



HAL
open science

Rôle des acides aminés dans la limitation de l'adiposité sous régime hyperprotéique.

Tristan Chalvon-Demersay

► **To cite this version:**

Tristan Chalvon-Demersay. Rôle des acides aminés dans la limitation de l'adiposité sous régime hyperprotéique.. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLA018 . tel-02303251

HAL Id: tel-02303251

<https://theses.hal.science/tel-02303251>

Submitted on 2 Oct 2019

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.

Numéro NNT : 2016SACLA018

Thèse de doctorat
de
L'Université Paris-Saclay
préparée à
L'Institut des Sciences et Industries du vivant et de
l'Environnement (AgroParisTech)

Ecole Doctorale n°581
ABIES (Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement, Santé)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Nutrition

Par
Mr. Tristan Chalvon Demersay

**Rôle des acides aminés dans la limitation de l'adiposité sous régime
hyperprotéique**

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 24 Novembre 2016 :

Composition du Jury :

| | |
|--|---------------------|
| Mme Tesseraud Sophie , Directrice de recherche, UR83, INRA | Rapporteur |
| Mr Noirez Philippe , MCU, IRMES, Université Paris Descartes | Rapporteur |
| Mme Leturque Armelle , Directrice de recherche, UMRS1138, CRC | Examinateur |
| Mr Tomé Daniel , Professeur, UMR914, AgroParisTech-INRA | Président du jury |
| Mme Azzout-Marniche Dalila , MC, UMR914, AgroParisTech-INRA | Directrice de thèse |
| Mr Even Patrick , Chargé de recherche, UMR914, AgroParisTech-INRA | Invité |
| Mr Fafournoux Pierre , Directeur de recherche, UMR1019, INRA | Invité |
| Mr Foretz Marc , Chargé de recherche, U1016, INSERM | Invité |
| Mr Bouthegourd Jean-Christophe , Docteur, Nestlé | Invité |

Titre : Rôle des acides aminés dans la limitation de l'adiposité sous régime hyperprotéique.

Mots clés : Nutrition-Acide aminé-Calorimétrie indirecte-AMPK-GCN2-FGF21

Résumé : Plusieurs études ont montré que certaines kinases situées dans le foie, « *mammalian target of rapamycin* » (mTOR), « *adenosine monophosphate-activated protein kinase* » (AMPK) et « *general control non-depressible kinase 2* » (GCN2) répondent à la disponibilité en acides aminés.

L'objectif de nos études a été de préciser le rôle de deux de ces voies, l'AMPK et GCN2, dans les adaptations du métabolisme énergétique et de la synthèse protéique en réponse aux variations en protéines du régime. Pour cela, des souris de type sauvage et des souris KO n'exprimant plus la voie AMPK ou GCN2 dans le foie ont été nourries pendant trois semaines avec un régime faible, normal ou fort en protéines. Les analyses ont montré que les souris KO-AMPK foie spécifique et nourries sous régime normoprotéique adaptent leur métabolisme hépatique notamment en sécrétant le facteur fibroblastique FGF21 ce qui leur permet de compenser l'absence d'AMPK et de présenter des profils d'oxydation normaux.

Au contraire, les souris KO-AMPK foie spécifique nourries avec des régimes faibles ou forts en protéines présentent des altérations des profils d'oxydation des lipides et des glucides liées à une absence de modification du métabolisme hépatique.

La délétion de GCN2 dans le foie, quant à elle, n'a d'effet que sous régime faible en protéines : les souris KO-GCN2 foie spécifique présentent une plus faible oxydation lipidique et une plus forte oxydation glucidique que les souris sauvages en période postprandiale dû à l'absence d'induction de la sécrétion de FGF21.

Concernant le métabolisme des protéines, les kinases GCN2 et AMPK ne semblent pas impliquées dans l'intensité du flux de synthèse protéique dans le foie et en périphérie dans le muscle en période postprandiale.

En conclusion, ces travaux montrent que les délétions de l'AMPK et de GCN2 hépatiques affectent le métabolisme énergétique mais pas le métabolisme protéique et que les conséquences dépendent de la composition du régime.

Title : Role of dietary amino acids in the limitation of adiposity under a high protein diet.

Keywords : Nutrition-Amino acid-Indirect calorimetry-AMPK-GCN2-FGF21

Abstract : Several studies have reported that some kinases located in the liver respond to the availability of amino acids. These kinases are mammalian target of rapamycin (mTOR), "adenosine monophosphate-activated protein kinase" (AMPK) and "general control non-depressible kinase 2" (GCN2).

The aim of our study was to clarify the role of two of these signaling pathways, AMPK and GCN2 in the adaptations of energy and protein metabolism in response to the modulation of dietary protein content. Wild-type and liver AMPK-deficient or liver GCN2-deficient mice were fed either a low, a normal or high protein diet during three weeks. Analyses showed that liver AMPK-deficient mice fed under a normo-protein diet exhibit an adaptation of liver metabolism and secrete FGF21 which enables them to have normal postprandial oxidation profiles.

In contrast, liver AMPK-deficient mice fed a low or a high protein diet exhibit an alteration in postprandial oxidation profiles. The deletion of GCN2 in the liver only has an effect under low protein diet as liver GCN2 deficient mice have a lower lipid oxidation and a higher carbohydrate oxidation linked to the absence of FGF21 secretion. Concerning protein metabolism, AMPK and GCN2 do not seem to be involved in protein synthesis rate in the postprandial period in the liver and periphery in the postprandial muscle. In conclusion, these studies show that hepatic AMPK and GCN2 deletions affect energy metabolism, but not protein metabolism and that the consequences depend on diet composition.

Remerciements

Cette thèse a été effectuée dans l'UMR 914 INRA/AgroParisTech « Physiologie de la nutrition et du comportement alimentaire » grâce à une bourse de l'école doctorale ABIES.

Je souhaite tout d'abord remercier Philippe Noirez et Sophie Tesseraud pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, Armelle Leturque pour avoir accepté d'être examinateur et enfin Marc Foretz, Pierre Fafournoux et Jean-Christophe Bouthegourd pour avoir accepté de siéger dans le jury en tant qu'invités.

Je souhaite ensuite remercier Daniel Tomé, Gilles Fromentin et Claire Gaudichon de m'avoir accueilli dans l'équipe 2 de l'unité Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire. Daniel, merci aussi de m'avoir permis d'être ta doublure lors du congrès AgroBioTech en Espagne et de m'avoir confié la revue systématique demandée par Nestlé, deux travaux dont je suis particulièrement fier.

Je souhaite ensuite adresser mes remerciements à mes deux co-directeurs de thèse : Patrick Even et Dalila Azzout-Marniche pour la confiance qu'ils ont su m'accorder depuis maintenant presque trois ans et demi lorsqu'ils m'ont choisi pour défendre le projet de thèse auprès de l'école doctorale ABIES.

Je n'ai jamais osé vous tutoyer, préférant garder un lien hiérarchique quelque peu suranné, mais maintenant, je crois que le temps est venu de le faire.

Donc Patrick, même si parait-il tu n'as pas remarqué que je continuais de te vouvoyer, merci de ton soutien et de ta disponibilité tout au long de ces trois ans de thèse. Ton esprit scientifique et ton humilité ont été des modèles pour moi.

Dalila, merci pour ton encadrement et pour avoir partagé tes connaissances. Merci aussi de m'avoir soutenu dans les moments un peu plus difficile de la thèse. Nos débats sur l'interprétation des résultats ont souvent été houleux mais m'ont toujours permis de murir ma science.

Je tiens ensuite à remercier Catherine, mère du mouvement « chloroforme pour tous », tu as su me convaincre tous les jours des limites du communisme. Merci pour cela. Merci également pour ton aide concernant toutes les manipulations. Merci pour tes remarques sur ma façon de ranger la paillasse qui m'ont toujours donné l'impression que je n'étais jamais loin du domicile familial.

Un grand merci à Julien également, merci pour ton aide sur les manip à la paillasse et les abattages, sans toi, je serais probablement à cette heure-ci en train de faire des PCR sur le foie.

Je suis particulièrement reconnaissant envers Nadia Khodorova pour m'avoir formé à la mesure des flux de synthèse protéique et de m'avoir permis de m'entretenir physiquement lors des changements de bouteille de gaz.

Je souhaite également remercier les personnes m'ayant aidé tant sur la paillasse qu'à l'animalerie : Véronique, Annaïg, Mireille, Morgane, Vanessa, Angélique ainsi que mes stagiaires : Coraline, Lucas, Alexandra et plus particulièrement Alice (AKA P'tit Bonhomme), Joanna (AKA Jojo's) et Morgane.

Merci aux membres de l'équipe « Gènes, nutriments et fer » de Cochin, Marc Foretz et Benoit Viollet, pour votre aide concernant les protocoles et pour la mise à disposition du modèle KO-AMPK foie spécifique.

De même, merci à Anne-Catherine Maurin et Pierre Fafournoux pour leur aide et de nous avoir donné des reproducteurs afin de générer notre modèle de souris KO-GCN2 foie spécifique.

Jean-Christophe, tu nieras probablement toute responsabilité, mais merci de m'avoir accordé ta confiance au bon moment et de m'avoir permis de mener à bien les différents projets que j'ai entrepris. Merci également d'avoir accepté d'être mon mentor pour le parcours « Docteurs pour l'Entreprise ».

Un grand merci aux doctorants pour les moments et les gâteaux partagés. Merci Martin de m'avoir motivé, merci Gabrielle de m'avoir amusé, merci Simon de m'avoir apaisé, merci Clélia de m'avoir materné, merci Ambre de m'avoir permis de me servir dans tes placards (ça mérite bien une petite bière), merci Marion O. de m'avoir dénoncé. Un grand merci également à Caroline, Olga Sandra et Marion J. également.

Merci aux autres membres du laboratoire que je n'ai pas mentionné pour cette expérience forte et formatrice qu'est la thèse.

Je tiens enfin à remercier ma famille, mes amis et autres proches pour leur soutien depuis le début de cette thèse ou pendant quelques semaines.

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1: Les 20 acides aminés protéinogènes | 13 |
| Figure 2: Les principales étapes du processus digestif..... | 15 |
| Figure 3: Cinétique d'apparition dans le plasma de la leucine à la suite d'un repas à base de caséine (CAS) ou de protéines du lactosérum (WP) (Boirie et al., 1997)..... | 17 |
| Figure 4: Réactions de désamination et de transamination | 19 |
| Figure 5: Destinée des squelettes carbonés | 21 |
| Figure 6: Turnover protéique | 23 |
| Figure 7: Schéma explicatif de l'étape d'initiation de la traduction protéique et de sa régulation (Chotechuang, 2010) | 27 |
| Figure 8: Schéma explicatif de l'étape d'élongation et de terminaison (Chotechuang, 2010) | 29 |
| Figure 9: Les trois processus de l'autophagie | 31 |
| Figure 10: Rôle de l'AMPK dans le métabolisme énergétique et la synthèse protéique | 40 |
| Figure 11: Conséquences de la déficience en un acide aminé sur la phosphorylation d'eIF2 α (Palii et al., 2009). | 46 |
| Figure 12: Corrélation entre l'évolution de la quantité de protéines dans le régime entre 1970 et 2000 et la prévalence de l'obésité chez l'adulte en 2000 dans 13 pays (Simpson and Raubenheimer, 2005)..... | 49 |
| Figure 13: Masse grasse totale chez des rats nourris en régime normoprotéique (NP), hyperprotéique (HP) ou en normoprotéique pair-fed (NP-PF) (Jean et al., 2001)..... | 55 |
| Figure 14: Prise alimentaire sous régime témoin (C) et sous régime faible en protéines (LP) chez le rat en croissance (Aparecida de França et al., 2009)..... | 62 |
| Figure 15: Effets des régimes faible et fort en protéines..... | 64 |
| Figure 16: Les différents rôles de FGF21(Gimeno and Moller, 2014) | 64 |
| Figure 17: Abondance des isoformes α 1 et α 2 dans le foie de souris sauvages ou KO nourries sous régime normal (NP), faible (LP) ou fort (HP) en protéines..... | 69 |
| Figure 18: Création du modèle KO-GCN2 foie spécifique..... | 71 |
| Figure 19: Protocole expérimental des deux études | 72 |
| Figure 20: Modèle à deux compartiments utilisés pour les mesures in vivo des taux de synthèse protéique | 76 |
| Figure 21: Schéma expérimental utilisé dans l'article IV | 150 |
| Figure 22: Conséquences de la délétion de l'AMPK dans le foie et rôle de FGF21 | 177 |
| Figure 23: Conséquences de la délétion de GCN2 dans le foie et rôle de FGF21 | 177 |

Liste des tables

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Contribution des différents types cellulaires à la structure du foie (Gebhardt, 1992) | 18 |
| Tableau 2: Effet des différents stimuli nutritionnels ou hormonaux sur l'activité de l'AMPK..... | 43 |
| Tableau 3: Tableau de la composition des régimes utilisés dans notre étude | 72 |

