Buck CL, Sears J, Kitaysky AS. Effects of nutritional restriction on nitrogen and carbon stable isotopes in growing seabirds. *Oecologia* 2007;153(1):11-8. doi: 10.1007/s00442-007-0717-z.
310. Kempster B, Zanette L, Longstaffe FJ, MacDougall-Shackleton SA, Wingfield JC, Clinchy M. Do stable isotopes reflect nutritional stress? Results from a laboratory experiment on song sparrows. *Oecologia* 2007;151(3):365-71.
311. Sears J, Hatch SA, O'Brien DM. Disentangling effects of growth and nutritional status on seabird stable isotope ratios. *Oecologia* 2009;159(1):41-8.
312. Robertson KL, Rowland NE, Krigbaum J. Effects of caloric restriction on nitrogen and carbon stable isotope ratios in adult rat bone. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2014;28(19):2065-74.
313. Milanovich JR, Maerz JC. Realistic fasting does not affect stable isotope levels of a metabolically efficient salamander. *Journal of Herpetology* 2013;47(4):544-8.
314. McCue MD. Western diamondback rattlesnakes demonstrate physiological and biochemical strategies for tolerating prolonged starvation. *Physiological and biochemical zoology : PBZ* 2007;80(1):25-34. doi: 10.1086/509057.
315. Herzka SZ, Holt GJ. Changes in isotopic composition of red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae in response to dietary shifts: potential applications to settlement studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2000;57(1):137-47.
316. Varela JL, Ortega A, la Gándara F, Medina A. Effects of starvation on  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in Atlantic bonito, *Sarda sarda* (Bloch, 1793). *Aquaculture Research* 2015;46(8):2043-7.
317. Gorokhova E, Hansson S. An experimental study on variations in stable carbon and nitrogen isotope fractionation during growth of *Mysis mixta* and *Neomysis integer*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 1999;56(11):2203-10.
318. Boag B, Neilson R, Scrimgeour CM. The effect of starvation on the planarian *Arthurdendyus triangulatus* (Tricladida: Terricola) as measured by stable isotopes. *Biology and fertility of soils* 2006;43(2):267-70.
319. Kaufman MR, Gradinger RR, Bluhm BA, O'Brien DM. Using stable isotopes to assess carbon and nitrogen turnover in the Arctic sympagic amphipod *Onisimus litoralis*. *Oecologia* 2008;158(1):11-22.
320. Traugott M, Pázmándi C, Kaufmann R, Juen A. Evaluating  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio analysis to investigate trophic relationships of elaterid larvae (Coleoptera: Elateridae). *Soil Biology and Biochemistry* 2007;39(5):1023-30.
321. Kikuchi E, Takagi S, Shikano S. Changes in carbon and nitrogen stable isotopes of chironomid larvae during growth, starvation and metamorphosis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007;21(6):997-1002.
322. Olive PJ, Pinnegar JK, Polunin NV, Richards G, Welch R. Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journal of Animal Ecology* 2003;72(4):608-17.
323. Schmidt O, Scrimgeour CM, Curry JP. Carbon and nitrogen stable isotope ratios in body tissue and mucus of feeding and fasting earthworms (*Lumbricus festivus*). *Oecologia* 1999;118(1):9-15.
324. Oelbermann K, Scheu S. Stable isotope enrichment ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) in a generalist predator (*Pardosa lugubris*, Araneae: Lycosidae): effects of prey quality. *Oecologia* 2002;130(3):337-44.