Liste des abréviations

| | | | |
|----------------|--|-----------------|---|
| 4E-BP1 | eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 | IGF1 | insulin-like growth factor |
| AA | acide aminé | IMC | indice de masse corporelle |
| ACC | acetyl-CoA carboxylase | IRS1 | insulin receptor substrate 1 |
| AGrP | agouti-related peptide | LP | hypoprotéique |
| AICAR | 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide | LP-HC | hypoprotéique hyperglucidique |
| AMPK | AMP-activated kinase | LPL | lipoprotein lipase |
| ATF | activating transcription factor | MCD | malonyl-CoA decarboxylase |
| ATF4 | activating transcription factor 4 | MOR | mu opioid receptor |
| ATGL | adipose triglyceride lipase | mTOR | mammalian target of rapamycin |
| CaMKK2 | ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 | NO | monoxyde d'azote |
| CCK | cholécystokinine | NP | normoprotéique |
| CHOP | CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein | NP-NC | normoprotéique normoglucidique |
| Chrebp | carbohydrate-responsive element-binding protein | NPY | neuropeptide Y |
| CMA | chaperone-mediated autophagy | p70S6K1 | 70-kDa ribosomal protein S6 kinase 1 |
| CPT-1 | carnitine palmitoyl transferase 1 | PEPCK | phosphoénolpyruvate carboxykinase |
| CREB | cyclic-AMP response element binding protein | PFK | Phosphofructokinase |
| CRH | corticotropin releasing hormone | PGC1 | PPAR gamma coactivator 1 |
| deptor | DEP domain-containing mTOR-interacting protein | POMC | pro-opiomélanocortine |
| eEF | eukaryotic elongation factor 2 | PPAR | peroxisome proliferator activated receptor |
| eIF | eukaryotic Initiation Factor | pras40 | 40kDa proline-rich Akt substrate |
| eIF2AK4 | general control non-derepressible 4 | PYY | peptide YY |
| eRF | eukaryotic release factors | RHEB | ras homolog enriched in brain |
| FAS | fatty acid synthase | SCD | stearoyl-Coenzyme A desaturase |
| FGF21 | fibroblast growth factor 21 | SLC | solute carrier |
| G6Pase | glucose-6-phosphatase | SREBP1-c | sterol regulatory element-binding protein 1-c |
| GCN2 | general control non-derepressible 2 | TAK1 | TGF-beta activated kinase 1 |
| GCN4 | general control non-derepressible 4 | TNF | tumor necrosis factor |
| GLP-1 | glucagon-like peptide-1 | TORC2 | CREB regulated transcription coactivator 2 |
| GLUT4 | solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), 4 | TSC | tuberous sclerosis |
| GPAT | glycerol-3-phosphate acyltransferase, | UCP | uncoupling protein |
| HMG-CoA | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A | | |
| HP | hyperprotéique | | |
| HP-LC | hyperprotéique hypoglucidique | | |
| HSL | hormone sensitive lipase | | |

Table des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements..... | 2 |
| Liste des figures | 5 |
| Liste des tables..... | 5 |
| Liste des abréviations..... | 6 |
| Table des matières..... | 7 |
| 1 Publications et communications..... | 9 |
| 1.1 Publications en premier auteur | 9 |
| 1.2 Autres publications..... | 10 |
| 1.3 Communications en premier auteur..... | 10 |
| Introduction générale | 11 |
| Chapitre I : Introduction bibliographique..... | 12 |
| 1 Les acides aminés, des nutriments et des molécules « signal »..... | 12 |
| 1.1 Généralités..... | 12 |
| 1.2 Turnover, besoin et qualité des protéines | 22 |
| 1.3 Synthèse et catabolisme des protéines | 26 |
| 1.4 Les acides aminés : des molécules « signal »..... | 34 |
| 2 Modulation du niveau d'apport en acides aminés et conséquences sur la composition corporelle | 48 |
| 2.1 Partie introductive | 48 |
| 2.2 Régime fort en protéines et conséquences sur la composition corporelle | 51 |
| 2.3 Régime faible en protéines et conséquences sur la composition corporelle | 61 |
| Chapitre II : Travaux de thèse..... | 67 |
| 1 Justification des travaux et objectifs des études | 67 |
| 2 Rappel méthodologique | 69 |
| 2.1 Modèle expérimental: les souris KO | 69 |
| 2.2 Protocole expérimental..... | 72 |
| 2.3 Calorimétrie indirecte | 73 |
| 2.4 Mesure des flux de synthèse protéique tissulaires | 76 |
| 2.5 Autres techniques utilisées | 78 |
| 3 Travail personnel..... | 80 |

| | | |
|---|--|-----|
| 3.1 | Article I: Un régime faible en protéine augmente tandis qu'un régime fort en protéines diminue la production hépatique de FGF21 mais le glucose et pas les acides aminés, stimule l'expression de FGF21 dans des hépatocytes en culture..... | 80 |
| 3.2 | Article II : La modulation du rapport glucide/protéine modifie le profil d'oxydation en période postprandiale de souris n'exprimant pas l'AMPK dans le foie | 90 |
| 3.3 | Article III : La baisse du contenu en protéines du régime conduit à une modification du profil d'oxydation dans le foie de souris n'exprimant pas GCN2 dans le foie | 125 |
| 3.4 | Article IV : L'intensité de la synthèse protéique en période postprandiale est modulée par le niveau d'apport en protéines mais n'implique pas les kinases GCN2 et AMPK..... | 149 |
| Chapitre III : Discussion générale et conclusions | | 167 |
| 1 | Les effets de la modulation de la quantité de protéines dans le régime sur la composition corporelle, le métabolisme énergétique et protéique et rôle de FGF21 dans les orientations métaboliques | 168 |
| 1.1 | Quantité de protéines dans le régime et composition corporelle et métabolisme énergétique..... | 168 |
| 1.2 | Quantité de protéines dans le régime et métabolisme protéique..... | 169 |
| 1.3 | Implication de FGF21 dans les effets des régimes faibles et forts en protéines | 170 |
| 2 | Rôle des voies GCN2 et AMPK hépatiques dans le contrôle du métabolisme énergétique et la prise alimentaire..... | 171 |
| 2.1 | Rôle de l'AMPK hépatique dans le contrôle du métabolisme énergétique et la prise alimentaire | 171 |
| 2.2 | Rôle de GCN2 hépatique dans le contrôle du métabolisme énergétique et la prise alimentaire..... | 172 |
| 3 | Rôle des voies GCN2 et AMPK dans le contrôle de la synthèse protéique | 174 |
| 4 | Place du foie dans les phénomènes adaptatifs..... | 175 |
| 5 | Conclusions et perspectives | 176 |
| Bibliographie..... | | 179 |

1 Publications et communications

1.1 Publications en tant que premier auteur

- *Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes*

Article publié dans the Journal of Nutritional Biochemistry

Tristan Chalvon-Demersay, Patrick C. Even, Daniel Tomé, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, and Dalila Azzout-Marniche

- *Modification of dietary carbohydrate to protein ratio reveals an alteration in postprandial oxidation pattern in liver AMPK-deficient mice*

Article soumis dans Cell Reports le 23/09/2016

Tristan Chalvon-Demersay, Patrick C. Even, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Benoit Viollet, Claire Gaudichon, Daniel Tomé, Marc Foretz and Dalila Azzout-Marniche

- *Effects of plant vs animal based proteins on the parameters of the metabolic syndrome: a systematic review*

Article soumis dans the Journal of Nutrition le 10/08/2016

Tristan Chalvon-Demersay, Dalila Azzout-Marniche, Denis Breuille, Léonie Egli, Leonidas Karagounis, Judith Arfsten, Daniel Tomé

- *Decreasing dietary protein content leads to changes in postprandial oxidation profile in liver GCN2 deficient mice*

Article en cours de rédaction

Tristan Chalvon-Demersay, Joanna Moro, Patrick C. Even, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Anne-Catherine Maurin, Claire Gaudichon, Daniel Tomé, Pierre Fafournoux and Dalila Azzout-Marniche

- *The role of hepatic AMPK and GCN2 in the control of protein synthesis under different protein diets*

Article en cours de rédaction

Tristan Chalvon-Demersay, Claire Gaudichon, Patrick C. Even, Nadezda Khodorova, Julien Piedcoq, Benoit Viollet, Anne-Catherine Maurin, Daniel Tomé, Marc Foretz, Pierre Fafournoux and Dalila Azzout-Marniche

1.2 Autres publications

- *Obesity-prone high-fat fed rats reduce caloric intake and adiposity and gain more fat-free mass when allowed to self-select protein from carbohydrate/fat intake*
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 310: R1169–R1176, 2016
Dalila Azzout-Marniche, **Tristan Chalvon-Demersay**, Gregory Pimentel, Catherine Chaumontet, Nachiket Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Claire Gaudichon, Daniel Tomé, and Patrick Even
- *Rats prone to obesity under a high-carbohydrate diet have increased post-meal CCK mRNA expression and characteristics of rats fed a high-glycemic index diet*
Front. Nutr. 2:22.
Catherine Chaumontet, Dalila Azzout-Marniche, Anne Blais, **Tristan Chalvon-Demersay**, Nachiket A Nadkarni, Julien Piedcoq, Gilles Fromentin, Daniel Tome, Patrick Christian Even

1.3 Communications en tant que premier auteur

- *Deletion of Hepatic AMPK Leads to Metabolic Inflexibility in Low- and High-Protein Diets but Not in Normo-Protein Diet.* Experimental Biology Annual Meeting, 2016, San Diego, USA (Poster)
- *Dietary Carbohydrates but Not Proteins Are the Main Nutritional Determinant of FGF21 Production in Mice.* Experimental Biology Annual Meeting, 2016, San Diego, USA (Poster)
- *Une augmentation des capacités digestives de l'amidon chez le rat pourrait favoriser l'accumulation de la graisse viscérale.* AFERO, 2016, Paris, France (Poster)
- *FGF21 ne semble pas impliqué dans les effets amaigrissants des régimes hyperprotéiques.* AFERO, 2016, Paris, France (Poster)
- *New perspectives on protein biosynthesis,* AgroBioTech, 2015, Ourense, Spain (Oral)
- *L'AMPK hépatique, un acteur central de la flexibilité métabolique en réponse à l'ingestion de régimes avec différentes teneurs en protéines.* Journées Francophones de Nutrition, 2015, Marseille, France (Poster)
- *Le rôle de FGF21 dans les adaptations métaboliques au contenu protéique du régime.* Journées Francophones de Nutrition, 2015, Marseille, France (Poster)
- *Hepatic AMPK and its role in energy metabolism under high-protein diet.* FENS, 2015, Berlin, Germany (Poster)
- *The role of hepatic AMPK in metabolic adaptation under high-protein diet.* Experimental Biology Annual Meeting, 2015, Boston, USA (Poster)

Introduction générale

Les protéines corporelles subissent un renouvellement permanent permettant à l'organisme de s'adapter aux différentes circonstances nutritionnelles et physiopathologiques. Ce renouvellement est garanti par deux processus antagonistes : la synthèse et le catabolisme protéique. L'apport en protéines alimentaires module l'intensité de ces deux processus mais a aussi des conséquences sur le métabolisme énergétique (Chotechuan et al., 2009; Chotechuan, 2010). En effet, il a été montré que l'augmentation des protéines dans le régime aux dépens des sucres permet de diminuer la prise alimentaire, la prise de masse grasse, la lipogénèse hépatique, la cholestérolémie et la tension artérielle et d'augmenter la néoglucogénèse et la cétoxygénèse tout en améliorant l'homéostasie glucidique et la composition corporelle (Altorf-van der Kuil et al., 2010; Azzout-Marniche et al., 2006; Blouet et al., 2006; Jean et al., 2001; Obeid et al., 2006; Pichon et al., 2006; Veldhorst et al., 2012; Westerterp, 2004). La consommation d'un régime faible en protéines, au contraire, tend à augmenter la prise alimentaire, l'adiposité, la lipogénèse hépatique ainsi que la dépense énergétique (Huang et al. 2013; Aparecida de França et al. 2009; C. Morrison et Laeger 2015). Le foie a un rôle particulièrement central dans les adaptations du métabolisme énergétique en réponse aux variations de la disponibilité en acides aminés alimentaires. Il a notamment été montré que certaines kinases du foie impliquées dans le contrôle du métabolisme énergétique modulent leur activité en fonction de cette disponibilité. Ces kinases, véritables voies de signalisation des acides aminés, sont au nombre de trois : « *mammalian target of rapamycin* » (mTOR), « *adenosine monophosphate-activated protein kinase* » (AMPK) et « *general control non-depressible kinase 2* » (GCN2). Lorsque la disponibilité en acides aminés augmente, la phosphorylation de la voie mTOR augmente tandis que celle de l'AMPK et de GCN2 diminue dans le foie (Chotechuan et al., 2009).

L'objectif de cette thèse est de déterminer le rôle de deux de ces voies de signalisation, AMPK et GCN2, dans les adaptations du métabolisme énergétique et protéique en réponse aux variations en protéines du régime alimentaire. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles de souris génétiquement modifiées n'exprimant pas les deux isoformes de la sous-unité catalytique α de l'AMPK ou GCN2 dans le foie. Ce manuscrit commence par une introduction bibliographique qui dans une première partie rappelle le métabolisme des protéines, le rôle des voies de signalisation des acides aminés dans le métabolisme énergétique, la prise alimentaire et le contrôle du métabolisme protéique et dans une seconde partie les conséquences sur la composition corporelle de la modulation de l'apport en acides aminés et les mécanismes sous-jacents. L'introduction est suivie d'un chapitre méthodologique sur les outils utilisés dans nos études puis des quatre articles directement en relation avec le sujet. Enfin, la dernière partie s'attache à discuter et mettre en perspective les résultats obtenus.

Chapitre I : Introduction bibliographique

1 Les acides aminés : nutriments et molécules « signal »

1.1 Généralités

1.1.1 Source des protéines

1.1.1.1 Consommation actuelle et source exogène des protéines

Protéines provient du grec “*proteios*” qui signifie primordial. Ces biopolymères d’acides aminés constituent avec les glucides et les lipides, les trois macronutriments indispensables à la vie. La consommation actuelle de protéines au niveau mondial se situe entre 75 et 80 grammes par jour et par personne. Les protéines alimentaires proviennent de sources végétales et animales. Suivant les différentes régions du globe, la contribution relative des protéines végétales (blé, riz, maïs, orge, millet, sorgho, avoine, seigle, tubercule, légumineuse) et animales à l’apport total en protéines varient fortement. Ainsi en Europe et aux Etats-Unis, les protéines végétales n’interviennent que pour 30% de l’apport global quand ce pourcentage monte entre 80 et 90% en Asie et en Afrique (Cayot et al., 1997). Par ailleurs, ces différences ont tendance à s’accroître. En effet, entre 1961 et 2009, la consommation de protéines animales a augmenté de 40 à 60 g dans les pays développés alors qu’elle est restée stable dans les pays les plus pauvres. La consommation de protéines végétales est quant à elle restée relativement stable (Combris and Martin, 2013).