325. McCue MD. Endogenous and environmental factors influence the dietary fractionation of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in hissing cockroaches *Gromphadorhina portentosa*. *Physiological and Biochemical Zoology* 2007;81(1):14-24.
326. Grizard J, Dardevet D, Papet I, Mosoni L, Mirand PP, Attaix D, Tauveron I, Bonin D, Arnal M. Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. The involvement of hormones and substrates. *Nutrition research reviews* 1995;8(1):67-91. doi: 10.1079/NRR19950007.
327. Meguid MM, Collier MD, Howard LJ. Uncomplicated and stressed starvation. *The Surgical clinics of North America* 1981;61(3):529-43.
328. McCue MD. *Comparative physiology of fasting, starvation, and food limitation*: Springer, 2012.
329. Hertz E, Trudel M, Cox MK, Mazumder A. Effects of fasting and nutritional restriction on the isotopic ratios of nitrogen and carbon: a meta-analysis. *Ecology and evolution* 2015;5(21):4829-39. doi: 10.1002/ece3.1738.
330. Del Rio CM, Carleton SA. How fast and how faithful: the dynamics of isotopic incorporation into animal tissues. *Journal of Mammalogy* 2012;93(2):353-9.
331. MacAvoy SE, Arneson LS, Bassett E. Correlation of metabolism with tissue carbon and nitrogen turnover rate in small mammals. *Oecologia* 2006;150(2):190-201. doi: 10.1007/s00442-006-0522-0.
332. DeMots RL, Novak JM, Gaines KF, Gregor AJ, Romanek CS, Soluk DA. Tissue–diet discrimination factors and turnover of stable carbon and nitrogen isotopes in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Canadian Journal of Zoology* 2010;88(10):961-7.
333. MacAvoy S, Lazaroff S, Kraeer K, Arneson L. Sex and strain differences in isotope turnover rates and metabolism in house mice (*Mus musculus*). *Canadian Journal of Zoology* 2012;90(8):984-90.
334. Kraeer K, Arneson LS, MacAvoy SE. The intraspecies relationship between tissue turnover and metabolic rate in rats. *Ecological research* 2014;29(5):937-47.
335. Braun A, Auerswald K, Vikari A, Schnyder H. Dietary protein content affects isotopic carbon and nitrogen turnover. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2013;27(23):2676-84.
336. Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia* 1983;57(1):32-7.
337. Ponsard S, Averbuch P. Should growing and adult animals fed on the same diet show different  $\delta^{15}\text{N}$  values? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1999;13(13):1305-10.
338. Del Rio CM, Wolf BO. Mass-balance models for animal isotopic ecology. *Physiological and ecological adaptations to feeding in vertebrates* 2005:141-74.
339. Cantalapiedra-Hijar G, Ortigues-Marty I, Sepchat B, Agabriel J, Huneau J-F, Fouillet H. Diet–animal fractionation of nitrogen stable isotopes reflects the efficiency of nitrogen assimilation in ruminants. *British Journal of Nutrition* 2015;113(7):1158-69.
340. Cheng L, Sheahan A, Gibbs S, Rius A, Kay J, Meier S, Edwards G, Dewhurst R, Roche J. Technical note: nitrogen isotopic fractionation can be used to predict nitrogen-use efficiency in dairy cows fed temperate pasture. *Journal of animal science* 2013;91(12):5785-8.
341. Gaye-Siessegger J, Focken U, Abel H, Becker K. Individual protein balance strongly influences  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Naturwissenschaften* 2004;91(2):90-3.
342. Fuller BT, Fuller JL, Sage NE, Harris DA, O'Connell TC, Hedges RE. Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004;18(23):2889-96.
343. Hobbie EA. Dietary protein content and tissue type control  $^{13}\text{C}$  discrimination in mammals: an analytical approach. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2017;31(7):639-48.
344. Schoeller D, Brown C, Nakamura K, Nakagawa A, Mazzeo R, Brooks G, Budinger T. Influence of metabolic fuel on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of breath  $\text{CO}_2$ . *Biological Mass Spectrometry* 1984;11(11):557-61.
345. Hatch KA, Crawford MA, Kunz AW, Thomsen SR, Eggett DL, Nelson ST, Roeder BL. An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