Actuellement, l’apport recommandé en protéines est de 0.83 g/kg/jour ce qui signifie qu’entre 10 et 15% des besoins en énergie doivent être couverts par l’apport en protéines (Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, 2007). La densité énergétique brute des protéines, mesurée en bombe calorimétrique est de 5.4 kcal/g contre 4.1 pour les glucides, mais l’énergie disponible pour l’organisme est réduite à 4 kcal/g du fait de l’énergie perdue dans l’urée. Pourtant, malgré une densité énergétique du même ordre de grandeur, l’augmentation ou la baisse du niveau d’apport protéique dans l’alimentation a de fortes conséquences au niveau du métabolisme énergétique et de la composition corporelle. Le ratio protéines/glucides est donc particulièrement intéressant à étudier lorsqu’il s’agit d’observer les conséquences métaboliques d’un régime (Morrison and Laeger, 2015).

1.1.1.2 Les acides aminés, briques des protéines

Chez l’Homme, vingt acides aminés rentrent dans la séquence des protéines et neuf sont considérés comme indispensables. Les acides aminés indispensables sont définis comme des acides aminés qui ne peuvent pas être synthétisés *de novo* ou en quantité suffisante par l’organisme. Ils doivent donc être apportés par l’alimentation. Seulement huit ont été identifiés comme indispensables dans les années cinquante (Rose, 1957). Des travaux ultérieurs menés par Kopple et Swendseid ont démontré que

l'histidine était également indispensable (Kopple and Swendseid, 1975). L'ensemble des acides aminés protéinogènes dont les indispensables sont représentés dans la Figure 1:

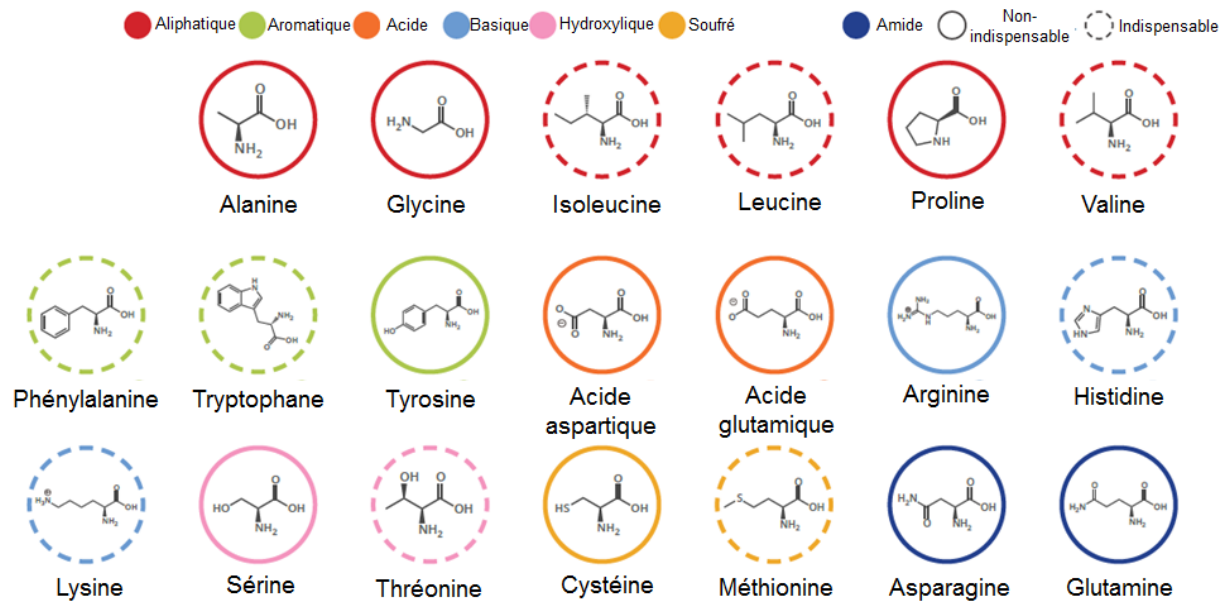


Figure 1: Les 20 acides aminés protéinogènes (Compoundchem.com)

20 acides aminés, dits protéinogènes, rentrent dans la séquence des protéines. Ces 20 acides aminés diffèrent dans leur radical carboné qui peut être aliphatique, aromatique, acide, basique, hydroxylique, soufré ou amide. Ils peuvent être non-indispensables (entourés par une ligne pleine) ou indispensables (entourés par une ligne pointillée), dans ce dernier cas, il est nécessaire qu'ils soient apportés par l'alimentation.

Le caractère indispensable des acides aminés est toutefois relatif. En effet, certains acides aminés peuvent devenir limitants dans certaines conditions physiopathologiques et sont appelés « conditionnellement indispensables ». Ainsi, chez les prématurés, la cystéine peut être considérée comme indispensable du fait de l'immaturité du système enzymatique impliquant la cystathionase (Gauil et al., 1972; Sturman et al., 1970). De même, chez les personnes atteintes de phénylcétonurie chez qui la phénylalanine s'accumule, l'apport en cet acide aminé doit être limité. La tyrosine synthétisée habituellement à partir de phénylalanine devient donc indispensable chez ces individus (MacLeod and Ney, 2010).

1.1.1.3 Source endogène des protéines

Les protéines et acides aminés que l'on trouve dans la lumière intestinale ne proviennent pas uniquement de l'alimentation, il en existe une source endogène. En effet, une étude datant des années 60 a observé chez le rat nourri avec un régime aprotéique une sécrétion journalière de protéines de l'ordre de 150 mg prouvant ainsi l'existence d'une source endogène des protéines et acides aminés (Twombly and Meyer, 1961).

On estime chez l'homme que les protéines et acides aminés dans la lumière intestinale proviennent des protéines alimentaires exogènes de l'ordre de 40 à 110 grammes par jour mais également des protéines

endogènes sécrétées de l'ordre de 20 à 50 g par jour. Les protéines endogènes correspondent aux protéines des cellules desquamées (5 à 6 g/jour), aux protéines salivaires, intestinales, gastriques, biliaires et pancréatiques sécrétées pour assurer le processus digestif (12 à 33 g/jour) et enfin aux pertes d'origine plasmatique (3 à 6 g/jour) (Bernier et al., 1988). Le flux de protéines endogène est dépendant de plusieurs facteurs alimentaires tels que la proximité du repas, sa nature, sa composition protéique, lipidique et glucidique, la présence de facteurs antinutritionnels ainsi que sa capacité à stimuler la libération de cholécystokinine qui est impliquée dans la sécrétion de protéases pancréatiques. Ce flux peut ainsi être multiplié par trois à la suite d'un repas (Arnal et al., 1997).

1.1.2 Digestion des protéines

1.1.2.1 Le processus de digestion et le transport des peptides et acides aminés

Au cours de la mastication, les protéines alimentaires commencent à être mises en solution dans la salive mais c'est l'estomac qui est l'acteur principal de la digestion des protéines grâce à l'action de l'acide chlorhydrique qui va provoquer une dénaturation des structure tertiaires et quaternaires des protéines et ainsi favoriser l'action des enzymes de dégradation. Un grand nombre d'enzymes interviennent ensuite dans la digestion des protéines alimentaires. Celles-ci sont tout d'abord transformées en peptides plus courts via l'action de la pepsine sécrétée dans le suc gastrique par l'estomac. La pepsine clive les liaisons peptidiques en amont des acides aminés aromatiques. Interviennent par la suite au niveau du duodénum les endopeptidases du pancréas (trypsine, chymotrypsine, élastase) (Arnal et al., 1997). L'efficacité de la protéolyse pancréatique est très importante : une étude chez l'homme rapporte que 15 minutes après l'ingestion d'un repas contenant 15 g de protéines de lait ou de gélatine, environ 50% des acides aminés est sous forme libre ou de petits peptides (Nixon and Mawer, 1970).

Le résultat de l'action des endopeptidases pancréatiques est un mélange de 25 à 30 % d'acides aminés libres et de 60 à 70 % d'oligopeptides à 2-6 acides aminés (Adibi and Mercer, 1973; Gray and Cooper, 1971). A part une petite partie des protéines qui ne sont pas digérées et peuvent être absorbées intactes par endocytose dans l'intestin (Ménard et al., 2010), le reste des protéines ne peut être absorbé que sous forme d'acides aminés libres, de di- ou tripeptides. Les peptides composés de plus de trois acides aminés doivent donc être transformés en fragments plus petits. Ceci est réalisé grâce aux carboxypeptidases et aminopeptidases des cellules de la bordure en brosse de la paroi interne de l'intestin grêle (Freeman et al., 1979).

L'absorption des produits de la digestion des protéines s'effectue essentiellement au niveau du jéjunum et du duodénum (Gausserès et al., 1996). Les di- et tri-peptides entrent dans les entérocytes grâce à des co-transporteurs H⁺/peptides appelés Pept-1 situés sur la membrane apicale des entérocytes (Adibi, 1997; Liang et al., 1995). Dans les entérocytes, ils vont être pour la grande

majorité hydrolysés en acides aminés libres via l'action de di- et tri-peptidases (Erickson and Kim, 1990).

Les acides aminés libres sont quant à eux absorbés par l'intermédiaire de plusieurs systèmes de transport dont la nature dépend de la structure de l'acide aminé. Il peut s'agir d'une diffusion passive ou d'un transport actif via un transporteur dépendant ou indépendant à l'ion sodium (Broer, 2008). Une partie des acides aminés absorbés va directement être utilisée pour le métabolisme des entérocytes notamment la glutamine qui fournit de 30 à 50% de l'énergie des entérocytes (Darmaun, 1993). L'autre partie rejoint la circulation par l'intermédiaire du système porte.

La digestion intestinale des protéines n'est toutefois pas complète, une partie de ces protéines, de l'ordre de 5 à 10% chez les monogastriques (Mariotti et al., 1999), atteignent ainsi le colon sous forme de peptides ou de protéines intactes et peut être métabolisée par les bactéries du colon ce qui conduit à la production d'acides gras à courte chaîne, de thiols, de CO₂, d'H₂ et de H₂S qui peuvent avoir des actions toxiques au niveau de l'épithélium intestinal (Macfarlane and Macfarlane, 2012). Les étapes principales de la digestion et de l'absorption des acides aminés sont rappelées dans la Figure 2 ci-dessous :

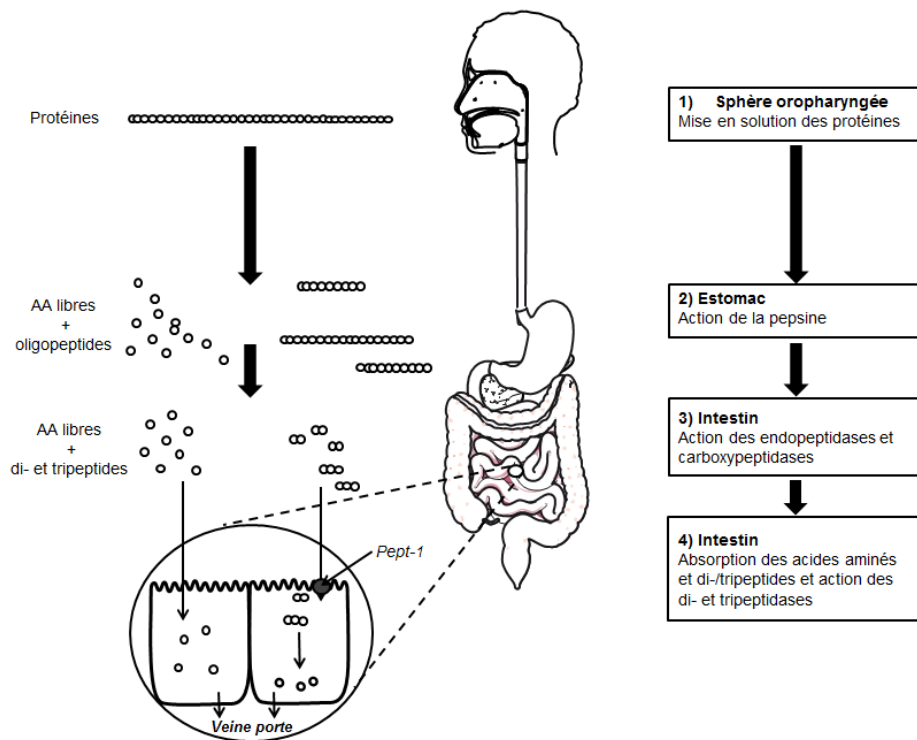


Figure 2: Les principales étapes du processus digestif

Les protéines sont ingérées et mises en solution par la salive (1). Elles rejoignent ensuite l'estomac où elles subissent l'action de la pepsine qui les transforme en acides aminés libres et oligopeptides (2). L'action des endopeptidases et carboxypeptidases de l'intestin permet de couper les oligopeptides en fragments plus petits : di- et tripeptides (3). Les acides aminés libres diffusent à travers la membrane des entérocytes ou sont transportés par des transporteurs dépendants ou non à l'ion sodium. Les di- et tripeptides sont majoritairement transportés par le transporteur Pept-1 et sont lysés en acides aminés libres par des di- et tri-peptidases situés dans le cytoplasme des entérocytes. Les acides aminés libres rejoignent ensuite la circulation sanguine par la veine porte.

1.1.2.2 Variabilité de la digestion et de l'absorption des protéines

Les protéines et les acides aminés sont les principaux nutriments pourvoyeurs d'azote. Afin de suivre les flux en acides aminés et en protéines, il est plus aisé d'évaluer les flux d'azote. La digestibilité protéique est ainsi définie comme le rapport entre la quantité d'azote alimentaire dans les protéines qui va être disponible pour le métabolisme de l'hôte et la quantité d'azote alimentaire dans les protéines consommées. La digestibilité est donc un paramètre primordial de l'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines. Les méthodes d'évaluation de la digestibilité sont multiples : la digestibilité apparente est définie comme le rapport entre la quantité d'azote retrouvée dans les digestats et celle ingérée. Toutefois, comme évoqué précédemment, une partie des protéines est d'origine endogène. Ainsi l'étude des digestats surestime la quantité d'azote alimentaire provenant directement des protéines alimentaires (Fuller and Tomé, 2005). C'est pourquoi on considère également la digestibilité vraie et la digestibilité réelle. La digestibilité vraie prend en compte les pertes basales en azote et la digestibilité réelle tient compte des pertes totales en azote (basales et spécifiques) (Darragh and Hodgkinson, 2000). Il a été mesuré que la digestibilité des protéines d'origine animale étaient supérieures à celle d'origine végétale, de l'ordre de plus de 95% contre 85 à 92% respectivement (Wu, 2016).

Les caractéristiques intrinsèques des protéines peuvent aussi avoir un impact sur la cinétique d'apparition des acides aminés dans le plasma. Les travaux de Boirie ont ainsi permis de définir deux types de protéines, définies comme lentes ou rapides selon la cinétique d'apparition des acides aminés dans le sang. Ses travaux ont mis en évidence que l'ingestion de protéines du lactosérum conduisait à une augmentation forte et transitoire de la leucine dans le plasma (protéine rapide) tandis que la consommation de caséine s'accompagnait d'une libération plus faible et plus constante (protéine lente) comme le montre la Figure 3 représentant les taux d'enrichissement plasmatique en leucine à la suite d'un repas à base de protéines de caséine (ronds noirs) ou de lactosérum (triangles blancs).

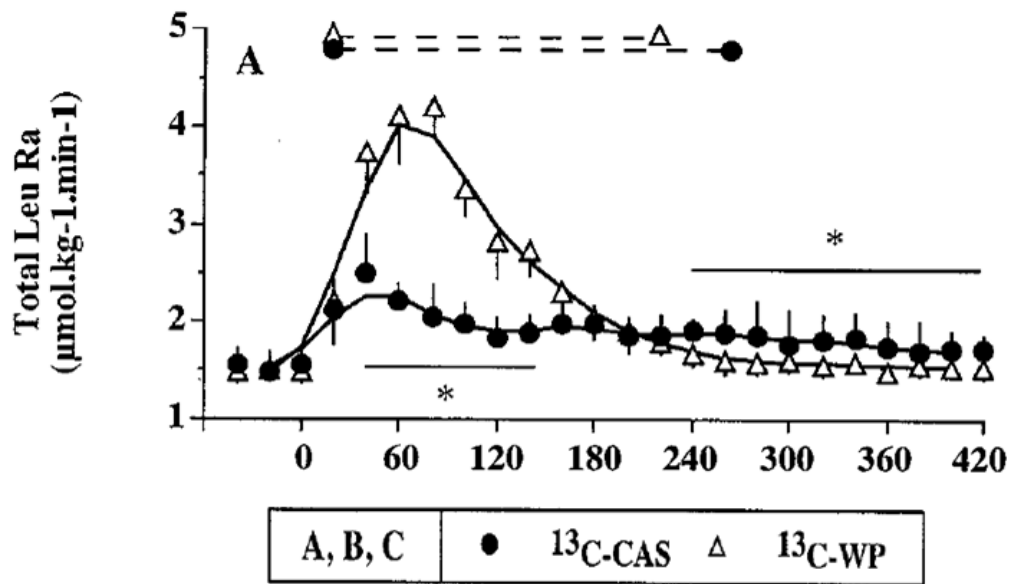


Figure 3: Cinétique d'apparition dans le plasma de la leucine à la suite d'un repas à base de caséine (CAS) ou de protéines du lactosérum (WP) (Boirie et al., 1997).

16 individus ont été nourris avec des fractions protéiques de lait, caséine (CAS) ou lactosérum (WP), contenant de la leucine marquée, $^{13}\text{C-CAS}$ ou $^{13}\text{C-WP}$. Des prélèvements de sang ont ensuite été réalisés toutes les 20 minutes pendant 7 heures. L'enrichissement du plasma en $^{13}\text{C-Leucine}$ a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse.

Ces différences de cinétiques d'absorption s'expliquent par le fait que la vidange gastrique des deux protéines n'est pas la même. Tandis que la caséine coagule dans l'estomac et rejoint le duodénum progressivement, les protéines du lactosérum quittent rapidement l'estomac pour rejoindre l'intestin. Ces différences de vitesse d'absorption se traduisent par des conséquences importantes sur le métabolisme postprandial. Ainsi dans la même étude, Boirie et al montrent que la consommation de caséine diminue la protéolyse de 34% et stimule la synthèse protéique du corps entier. La consommation de protéines du lactosérum quant à elle n'a pas d'effet sur la protéolyse mais stimule la synthèse protéique de manière plus importante (Boirie et al., 1997).

1.1.2.3 Conséquences du niveau d'apport sur la disponibilité en acides aminés

Chez des rats, il a été montré que l'adaptation à un régime faible en protéines conduit à une baisse de la concentration plasmatique à jeun de tous les acides aminés à l'exception de l'histidine et de la lysine (Batistela et al., 2014). Plus précisément, Laeger et al. ont observé que la consommation d'un régime faible en protéines entraînait une baisse des taux circulants de certains acides aminés, en particulier de la thréonine et des acides aminés ramifiés mais qu'après quatre jours d'adaptation au régime, les concentrations avaient tendance à se normaliser (Laeger et al., 2014a).

Dans un contexte d'augmentation de l'apport en protéines alimentaire, il a été observé chez des hommes que, doubler l'apport protéique pendant 7 jours entraîne une augmentation de la concentration

sanguine en acides aminés ramifiés et une diminution de celle en acides aminés non indispensables (Morens et al., 2003). En accord avec ces résultats, Peters et al. ont montré qu'augmenter le contenu en caséine du régime chez des rats pendant 11 jours augmente la concentration en acides aminés ramifiés et décroît la concentration en acides aminés non-indispensables dans le plasma lors de la phase de digestion (Peters and Harper, 1985). Une autre étude, ayant utilisé des régimes supplémentés en acides aminés indispensables (Leucine, isoleucine, valine, phénylalanine) montre que la concentration plasmatique en acides aminés en période postabsorptive est directement liée à la composition du régime (Block and Harper, 1991).

1.1.3 Le rôle central du foie dans le métabolisme des protéines

1.1.3.1 Structure du foie

Le foie est impliqué dans les adaptations du métabolisme énergétique en réponse aux variations des protéines du régime. Il est composé en majorité d'un type cellulaire, les cellules parenchymateuses ou hépatocytes, mais comprend également d'autres types comme les cellules endothéliales impliquées dans la prolifération hépatocytaire, les cellules de Kupffer qui vont intervenir dans les réactions immunitaires, les cellules étoilées ou dite de Ito jouant un rôle majeur dans la régulation de la croissance hépatique, les cellules « natural killer » étant des lymphocytes intrahépatiques. La contribution de chaque type cellulaire à la structure du foie est décrite dans le Tableau 1 :

Tableau 1: Contribution des différents types cellulaires à la structure du foie (Gebhardt, 1992)

| Type cellulaire | Contribution (%) |
|-----------------------------|------------------|
| Hépatocytes | 60-65 |
| Cellules endothéliales | 15-20 |
| Cellules de Kupffer | 8-12 |
| Cellules étoilés | 3-8 |
| Cellules « natural killer » | <2 |

1.1.3.2 Place du foie dans le métabolisme protéique

Une fois absorbés par l'intestin, les acides aminés alimentaires atteignent le foie par l'intermédiaire de la veine porte. Ces acides aminés sont rejoints par ceux provenant de la protéolyse des protéines corporelles ainsi que du recyclage des sécrétions de l'intestin grêle. Le foie va prélever et métaboliser une grande partie des acides aminés lui arrivant. Il est estimé que 57% des acides aminés arrivant au foie sont catabolisés, 21% sont utilisés pour la synthèse protéique et les 22% restants rejoignent la circulation générale (Arnal et al., 1997).

Le foie joue un rôle essentiel dans la synthèse protéique. On estime qu'un gramme de foie synthétise près de six fois plus de protéines qu'un gramme de muscle. En plus de ses protéines constitutives, le foie intervient dans la synthèse d'une grande partie des protéines plasmatiques (albumine, transférine, protéine C-réactive). A ce titre, il a été montré que le foie prélève une grande partie des acides aminés indispensables pour la synthèse de ses protéines. Chez le porcelet, le foie capte ainsi, 13 à 18% de la leucine, de la lysine et de la phénylalanine et 33% de la thréonine (Stoll et al., 1998).

Le corps n'ayant pas de capacité de stockage des protéines apportées en excès, les acides aminés excédentaires sont captés par le foie où ils sont désaminés ou transaminés. La désamination est la réaction chimique qui conduit à la perte de la fonction amine d'un acide aminé. La transamination, est la réaction de transfert de la fonction amine d'un acide aminé à un acide α -cétonique qui est un acide organique portant une fonction acide carboxylique et une fonction cétone. Elle est catalysée par des enzymes appelés transaminases ou aminotransférases (Figure 4).

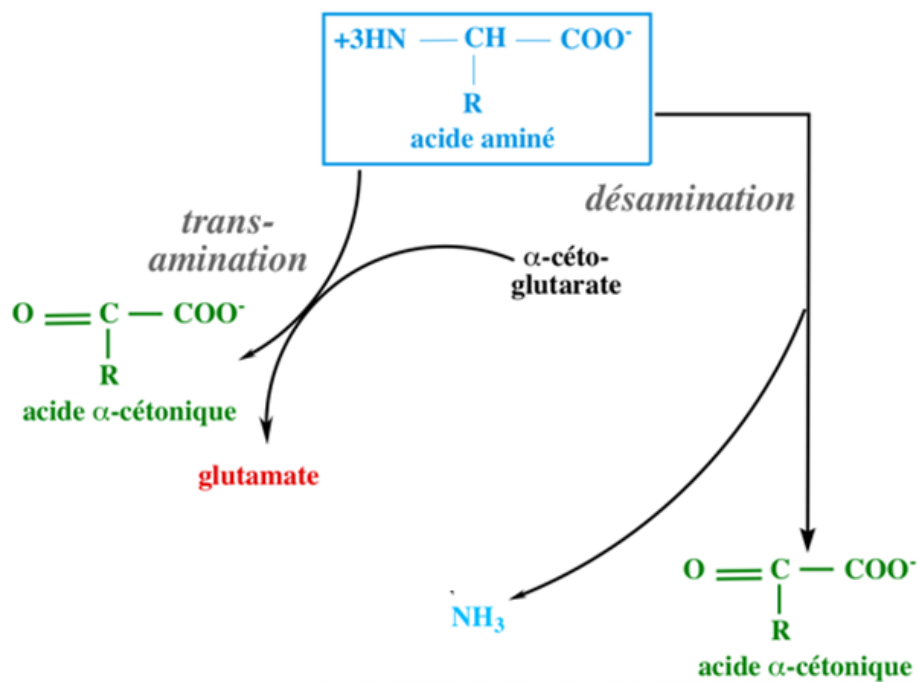


Figure 4: Réactions de désamination et de transamination

La dégradation des acides aminés démarre par la perte de la fonction amine, celle-ci peut être réalisée par transamination, c'est-à-dire le transfert de la fonction amine sur un acide α -cétonique ou par désamination. La perte de la fonction amine sous forme d'ammoniac NH_3 résultant de la désamination est transférée sur le glutamate pour former la glutamine et/ou rejoint le cycle de l'urée.

Le squelette carboné (acide α -cétonique) résultant de la perte de la fonction amine lors de ces deux réactions peut être converti en acétyl-CoA afin de rejoindre le cycle de Krebs, y être oxydé et conduire à la production de CO_2 et H_2O . L'oxydation des acides aminés produit toutefois moins d'énergie que celle des acides gras ou du glucose et dépend l'acide aminé considéré. Ainsi il a été estimé que

l'efficacité du transfert de l'énergie depuis l'acide aminé vers l'ATP est de 29% pour la méthionine et de 59% pour l'isoleucine (G. Wu 2009).