- and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in hair. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006;20(22):3367-73. doi: 10.1002/rcm.2740.
346. Kurle CM, Koch PL, Tershy BR, Croll DA. The effects of sex, tissue type, and dietary components on stable isotope discrimination factors ( $\Delta^{13}\text{C}$  and  $\Delta^{15}\text{N}$ ) in mammalian omnivores. *Isotopes in environmental and health studies* 2014;50(3):307-21.
347. Wolf N, Newsome SD, Peters J, Fogel ML. Variability in the routing of dietary proteins and lipids to consumer tissues influences tissue-specific isotopic discrimination. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2015;29(15):1448-56. doi: 10.1002/rcm.7239.
348. Bütz DE, Casperson SL, Whigham LD. The emerging role of carbon isotope ratio determination in health research and medical diagnostics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 2014;29(4):594-8.
349. Poupin N. Natural abundances of stable nitrogen isotopes in rats : their variability and application for the study of body nitrogen fluxes and of the metabolic impact of nutritional and pathophysiological conditions using compartmental modeling. *AgroParisTech*, 2013.
350. Estrada-Alcalde I, Tenorio-Guzman MR, Tovar AR, Salinas-Rubio D, Torre-Villalvazo I, Torres N, Noriega LG. Metabolic Fate of Branched-Chain Amino Acids During Adipogenesis, in Adipocytes From Obese Mice and C2C12 Myotubes. *Journal of cellular biochemistry* 2017;118(4):808-18. doi: 10.1002/jcb.25755.
351. Polakof S, Rémond D, David J, Dardevet D, Savary-Auzeloux I. Time-course changes in circulating branched-chain amino acid levels and metabolism in obese Yucatan minipig. *Nutrition* 2017.
352. Walsh RG, He S, Yarnes CT. Compound-specific  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  analysis of amino acids: a rapid, chloroformate-based method for ecological studies. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 2014;28(1):96-108. doi: 10.1002/rcm.6761.
353. Hayes JM. An introduction to isotopic calculations. *Woods Hole Oceanographic Institution*, Woods Hole, MA 2004;2543.



# ANNEXE I

## MESURE DES $\delta^{15}\text{N}$ ET $\delta^{13}\text{C}$ PAR SPECTROMETRIE DE MASSE A RATIO ISOTOPIQUE

La spectrométrie de masse à ratio isotopique est la méthode de référence pour la mesure des  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  en abondance isotopique naturelle (Figure 13). Cette méthode permet de mesurer précisément l'enrichissement en isotope lourd de gaz ( $\text{CO}_2$  ou  $\text{N}_2$ ) obtenu après combustion (et réduction des produits de combustion dans le cas de l'azote) des molécules organiques. Les gaz issus de la combustion sont transportés par un flux d'hélium dans une source d'ionisation où ils acquièrent une charge positive égale à +1 sous l'action d'un bombardement par des électrons à haute énergie. Les gaz ionisés sont accélérés dans un champ électrostatique et séparés dans un champ magnétique en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), ou de leur masse puisque  $z = 1$  pour tous les ions. Dans le cas du  $\text{N}_2$ , les différentes masses valent 28, 29 et 30 correspondant respectivement au  $^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{+1}$ ,  $^{15}\text{N}^{14}\text{N}^{+1}$  et  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^{+}$ . Pour le  $\text{CO}_2$  les masses valent 44 ( $^{12}\text{CO}_2^{+1}$ ) et 45 ( $^{13}\text{CO}_2^{+1}$ ). Dans le champ magnétique, les différents ions suivent une trajectoire en arc de cercle dont le rayon est proportionnel à la racine carrée de leur masse, et sont collectés sur des cibles. Dans le cas de l'azote, la proportion de l'isotope lourd est déterminée en intégrant les signaux obtenus sur les cibles correspondant aux masses 28 et 29. Pour le carbone, la proportion de  $^{13}\text{C}$  est obtenue en intégrant les signaux obtenus sur les cibles correspondant aux masses 44, 45 et 46, cette dernière étant utilisée pour prendre en compte la contribution de l'isotope stable lourd  $^{18}\text{O}$  ce qui permet de corriger la masse 45 pour le  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}$ .