Lorsque la transamination est effectuée entre un acide aminé et l'alpha-cétoglutarate, elle permet de fixer l'azote libre libéré sous forme d'ammoniaque. En effet, l'ammoniac, NH_3 , est toxique notamment pour le système nerveux central, l'organisme a donc besoin de réduire l'existence de l'azote sous cette forme. Le glutamate formé est ensuite converti en glutamine grâce à la glutamine synthase, ce qui permet le transport de deux groupements amines sous une forme neutre jusqu'au foie. Dans le foie, la glutamine redonne du glutamate et de l'ammoniac qui rejoint alors le cycle de l'urée permettant l'élimination de l'azote sous une forme neutre, hydrosoluble et concentrée : l'urée. L'urée produite par le foie est transportée jusqu'aux reins pour être excrétée dans l'urine. Une partie, de l'ordre de 10% est toutefois excrétée sous forme d'ammonium (Weiner et al., 2015). Il est important de noter que les acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine, valine) sont largement épargnés par l'activité catabolique du foie du fait de la faible activité des transaminases hépatiques spécifiques de ces acides aminés et sont essentiellement catabolisés au niveau des organes périphériques comme le muscle et le cerveau (Jungas et al., 1992; Hutson et al., 2005). Les réactions de transamination au niveau du foie permettent également la synthèse d'acides aminés non-indispensables comme l'aspartate à partir d'oxaloacétate ou d'alanine à partir de pyruvate. Une partie des squelettes carbonés peut également rejoindre la voie de la néoglucogénèse, qui est la voie de synthèse de glucose à partir de composés non glucidiques. Celle-ci est mise en place en cas d'apport trop faible en glucides ou lors d'un jeûne. A ce titre, l'alanine a un rôle particulièrement important dans l'homéostasie glucidique. Cet acide aminé peut être transformé en pyruvate afin de rejoindre la voie de la néoglucogénèse et permettre la synthèse de glucose. Ce même glucose peut être capté par le muscle et reconverti en alanine par l'intermédiaire du pyruvate dans un processus appelé cycle alanine/glucose (Brosnan, 2003; Wu, 2009).

Une autre partie des acides aminés sont cétogéniques et conduisent à la production d'acéto-acétate et β -hydroxybutyrate (lysine, leucine) et enfin les derniers sont à la fois cétogéniques et glucogéniques (Phénylalanine, Isoleucine, Tryptophane, Tyrosine, Lysine). Les réactions sont réalisées en grande partie dans la mitochondrie des hépatocytes après captation des acides aminés ou de leur squelette carboné (Salway, 2013). Le point d'entrée dans le cycle de Krebs et dans la néoglucogénèse des différents acides aminés en fonction du devenir de leur radical carboné est représenté dans la Figure 5.

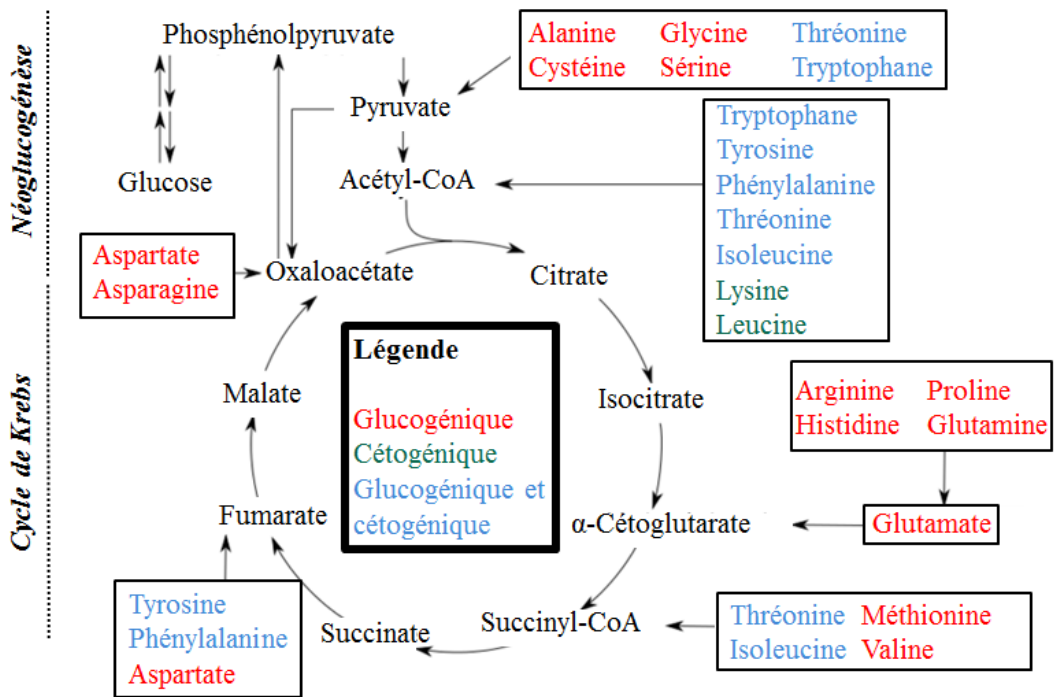


Figure 5: Destinée des squelettes carbonés

Le squelette carboné des acides aminés peut conduire à la formation de corps cétoniques ou de glucose. Certains acides aminés comme la lysine et la leucine (en vert) sont strictement céto-géniques et ne peuvent conduire à la formation que d'acéto-acétate et de β -hydroxybutyrate par l'intermédiaire de l'acétyl-CoA. D'autres acides aminés (Tryptophane, Tyrosine, Phénylalanine, Thréonine, Isoleucine) en plus d'être précurseurs de l'acétyl-CoA peuvent servir également de précurseurs de molécules du cycle de Krebs et être réorientés vers la néogluco-génèse, ces acides aminés sont à la fois céto-géniques et glucogéniques. Enfin, le reste des acides aminés est strictement glucogénique.

1.2 Turnover, besoin et qualité des protéines

1.2.1 Concept de turnover protéique

Chez un homme de 70 kg, on estime que le compartiment des protéines représente ~15% du poids corporel soit entre 10 et 12 kg (Arnal et al., 1997). Les protéines corporelles sont inégalement réparties dans le corps. Les muscles squelettiques, de par leur composition et leur forte contribution au poids total de l'individu concentrent de 40 à 45% des protéines corporelles. Ce compartiment est stable chez un individu adulte en bonne santé mais subit en permanence une dynamique d'interconversion liée à des processus anaboliques et cataboliques. En effet, chaque jour, une partie du pool protéique est détruit lors de la protéolyse tandis que de nouvelles protéines sont synthétisées lors de la synthèse protéique. Ces deux processus antagonistes permettent le renouvellement de 250 à 300 grammes de protéines par jour permettant ainsi à l'organisme de mieux s'adapter aux différentes conditions nutritionnelles et physiologiques. On estime que ce renouvellement est de l'ordre de 80 g/j au niveau musculaire, de 120 g/j au niveau du foie, du pancréas, du tissu intestinal, des cellules sanguines et de la peau et de 50 g/j dans les autres tissus (Arnal et al., 1997).

Un déséquilibre entre ces deux processus peut conduire soit à une augmentation des protéines corporelles dans le cas où la synthèse excède la protéolyse, ce qui arrive lors des périodes de croissance chez l'enfant ou de prise de masse musculaire chez les athlètes, soit à une diminution des protéines corporelles lorsque la protéolyse devient supérieure à la synthèse, ce qui arrive lors d'un jeûne, chez la personne âgée sarcopénique ou lors de la cachexie cancéreuse (Arnal et al., 1997).

Synthèse protéique et protéolyse interagissent avec le pool des acides aminés libres qui représente moins de 1% des acides aminés totaux (80 g) et qui se divise lui-même en deux compartiments : le compartiment des acides aminés libres intracellulaires (75 g environ) qu'on peut trouver sous leur forme activée liée aux ARN de transfert et le compartiment extracellulaire composé des acides aminés libres circulants (5 g environ). Les acides aminés libres intracellulaires peuvent être utilisés dans les processus oxydatifs ou servir de précurseur d'autres molécules. Enfin, une partie des acides aminés peut être perdue de façon irréversible lors de pertes obligatoires : pertes urinaires et fécales et autres (chutes de cheveux et d'ongles, desquamation de cellules, sueur, sébum). Les pertes en acides aminés sont compensées par l'apport en acides aminés alimentaires. L'illustration du turnover protéique se trouve dans la figure 6 ci-dessous :

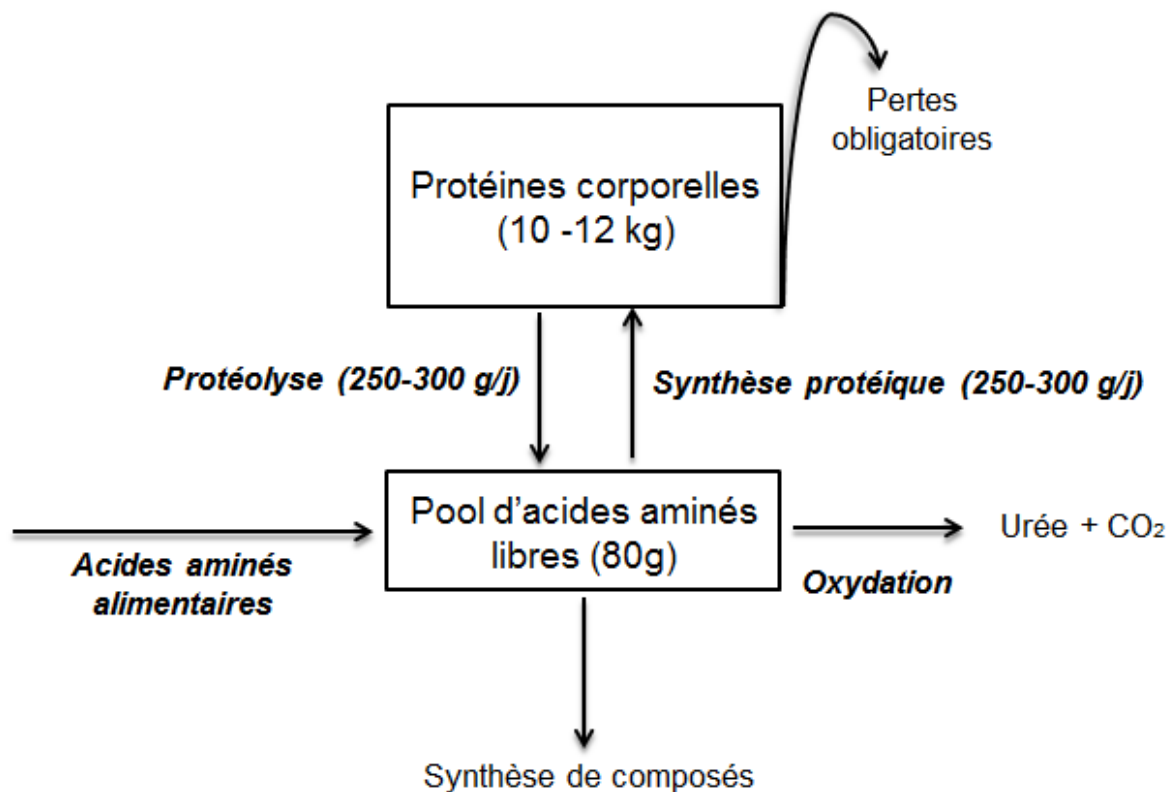


Figure 6: Turnover protéique

Les protéines corporelles sont en constant renouvellement et subissent des pertes obligatoires (pertes urinaires, fécales et autres). Une partie est dégradée par protéolyse tandis qu'une autre est synthétisée. Le pool d'acides aminés libres reçoit les acides aminés issus de la protéolyse et les acides aminés alimentaires et sert de compartiment précurseur pour la synthèse de protéines et d'autres composés. Une partie des acides aminés libres peut être oxydée et conduire à la production d'urée, de H₂O, et de CO₂.

1.2.2 Apports et besoin en protéines et en acides aminés

1.2.2.1 Besoin en azote

Le bilan azoté correspond à la différence entre l'azote ingéré et l'azote excrété et doit être équilibré. Les pertes azotées obligatoires se chiffrent environ à 54 mg/kg/j ce qui représente un besoin protéique de 0,34 g/kg/j. Le rendement de l'utilisation des protéines alimentaires n'étant pas de 100%, un apport de 0.66 g/kg/j est nécessaire pour assurer l'équilibre du bilan azoté. En appliquant un coefficient de sécurité, les apports protéiques recommandés chez l'homme adulte en bonne santé sont 0.83 g/kg/j (Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition, 2007).

1.2.2.2 Besoin en acides aminés indispensables

Ces apports en protéines doivent également couvrir les besoins en acides aminés indispensables. Il est donc important d'avoir des méthodes d'estimation des besoins en acides aminés indispensables et éventuellement de leur évolution en fonction du stade physiologique de l'individu. En premier lieu, la méthode du bilan azoté a été utilisée afin de déterminer le caractère indispensable et le besoin en

acides aminés. Le besoin en un acide aminé indispensable est alors défini comme la quantité minimale de cet acide aminé à apporter afin que le bilan azoté soit équilibré. Toutefois, cette méthode a de nombreuses limitations car il est difficile de quantifier précisément les pertes azotées obligatoires et une modification du bilan ne permet pas de conclure si son origine provient d'une modulation de la rétention ou des pertes en azote.

Le bilan azoté a été remplacé depuis plusieurs années par deux méthodes utilisant des isotopes stables : la méthode du bilan traceur et celle de l'oxydation de l'acide aminé indicateur. Ces deux méthodes reposent sur le principe qu'une augmentation de l'oxydation d'un acide aminé est un indicateur de son excès. Ainsi, dans le cas de la méthode du bilan traceur, l'oxydation de l'acide aminé testé est mesurée par l'oxydation d'un traceur de cet acide aminé, par exemple la ¹³C-lysine pour estimer les besoins en lysine. Dans le cas de l'acide aminé indicateur, on mesure l'oxydation d'un acide aminé différent de celui dont on veut estimer le besoin, souvent la ¹³C-phénylalanine. En effet, tant que l'acide aminé dont on veut connaître le besoin est apporté en quantité insuffisante alors l'acide aminé indicateur est lui en excès et est donc oxydé (Fuller and Tomé, 2005).

1.2.2.3 *Qualité des protéines*

La qualité d'une protéine dépend donc à la fois de sa capacité à pouvoir répondre aux besoins en azote et en acides aminés indispensables. Cette qualité va être influencée par la digestibilité de la protéine et par son profil en acides aminés. La méthode d'évaluation de la qualité des protéines la plus courante, le PD-CAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score), a été mise en place par la FAO et l'OMS en 1989 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1991). Elle repose sur la comparaison du profil en acides aminés indispensables de la protéine étudiée avec celui d'une protéine de référence censée parfaitement répondre aux besoins en acides aminés. La méthode calcule l'abondance de chaque acide aminé indispensable dans la protéine étudiée par rapport à son abondance dans la protéine de référence. La valeur obtenue la plus basse suite à ce calcul est l'indice chimique, et correspond à l'acide aminé le plus limitant pour la synthèse protéique.

Le PD-CAAS ajuste aussi la valeur de l'indice chimique par la digestibilité de la protéine afin de mieux traduire la capacité de la protéine à satisfaire le besoin en acide aminé indispensable.

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

Le PD-CAAS offre un score qui peut avoir une valeur de 0 % à 100% voire plus. Dans ce dernier cas, aucun des acides aminés indispensables de la protéine n'est limitant.

Cette méthode a toutefois des limites puisqu'elle considère la digestibilité fécale mesurée chez le rat en croissance. Or, le rat n'est pas le modèle le plus approprié pour l'homme et la digestibilité individuelle des acides aminés diffère et doit donc être prise en compte. En outre, une partie des acides

aminés indispensables retrouvés dans les fèces est produite par les bactéries du gros intestin, ce qui conduit à une sous-estimation de la digestibilité réelle de ces acides aminés (Bergen, 2015).

Depuis 2011, la FAO recommande donc l'utilisation du DIAAS (Digestible Indispensable Amino Acid Score) calculé à partir des valeurs de digestibilité iléale individuelle de chaque acide aminé indispensable présent dans la protéine étudiée (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013).

1.3 Synthèse et catabolisme des protéines

1.3.1 Synthèse protéique

La synthèse protéique regroupe l'ensemble des processus qui permettent aux cellules de produire leurs protéines. Ces processus sont au nombre de 6:

- la transcription de l'ADN en ARN messager
- le transport de l'ARN messager depuis le noyau vers le cytosol
- l'aminocyclation des ARN de transfert
- la traduction de l'ARN messager en chaînes polypeptidiques
- les modifications post-traductionnelles des protéines

La synthèse protéique est un mécanisme très complexe et coûteux en énergie faisant intervenir près de 300 molécules (Nelson and Cox, 2013). Une étude menée chez le poussin a ainsi rapporté que le coût énergétique de la synthèse protéique est de 0.24 kcal par gramme de protéine synthétisée (Aoyagi et al., 1988). L'étape de traduction nous intéressera plus particulièrement car ce processus est sous le contrôle d'un grand nombre d'enzymes dont l'état de phosphorylation et donc d'activation/inhibition est sous le contrôle des conditions nutritionnelles comme la disponibilité en acides aminés.

Le processus de traduction se découpe en trois phases successives : l'initiation, l'élongation et la terminaison.

1.3.1.1 L'initiation

L'initiation consiste tout d'abord à reconnaître le point de départ du message codé porté par l'ARN messager. Chez les eucaryotes, la biosynthèse de la chaîne polypeptidique démarre au niveau d'un codon AUG, codant la méthionine. Cela se fait par la formation d'un complexe appelé complexe de pré-initiation 43S, formé de la petite sous-unité ribosomale (40S) et de facteurs d'initiation *eukaryotic Initiation Factor* (eIF), eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5, de l'ARN de transfert lié à la méthionine et du facteur d'initiation eIF-2 composé de trois sous unités α , β , γ dont la dernière est liée au GTP (Kapp and Lorsch, 2004). L'ARNm est associé au complexe eIF4F composé des facteurs eIF4A, eIF4B, eIF4E et eIF4G, qui va venir se lier spécifiquement au complexe de pré-initiation 43S par l'intermédiaire du facteur d'initiation eIF3 (Gingras et al., 1999; Gross et al., 2003). Une fois le complexe fixé, l'un des facteurs d'initiation, eIF4A, ayant une activité hélicase va permettre de supprimer les appariements intramoléculaires de bases et autorise le déplacement du complexe de pré-initiation le long de l'ARN messager afin de trouver le codon de départ (Oberer et al., 2005). A la suite de l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 en GDP. Les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 et eIF4F se détache alors du complexe, la sous-unité ribosomale 60S peut alors venir se fixer sur le complexe de pré-initiation pour former le complexe ribosomal 80S et débiter la phase d'élongation (López-Lastra et al., 2005).

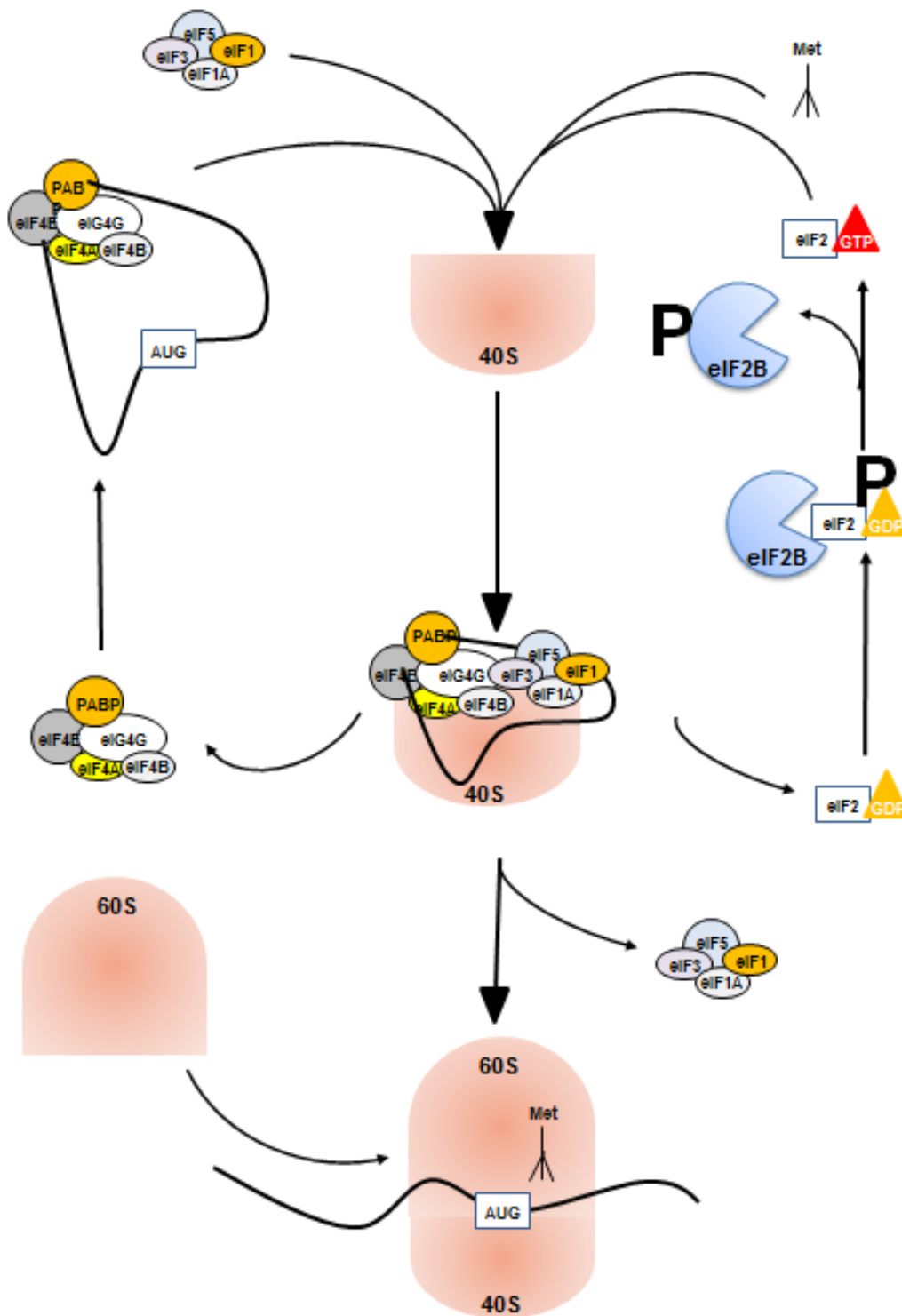


Figure 7: Schéma explicatif de l'étape d'initiation de la traduction protéique et de sa régulation (Chotechuang, 2010)

Dans un premier temps, le complexe (eIF4B-eIF4G-eIF4E-eIF4A) et l'ARNm s'associe. Ce nouveau complexe va se fixer à la sous-unité ribosomale 40S, avec un autre complexe formé d'eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5, d'eIF2 associé au GTP et au méthionyl-ARNt et ainsi former le complexe de préinitiation 43S. Le facteur d'initiation eIF4A a une activité hélicase et va permettre de supprimer les appariements intramoléculaires de bases et autorise ainsi le déplacement du complexe de pré-initiation le long de l'ARN messager afin de trouver le codon de départ A la suite de l'hydrolyse du GTP en GDP, les facteurs d'initiation sont libérés et la sous-unité ribosomale 60S vient alors se fixer. L'étape d'élongation peut alors démarrer.

1.3.1.2 L'élongation

A l'étape d'initiation succède l'étape d'élongation. On assiste lors de ce processus au recrutement des ARN de transfert liés à leur acide aminé spécifique et à la formation de la chaîne polypeptidique par liaison des acides aminés selon l'ordre de la succession des codons définis par l'enchaînement des bases de l'ARN messager. Le cycle d'élongation nécessite le recrutement de facteurs d'élongation notamment *eukaryotic elongation factor 1A* (eEF1A) qui va se lier à l'ARN de transfert (tRNA) permettant la formation du complexe suivant : AA-tRNA-eEF1A-GTP. L'anticodon de l'ARN de transfert vient s'associer au codon positionné sur le « site A ». Si l'appariement est fort, l'hydrolyse du GTP est réalisée, ceci entraîne la dissociation d'eEF1A et déclenche la liaison entre la méthionine et le deuxième acide aminé. A l'inverse, si l'appariement est faible, le GTP n'est pas hydrolysé et la liaison peptidique n'est pas réalisée. Après l'hydrolyse du GTP, le complexe eEF1A-GDP se lie à eEF1B afin de permettre le recyclage du GDP en GTP. Le complexe eEF1A-GTP est à nouveau fonctionnel et peut se lier à l'acide aminé suivant et ainsi contribuer à l'élongation de la chaîne polypeptidique. L'ARN de transfert qui portait l'acide aminé sur lequel la liaison vient d'être effectuée est chassé de son site grâce à l'hydrolyse d'un GTP porté par un deuxième facteur d'élongation : eEF2. Cette opération s'accompagne d'un déplacement du ribosome sur l'ARN, appelé translocation. L'ensemble du processus se répète jusqu'à atteindre un codon de terminaison UAA, UAG ou UGA qui signale la fin de la synthèse du polypeptide (Groppo and Richter, 2009; Kasinath et al., 2006).

Plusieurs ribosomes peuvent se fixer sur le même ARN messager, cet ensemble prend l'aspect d'un collier de perles, appelé polysome. Une augmentation du nombre de polysomes et de du nombre de ribosomes associés par brin d'ARN messager peut être un marqueur intéressant du flux de synthèse protéique (Esposito et al., 2010). Cependant le niveau de régulation du nombre de polysomes reste encore peu connu.

1.3.1.3 La terminaison

Une fois l'un des codons de terminaison rencontré, les facteurs *eukaryotic release factors* (eRFs) dont eRF1 qui est lié à eRF3 et au GTP, reconnaissent l'un des trois codons stop et s'y fixent. Cela entraîne alors l'hydrolyse du GTP en GDP, la dissociation des deux sous-unités ribosomales et la libération de l'ARN messager (Kisselev et al., 2003; Salas-Marco and Bedwell, 2004). Les étapes de l'élongation et de la terminaison sont schématisées sur la Figure 8:

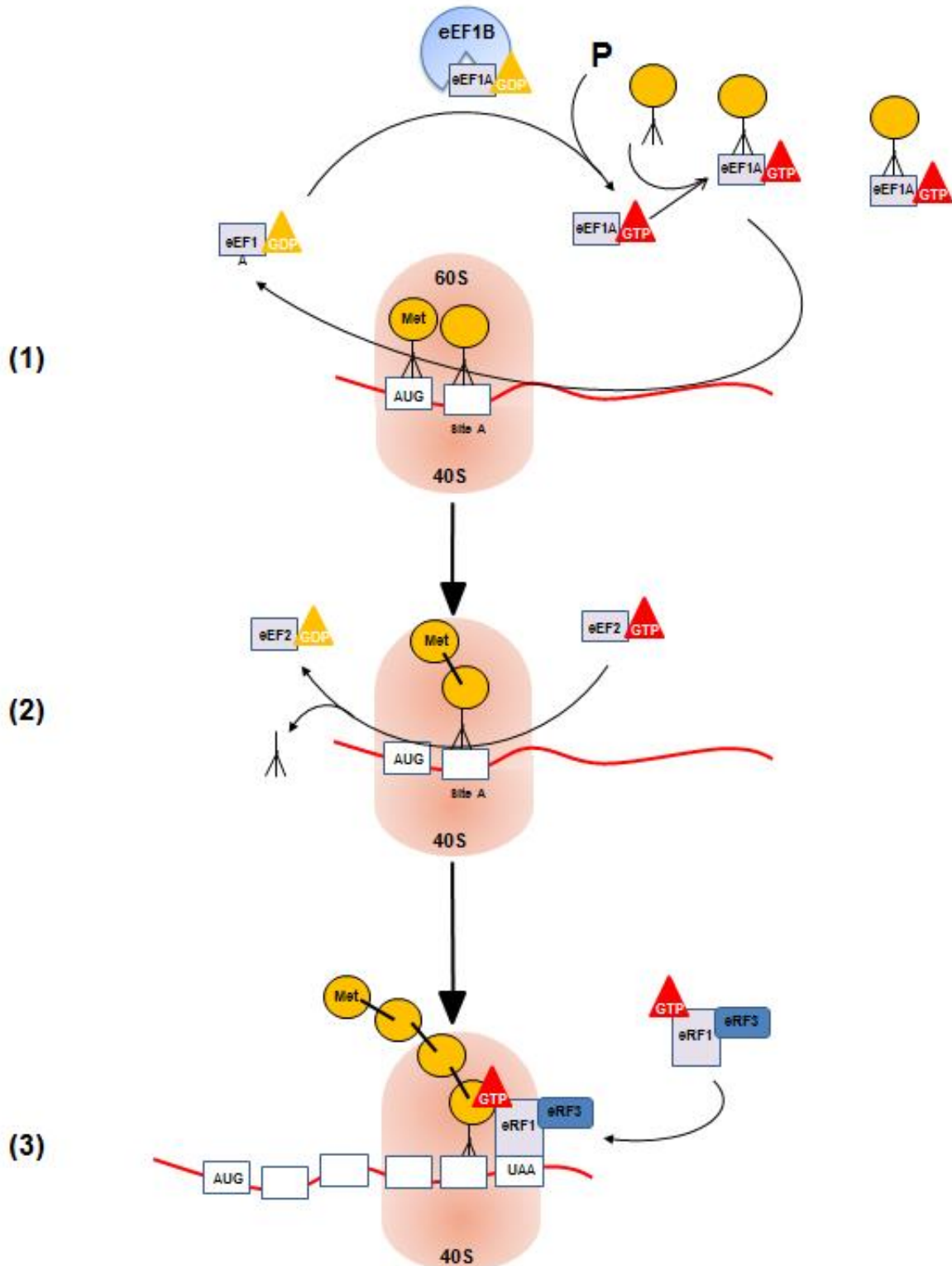


Figure 8: Schéma explicatif de l'étape d'élongation et de terminaison (Chotechuang, 2010)

L'étape d'élongation démarre au niveau d'un codon AUG codant pour la méthionine. Des facteurs d'élongation associés au GTP et à un ARNt lié à un acide aminé sont recrutés. Si l'appariement entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt est fort, l'hydrolyse du GTP est alors réalisée et une liaison est effectuée entre la méthionine et le deuxième acide aminé (1). L'hydrolyse par la suite du GTP porté par le facteur d'élongation eEF2 permet l'éjection de l'ARN de transfert (2). Le cycle peut alors se répéter pour permettre d'allonger le peptide en cours de synthèse. Les facteurs eRF1 qui est lié à eRF3 et au GTP, reconnaissent l'un des trois codons stop et s'y fixe. Cela entraîne alors l'hydrolyse du GTP en GDP, la dissociation des deux sous-unités ribosomales et la libération de l'ARN messager (3).

1.3.1.4 Maturation

La traduction permet l'obtention d'un peptide n'ayant qu'une structure primaire. Par la suite, un certain nombre de modifications post-traductionnelles permettent à la protéine de devenir fonctionnelle pendant un processus appelé maturation. Ce processus recouvre les différentes modifications de la protéine (Nelson and Cox, 2013):

- acquisition des structures secondaires, tertiaires et quaternaires
- modification de certains acides aminés (méthylation de l'histidine ou de la leucine, hydroxylation de la proline, par exemple)
- glycosylation
- coupures de pré-protéines en protéines fonctionnelles

1.3.2 La protéolyse

La protéolyse est la dégradation enzymatique des protéines, il s'agit de la principale source d'acides aminés pour l'organisme. La protéolyse recouvre quatre systèmes principaux : le système lysosomal, le système ubiquitine-protéasome, le système calpaïne et le système caspase.

1.3.2.1 Le système lysosomal

Le lysosome est un organite que l'on trouve dans toutes les cellules nucléées. Le système lysosomal intervient principalement pour la dégradation des protéines intracellulaires à demi-vie longue, sur les membranes cellulaires, les protéines extracellulaires et certains organelles (Dunn, 1994; Reggiori and Klionsky, 2002). Le système lysosomal est particulièrement utilisé dans les organes où le turnover des protéines plasmatiques est important comme le foie. Les lysosomes contiennent des hydrolases ainsi que des endopeptidases et des exopeptidases actives en milieu acide: les cathepsines. Ces dernières sont dénommées en fonction du résidu catalytique impliqué au site actif dans le clivage de la liaison peptidique : les sérine-cathepsines (A et G), les aspartique-cathepsines (D et E, Napsine), les cystéine-cathepsines (B, C, F, H, K, L, O, S,W, V et Z/X) et la cystéine-protéase-asparagine-endopeptidases (Maire, 2012).

La dégradation protéique lysosomiale emprunte trois voies différentes dont l'autophagie. Cette dernière peut elle-même correspondre à trois processus différents : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie réalisée par des chaperons dite *chaperone-mediated autophagy* (CMA) (Cuervo, 2004).

La macroautophagie, conduit à la dégradation de protéines solubles mais également d'organelles complètes. Elle est principalement activée durant des périodes de restriction énergétique et constitue la principale source en acides aminés, glucides et nucléotides lors d'une période de restriction. Elle procède par formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, autour de l'élément à

dégrader puis par fusion avec le lysosome. La formation de l'autophagosome est un mécanisme complexe faisant intervenir 18 protéines ATG (*Autophagy-related gene*) (Noda et al., 2009)

La microautophagie conduit également à la dégradation de protéines solubles ou d'organelles complètes mais procède par dépression de la membrane du lysosome et endocytose des éléments à dégrader.

Enfin, lors de la CMA, il n'y a pas de formation de vésicules, des protéines chaperonnes se fixent au substrat et sont reconnus par des récepteurs situés sur la membrane du lysosome. Après avoir déplié la protéine, celle-ci est transloquée dans la lumière du lysosome afin d'être dégradée. Les trois voies de l'autophagie sont récapitulées dans la Figure 9 :

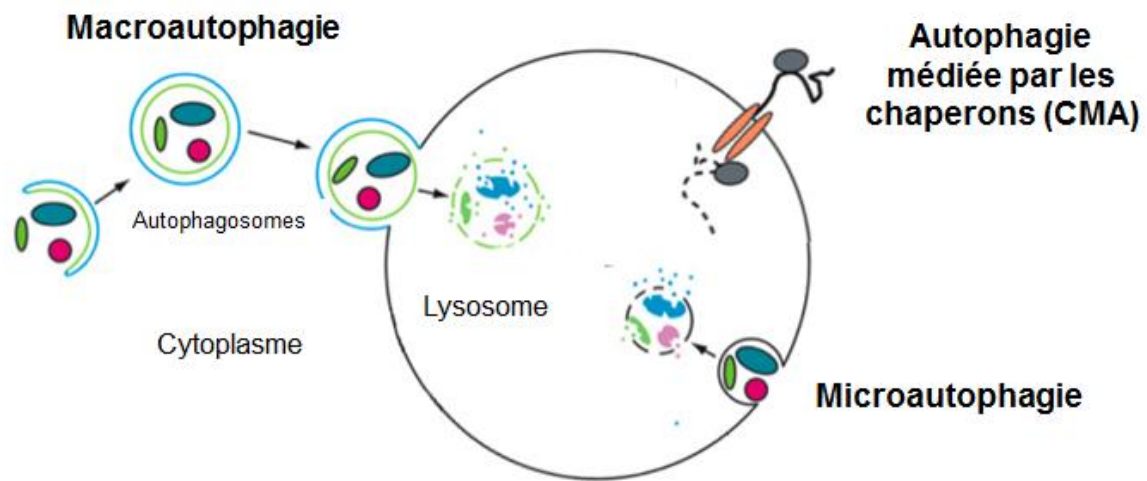


Figure 9: Les trois processus de l'autophagie

L'autophagie regroupe trois processus différents : La macroautophagie permet la dégradation lysosomiale de protéines ou d'organelles par formation d'un autophagosome, transport puis fusion avec le lysosome. La microautophagie permet la dégradation d'éléments similaires par endocytose directement au niveau de la membrane du lysosome. Enfin, l'autophagie médiée par les chaperons (CMA), permet la translocation dans la lumière du lysosome par reconnaissance de protéines marquées par des protéines chaperones.

Le système lysosomal peut aussi emprunter deux autres voies moins importantes, Cvt (*cytosol to vacuole targeting pathway*) qui permettent le transport des hydrolases depuis le cytosol vers le lysosome et Vid (*vacuolar import and degradation pathway*), surtout décrites chez les bactéries et la levure et qui permettent la dégradation d'enzymes inutiles en cas de changement des conditions du milieu (Cuervo, 2004).

1.3.2.2 Le système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome est l'autre système majeur impliqué dans la dégradation des protéines dans les cellules de mammifères. Les substrats préférentiels sont les protéines intracellulaires normales à demi-vie courte ou longue mais également les protéines ayant des défauts de conformation. La dégradation se déroule en deux étapes principales : la liaison covalente entre la protéine à dégrader

et l'ubiquitine, peptide de 76 acides aminés très bien conservé, et ensuite la reconnaissance du signal et la dégradation de la protéine polyubiquitinée en acides aminés et en peptides courts par le protéasome 26S.

L'ubiquitination des protéines fait intervenir un système d'enzymes. Tout d'abord, l'*ubiquitin-activating enzyme* ou E1 active l'ubiquitine par formation d'une liaison thioester. Celle-ci est ensuite transférée vers des enzymes de conjugaison appelées *ubiquitin-conjugating enzymes* ou E2 qui vont permettre la reconnaissance de certains substrats et le transfert de l'ubiquitine sur ces derniers.

Les enzymes E3 (*ubiquitin ligase*) et E4 peuvent également intervenir dans la reconnaissance des substrats et l'élongation de certaines chaînes d'ubiquitine respectivement (Coux and Piechaczyk, 2000).

1.3.2.3 *Le système calpaïne*

Ce système est spécialisé dans la dégradation des protéines du cytosquelette. Il est sous contrôle des ions calcium Ca^{2+} . Il existe deux types de calpaïnes, les calpaïnes de type I activées à des concentrations cytosoliques en Ca^{2+} inférieures à 1 mM et les calpaïnes de type II activées à des concentrations en Ca^{2+} supérieures à 1 mM. La régulation de l'activité des calpaïnes dépend donc de la concentration en calcium intracellulaire, et par conséquent de l'activité des pompes calcium Ca^{2+} -ATPase, mais aussi de la présence de calpastatine, protéine ayant une activité inhibitrice sur l'activité des calpaïnes. L'activité protéolytique de ce système dépend ainsi de l'équilibre entre calpaïnes et calpastatine (Goll et al., 2003).

1.3.2.4 *Le système caspase*

Enfin, les caspases (cysteine-dependent **aspartate-directed proteases**) sont des protéases cytoplasmiques possédant un résidu catalytique cystéine et coupant leurs substrats après un résidu aspartate. Le génome humain code 14 caspases classés en quatre groupes selon l'organisation de leur domaine. Les caspases sont impliquées dans l'exécution de la réponse inflammatoire et jouent un rôle particulier dans la mort cellulaire programmée : l'apoptose ou la pyroptose (Galluzzi et al., 2016).

Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent être initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10) et sont activées par dimérisation ou trimérisation ou effectrices, et avoir une activité protéolytique (caspases 3, 6 et 7). Ces dernières sont alors synthétisées sous forme de pro-caspases et activées par coupure de la protéine après un résidu aspartate par les caspases initiatrices (Lavrik, 2005).

1.3.2.5 *Ciblage des protéines à dégrader*

Il existe un système de ciblage des protéines à dégrader. Il a été mis en évidence que certains acides aminés comme la méthionine, la glycine, la sérine, l'alanine, la thréonine et la valine sont stabilisants et assurent à la protéine qui les portent en position N-terminal une demi-vie en général supérieure à 20h, tandis que d'autres sont déstabilisants comme la lysine, l'aspartate, la leucine, la lysine et

l'arginine et sont portés par les protéines à demi-vie courte. Ces acides aminés en position N-terminal peuvent être modifiés ou au contraire protégés par une acétylation (Gonda et al., 1989).

Il a par ailleurs été rapporté que les protéines PEST, riches en proline, glutamine, sérine ou thréonine étaient dégradées plus rapidement que les autres protéines (Rogers et al., 1986) et que les protéines qui incluent la séquence KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Glutamine-Arginine-Glutamine) sont plus particulièrement réorientées vers la voie de la *Chaperone-mediated autophagy* (CMA) (Dice, 1990).

1.4 Les acides aminés : des molécules « signal »

En plus de leur rôle de briques des protéines, les acides aminés jouent un véritable rôle de signalisation permettant de contrôler l'expression de certains gènes et de moduler l'activité de certaines kinases. Ces kinases sont au nombre de trois : AMPK (*AMP-activated kinase*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et GCN2 (*general control nonderepressible-2*) (Chotechuang et al., 2009).

Nous étudierons donc dans la partie suivante le rôle de ces trois voies de signalisation dans le contrôle du métabolisme énergétique et protéique ainsi que les facteurs nutritionnels ou hormonaux influençant leur activité.

1.4.1 Les senseurs des acides aminés: mTOR

1.4.1.1 Généralités

mTOR aussi connu sous le nom de « *FK506 binding protein 12-rapamycin* » est une sérine/thréonine kinase impliquée dans le contrôle de la synthèse protéique (Helliwell et al. 1994). Cette protéine a été identifiée et clonée après la découverte de deux gènes pendant un test de résistance à la rapamycine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Helliwell et al., 1994).