Un analyseur élémentaire (Figure 13a) est souvent utilisé pour la combustion des échantillons et la purification et la séparation des gaz. Dans ce cas-ci, les échantillons ne peuvent qu'être purifiés avant leur introduction dans l'appareil si besoin est. Un système de chromatographie gazeuse (Figure 13b) peut aussi être utilisé pour séparer différents composés dans un mélange, par exemple différents AA dans un hydrolysat de protéines. Ces AA devront préalablement subir une dérivation, une transformation augmentant leur interaction avec la colonne et permettant leur séparation. Plusieurs méthodes de dérivation ayant leurs avantages et leurs inconvénients sont disponibles. Par exemple, la forme *N-pivaloyl, isopropyl ester* a été utilisée à plusieurs reprises dans le contexte de mesures en abondances naturelles (234, 261, 273-275, 301) et, récemment, la dérivation par le chlorofromiate de méthyle s'est avérée simple, rapide et facilitante de l'analyse combinée des  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$ , puisqu'elle ajoute peu de carbone aux AA (352). Les lipides, quant à eux, peuvent être saponifiés et leurs acides gras transformés en esters méthyliques pour séparation par chromatographie gazeuse. Qu'un analyseur élémentaire ou de la chromatographie en phase gazeuse soit utilisé, les échantillons traversent en premier un four où ils subissent une combustion en présence d'oxygène puis un four de réduction permettant de convertir les  $\text{NO}_x$  en  $\text{N}_2$  et l'eau est ensuite éliminée du mélange.

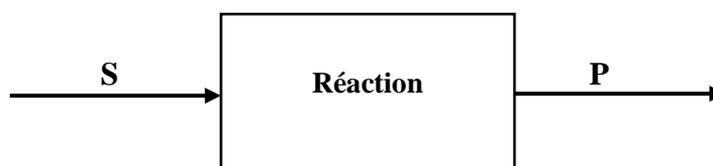
## ANNEXE II

### MODELE GENERAL D'INTERPRETATION DES EFFETS ISOTOPIQUES

*In vivo*, le système est considéré comme ouvert puisqu'il y a entrée et sortie de matière. À l'état d'équilibre (état stable), après la croissance ou le renouvellement complet des tissus suivant un changement de régime ou un nouvel état métabolique, le principe de conservation de la masse peut être appliqué ( $S_{entrant} = P_{sortant}$ ) de telle sorte que  $\delta_s$  et  $\delta_p$  sont liés comme suit puisque les flux peuvent être exprimés sous forme d'un ratio ( $f$ ) :

$$\delta_{total} = \delta_p f + \delta_s (1-f)$$

Où  $\delta_{total}$  est la composition isotopique de l'ensemble du système et  $f$  est la proportion de P par rapport à S ou la fraction du substrat non utilisé.



Utilisant la définition de  $\alpha$  ci-dessus, les équations suivantes peuvent être obtenues pour décrire  $\delta_p$  et  $\delta_s$  (353) :

$$\delta_p = \frac{\delta_{total} - (1-f)\epsilon}{\alpha(1-f) + f}$$

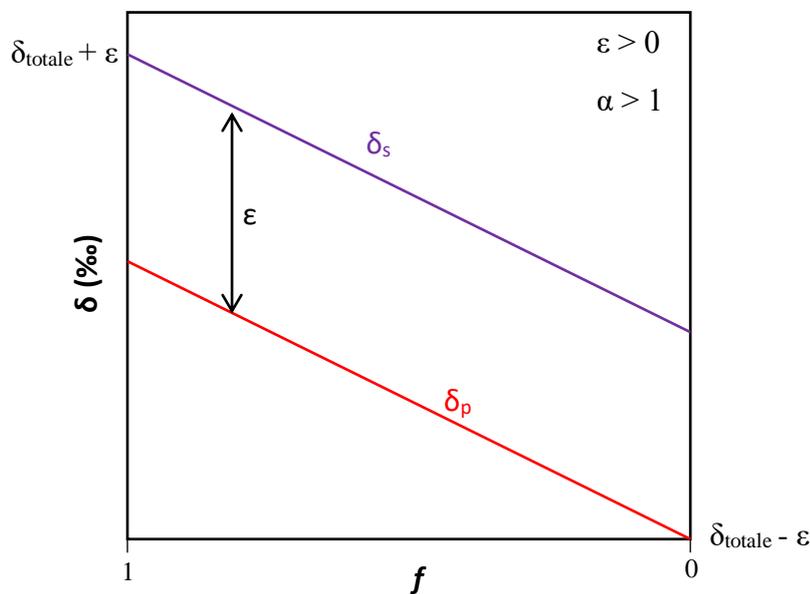
$$\delta_s = \frac{\alpha\delta_{total} + f\epsilon}{\alpha(1-f) + f}$$

Sous l'approximation que  $\alpha = 1$ , la relation devient linéaire telle que :

$$\delta_s = \delta_{total} + f\epsilon$$

$$\delta_p = \delta_{total} - (1-f)\epsilon$$

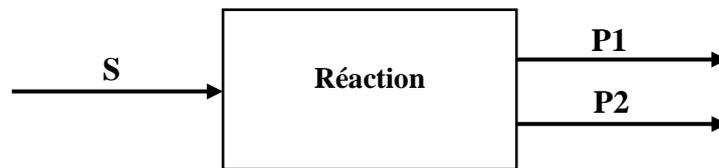
L'erreur introduite par cette approximation est fonction de  $\alpha$  et donc souvent assez minime (mais pas pour l'hydrogène en raison d'importants effets isotopiques (353)). La figure ci-bas démontre l'évolution de  $\delta_p$  et  $\delta_s$  en fonction de  $f$  pour un effet isotopique quelconque, favorisant le départ de l'isotope léger du réactif lors d'une telle réaction unidirectionnelle dans un système ouvert à l'équilibre (ou lors d'une réaction à l'équilibre dans un système fermé où les mêmes équations s'appliquent).



**Schéma de l'évolution des compositions isotopiques d'un substrat ( $\delta_s$ ) et du produit ( $\delta_p$ ) lors d'une réaction unidirectionnelle à l'équilibre dans un système ouvert ( $S_{entrant} = P_{sortant}$ ). Cette réaction favorise le départ de l'isotope léger du substrat ( $\epsilon > 0$  et  $\alpha > 1$ ).  $f$  est la fraction du substrat non utilisé ou P/S.**

Ces équations peuvent être adaptées pour analyser des embranchements métaboliques tel que décrit par Hayes (222), où, par exemple, comme illustré ci-dessous, un substrat S à deux devenir métaboliques P1 et P2 avec des effets isotopiques respectifs  $\epsilon_1$  et  $\epsilon_2$ . Dans ce cas,  $f$  deviendrait P1/S et  $\delta_s$  serait l'équivalent de  $\delta_{total}$  et  $\delta_{P1}$  et  $\delta_{P2}$  de  $\delta_s$  et  $\delta_p$  dans les équations

précédentes. Dans un contexte physiologique, S pourrait représenter les AA d'un tissu utilisés pour la synthèse protéique (P1) ou oxydés (P2).



L'application de ces principes a permis le développement d'un modèle multitissu et multicompartiment d'interprétation de modulations nutritionnelle ou physiopathologique des flux complexes de l'azote en fonction des variations des  $\delta^{15}N$  des protéines tissulaires (225).

**Titre :** Une nouvelle approche d'isotopomique pour identifier les dysrégulations du métabolisme des protéines et des acides aminés lors du développement du syndrome métabolique

**Mots clés :** Abondances isotopiques naturelles de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) – métabolisme des protéines et des acides aminés – syndrome métabolique – synthèse protéique –  $\text{D}_2\text{O}$

**Résumé :** Si les différentes composantes du syndrome métabolique (SM) sont susceptibles d'affecter le métabolisme protéique et des acides aminés (AA), les données disponibles sont peu nombreuses et souvent contradictoires, du fait de l'hétérogénéité de présentation de ce syndrome et des limites des approches classiques d'investigation du métabolisme azoté. Ce travail de thèse met à profit une nouvelle approche isotopomique, s'appuyant sur la mesure de l'abondance naturelle des isotopes stables de l'azote ( $\delta^{15}\text{N}$ ) et du carbone ( $\delta^{13}\text{C}$ ) dans les protéines et AA tissulaires pour identifier les altérations du métabolisme protéique survenant lors de l'induction nutritionnelle d'un SM chez le rat. Nos résultats permettent dans un premier temps de valider expérimentalement les prédictions d'un modèle multi-compartimental développé dans le laboratoire et montrant que les  $\delta^{15}\text{N}$  reflètent l'orientation différentielle des AA entre les voies anaboliques (protéosynthèse) et cataboliques (oxydation). Nous avons également montré que sous certaines conditions, les  $\delta^{13}\text{C}$  permettent d'estimer la part des carbones des AA et protéines tissulaires provenant respectivement des protéines, glucides et lipides

alimentaires, renseignant ainsi sur la flexibilité métabolique des individus. Les mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  dans les protéines et AA, seules ou combinées à la mesure des taux de synthèse protéique après administration d'eau deutérée, nous ont ensuite permis de mettre en évidence les modifications du métabolisme protéique et des AA survenant lors de l'exposition périnatale et post-sevrage à un régime gras et sucré, ainsi que celles associées à des différences de sensibilité individuelles à l'induction d'un syndrome métabolique par ce même type de régime. Ces altérations sont tissu-spécifiques et diffèrent selon qu'elles proviennent uniquement de différences de sensibilité individuelle au régime ou qu'elles sont également attribuables à des différences d'équilibre glucido-lipidique dans l'alimentation. L'ensemble de nos résultats montrent que l'apparition d'un SM est associée à des réorientations du métabolisme des AA entre les voies anaboliques et d'oxydation, affectant de façon différente le foie, le muscle, l'intestin et le tissu adipeux, et à une altération de la flexibilité métabolique dans le muscle. Ces travaux ouvrent la voie à des études chez l'Homme, s'appuyant sur les mesures de  $\delta^{15}\text{N}$  et  $\delta^{13}\text{C}$  dans des pools accessibles.

**Title :** A new isotopic approach for identifying the dysregulations of protein and amino acid metabolism during the development of the metabolic syndrome

**Keywords :** Natural isotopic abundances of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) – Protein and amino acid metabolism – Metabolic syndrome – protein synthesis –  $\text{D}_2\text{O}$

**Abstract :** Although the different components of the metabolic syndrome (MS) are likely to affect protein and amino acid (AA) metabolism, the available data are few and often contradictory, due to the heterogeneity of presentation of this syndrome and the limitations of classical approaches to investigate nitrogen metabolism. The present thesis work uses a novel isotopic approach, based on the measurement of the natural abundance of stable isotopes of nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) and carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) in tissue proteins and AA to identify alterations in protein metabolism occurring during the nutritional induction of MS in rats. Our results allow to validate experimentally the predictions of a multi-compartmental model developed in the laboratory and showing that the  $\delta^{15}\text{N}$  reflects the differential orientation of AA between anabolic (proteosynthesis) and catabolic (oxidation) pathways. We have also shown that under certain conditions, the  $\delta^{13}\text{C}$  can allow to estimate the proportion of carbons in AA and tissue proteins issuing from dietary proteins, carbohydrates and lipids respectively, thus providing information

on the metabolic flexibility of individuals. The measurements of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in proteins and AA, alone or combined with the measurement of protein synthesis rates after administration of deuterated water, then allowed us to highlight the changes in protein and AA metabolism occurring during perinatal and post-weaning exposure to a high-fat high-sugar diet, as well as those associated with individual differences in sensitivity to the induction of a MS by the same kind of diet. These alterations are tissue-specific and differ according to whether they result solely from differences in individual sensitivity to diet or whether they are also attributable to differences in the carbohydrate/lipid balance of the diet. Altogether, our results show that the development of MS is associated with changes in AA metabolic partitioning between the anabolic and oxidative pathways, differently affecting the liver, muscle, intestine and adipose tissue, and with an altered metabolic flexibility in muscle. This work opens the way to human studies, based on the measurements of  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in accessible pools.