Le système mTOR existe sous forme de deux complexes ayant des fonctions et des structures différentes : mTOR1 et mTOR2. mTOR1 est composée de mTOR, de Raptor (une protéine de régulation associée à mTOR), de PRAS40 (*proline-rich Akt substrate* de 40kDa), de Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) et d'une protéine apparentée à la sous-unité β du complexe protéique G/LST8 (mLST8/G β L). mTOR1 est activée par phosphorylation, est sensible aux nutriments et aux facteurs de croissance et est inhibée par la rapamycine (Gwinn, 2008). L'assemblage de mTOR1 se fait au niveau de la membrane des endosomes et lysosomes (Anthony, 2015). Cette kinase a pour cible 4E-BP1 (*eIF4E-binding protein-1*) et la protéine kinase p70S6K1. Leur phosphorylation a pour conséquence d'initier la synthèse protéique et d'inhiber l'autophagie (Kim et al., 2002, 2003). L'activation de mTOR1 requiert au préalable sa liaison avec la protéine *Ras homolog enriched in brain* (RHEB) qui possède une activité GTPase (Long et al., 2005)

mTOR2 est composée de mTOR, de la protéine Rictor qui est insensible à la rapamycine, de G β L, et de la protéine kinase activée par le stress (mSIN1). mTOR2 (qui n'a pas pour cible 4E-BP1 et p70S6K1) phosphoryle la protéine kinase B et a un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et la réorganisation du cytosquelette (Sarbasov et al., 2004).

mTOR1 nous intéressera plus particulièrement dans ce travail car répondant à la disponibilité en acides aminés.

1.4.1.2 Rôle dans le métabolisme énergétique

mTOR1 est impliquée dans le contrôle du métabolisme énergétique et a pour fonction générale de réduire les voies cataboliques au profit des voies anaboliques. En effet, un traitement avec la rapamycine, qui inhibe mTOR, augmente l'oxydation des acides gras et réduit leur synthèse par l'intermédiaire d'une diminution de l'expression de l'acétyl-CoA carboxylase dans des hépatocytes de rats (ACC) (Brown et al., 2007). En accord avec ces résultats, l'activation du complexe mTOR1 augmente l'expression et l'activation des facteurs de transcription *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR γ) et *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c) et permet ainsi de stimuler la lipogénèse dans le foie et la différenciation de préadipocytes en adipocytes (Laplante and Sabatini, 2009). Une étude a également rapporté que la stimulation de mTOR1, tout comme la délétion de 4E-BP1 et 4E-BP2 dans le tissu adipeux, permettait de stimuler l'expression de ETS-related gene-1 (Egr1) et ainsi de bloquer la lipolyse par inhibition de l'expression de l'Adipose triglyceride lipase (ATGL) (Singh et al., 2015). Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent qu'une inhibition de mTOR ou de ses cibles tend à diminuer la lipogénèse par diverses voies tandis que son activation l'augmente.

De la même manière, une inhibition de l'activité de mTOR1 diminue le transport du glucose ainsi que la synthèse de glycogène dans des hépatocytes respectivement de 20 et 30% (Brown et al., 2007).

1.4.1.3 Rôle dans le contrôle de la synthèse protéique et de la protéolyse

mTOR a pour cible 4E-BP1 et p70S6K1 impliqués dans le contrôle de l'initiation de la traduction des ARN messagers en protéines. 4E-BP1 non phosphorylé est lié à eIF4E ce qui empêche ce dernier de se lier à un autre facteur d'initiation eIF4G et prévient la formation du complexe d'initiation de la traduction avec la sous-unité ribosomale 40S. La phosphorylation de 4E-BP1 par mTOR sur les sites thréonine 37 et 46 réduit l'affinité de 4E-BP1 pour eIF4E et permet la formation de ce complexe d'initiation (Kimball, 2002). En parallèle, l'activation de p70S6K1 par phosphorylation permet à cette protéine kinase de phosphoryler en retour la protéine ribosomale S6, un composant de la sous-unité ribosomale 40S et permet l'initiation de la traduction (Meyuhas, 2000). Toutefois, il est important de noter que le lien entre la stimulation de la voie mTOR1 et de ses cibles impliqués dans le contrôle de l'initiation de la traduction protéique et l'intensité de la protéosynthèse est encore peu clair.

mTOR est aussi impliquée dans le contrôle de la protéolyse notamment en inhibant la voie de l'autophagie (Shintani and Klionsky, 2004) par l'intermédiaire de l'activation de la protéine kinase p70S6K1 (Scott et al., 2004) et en s'opposant à l'activation de ULK1, protéine kinase qui est impliqué dans le recrutement des protéines ATG (Kim et al., 2011).

1.4.1.4 Rôle dans le contrôle de la prise alimentaire

Un rôle direct de mTOR dans le contrôle de la prise alimentaire a été mis en évidence par Cota et al. (Cota, 2006). En effet, ces auteurs ont montré que l'injection intracérébroventriculaire (icv) de leucine

ou de la leptine réduisait la prise alimentaire via une activation de mTOR1 dans l'hypothalamus et que cet effet était aboli par la rapamycine. De même, d'autres activateurs de mTOR1 comme le glucose, les facteurs de croissance, un régime HP réduisent la prise alimentaire (Cota et al., 2008; Ropelle et al., 2008) au contraire d'un régime gras qui réduit l'activité de mTOR dans l'hypothalamus et augmente la prise alimentaire (Cota et al., 2008).

Les effets de mTOR1 sur la prise alimentaire sont probablement médiés par la protéine kinase cible p70S6K1 car l'injection d'un adénovirus dans l'hypothalamus médiobasal contenant une version dominante négative de p70S6K1 augmente la prise alimentaire, tandis que la surexpression d'une version constitutivement active de cette protéine la diminue (Blouet et al., 2008; Ono et al., 2008). En accord avec ces résultats, les travaux de Cota ont montré que l'effet anorexigène de la leptine était supprimé chez des souris n'exprimant pas le gène codant pour p70S6K1 (Cota et al., 2008).

1.4.1.5 Réponse de l'activité de mTOR aux conditions nutritionnelles et hormonales

L'activité de mTOR1 répond à des messages hormonaux et nutritionnels. Chez le rat, la phosphorylation de mTOR1 est augmentée sous régime HP dans le foie (Chotechuang et al., 2009) et dans l'hypothalamus (Ropelle et al., 2008). Dans le foie, les acides aminés ramifiés, et en particulier la leucine, peuvent aussi activer mTOR1 et ses cibles en présence d'insuline et stimuler l'initiation de la synthèse protéique (Escobar, 2005; Fox et al., 1998; Ijichi et al., 2003; Meijer and Dubbelhuis, 2004; Shigemitsu et al., 1999). Enfin, il a été observé que la supplémentation du repas en arginine chez des porcelets entraîne une augmentation de la phosphorylation, donc de l'activation, de mTOR1 et de ses cibles dont 4E-BP1 dans le muscle (Yao et al., 2008). La disponibilité en acides aminés peut aussi agir via une action sur l'interaction entre Raptor et mTOR, facilitant ainsi l'accès de mTOR1 à ses substrats (Hay and Sonenberg, 2004). Au contraire, la diminution de la disponibilité en acides aminés tend à diminuer la phosphorylation de mTOR et réduit également les possibilités d'assemblage du complexe mTOR1 ce qui a pour conséquence de réduire la synthèse protéique et de faciliter l'autophagie (Anthony, 2015).

mTOR1 est également sensible à la disponibilité en glucose. En effet, des cellules HT22 (lignée de cellules immortelles de l'hippocampe) traitées avec de fortes concentrations en glucose présentent une plus forte phosphorylation de mTOR et de sa cible p70S6K1 (Liu et al., 2015). Concernant la réponse de mTOR à la disponibilité en lipides, il a été montré que la consommation d'un régime gras augmente la phosphorylation des complexes mTOR1 et mTOR2 et de leurs cibles dans le muscle (Rivas et al., 2009) mais la diminue dans l'hypothalamus (Cota et al., 2008) et dans le foie contrant ainsi l'effet stimulateur des acides aminés (Kimball et al., 2015).

mTOR1 intègre enfin des messages hormonaux. Il a été observé que sa phosphorylation était augmentée par l'insuline et par le facteur de croissance *insulin-like growth factor 1* (IGF1) par l'intermédiaire de la protéine kinase Akt (Proud, 2004).

1.4.2 Les senseurs des acides aminés: AMPK

1.4.2.1 Généralités

L' *adenosine monophosphate activated protein kinase* (AMPK) est une protéine kinase ubiquitaire très bien conservée servant de senseur de l'énergie intracellulaire (Viollet et al., 2007). Il s'agit d'une protéine à structure quaternaire composée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ existants sous plusieurs isoformes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, et $\gamma 3$).

L'AMPK est activée par phosphorylation de la sous-unité α par des kinases en amont comme le *tumor repressor* LKB1 dans le foie et le muscle strié squelettique (Hardie, 2004; Sakamoto et al., 2005) et *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2* (CaMKK2) dans le cerveau principalement (Anderson et al., 2008; Hawley et al., 2005). Une étude a aussi montré que *Transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1) pouvait phosphoryler l'AMPK (Momcilovic et al., 2006). Cette phosphorylation multiplie par 100 l'activité de la sous-unité catalytique α (Hawley et al., 1996).

La phosphorylation d'AMPK survient principalement lors d'une déplétion de la disponibilité en ATP ou une augmentation du ratio AMP:ATP dans la cellule. L'AMP vient alors se fixer sur des structures en tandem cystathionine- β -synthase (CBS) conduisant à un changement conformationnel de l'AMPK ce qui permet d'exposer la boucle d'activation de la sous-unité catalytique α et d'en phosphoryler le résidu thréonine Thr172 mais aussi d'inhiber sa déphosphorylation (Hawley et al., 1996).

La phosphorylation de l'AMPK est réversible et probablement médiée par des protéines phosphatases comme la protéine phosphatase-2C (PP2C) ou la protéine phosphatase-2A (PP2A) (Sanders et al., 2007; Wang, 2004; Wu et al., 2007).

1.4.2.2 Rôle dans le métabolisme énergétique

Lorsque l'AMPK est activée par phosphorylation, celle-ci va réguler un certain nombre de voies métaboliques afin de restaurer la balance énergétique de la cellule. Elle va ainsi inhiber les voies anaboliques consommatrices d'ATP comme la synthèse d'acides gras et la synthèse de cholestérol et stimuler les voies cataboliques productrices d'ATP comme la glycolyse et l'oxydation des acides gras (Carling 2004; Viollet et al. 2007).

Les effets de l'AMPK sont médiés par des réponses à court-terme, via la phosphorylation de protéines de régulation, et à long terme via la modulation de l'expression de certains gènes. L'AMPK désactive par phosphorylation l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Velasco et al., 1997) et l'hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) (Hardie, 2004), inhibe la glycerol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) (Muoio et al., 1999) et le facteur de transcription *carbohydrate-responsive element-binding protein* (Chrebp) (Kawaguchi et al., 2002) ce qui participe aussi à la baisse de la lipogénèse et de la synthèse de cholestérol.

En modulant l'activité de l'ACC par phosphorylation sur le résidu Sérine 79, l'AMPK contrôle aussi directement l'oxydation et la synthèse des acides gras. En effet, l'ACC est une enzyme responsable de la synthèse de malonyl-coA, qui est à la fois un précurseur de la lipogénèse et un inhibiteur de l'oxydation mitochondriale des acides gras via une régulation allostérique de la carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), une protéine qui contrôle l'entrée des acyl-coA dans la mitochondrie. Ainsi l'augmentation de l'activité de l'AMPK inhibe la synthèse de malonyl-coA ce qui a pour conséquence une réduction de la synthèse et une augmentation de l'oxydation des acides gras (Viollet et al., 2006). L'AMPK peut également activer la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) qui catalyse la réaction du malonyl-coA en acétyl-coA et ainsi réduire la concentration intracellulaire de malonyl-coA (Assifi, 2005). L'AMPK phosphoryle aussi SREBP-1c ce qui entraîne une inhibition de son clivage et de sa translocation au niveau du noyau réprimant ainsi les gènes de la lipogénèse comme la *fatty acid synthase* (FAS) et l'ACC. Enfin, il a été montré que l'AMPK inhibe l'activité de l'hormone sensitive lipase (HSL) dans le tissu adipeux (Gaidhu and Ceddia, 2011), augmente l'expression de *peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1- α* (PGC1- α) impliqué dans la biogénèse mitochondriale (Foretz et al., 2010a) et est indispensable au brunissement du tissu adipeux blanc en tissu adipeux beige (Mottillo et al., 2016), au moins du point de vue morphologique (Abdul-Rahman et al., 2016).

L'AMPK est aussi fortement impliquée dans le contrôle du métabolisme glucidique et notamment de la néoglucogénèse, de la glycogénogénèse et de la glycolyse.

Les résultats concernant le rôle de l'AMPK dans le contrôle de la néoglucogénèse restent toutefois contradictoires. En effet, d'une part l'utilisation d'un activateur de l'AMPK, le 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR), inhibe la production hépatique de glucose chez des rats obèses insulino-résistants ou non (Bergeron et al., 2001) et la délétion de la protéine kinase LKB1 en amont de l'AMPK conduit à une augmentation de la glycémie à jeun (Shaw, 2005). Ces effets pourraient être médiés par une phosphorylation du co-activateur *transducer of regulated cyclic-AMP response element binding activator 2* (TORC2) par l'AMPK. Ceci empêcherait alors sa translocation et l'expression de PGC1 α qui a un rôle important dans l'activation des gènes impliqués dans la néoglucogénèse (G6Pase, PEPCK) (Koo et al., 2005). Toutefois, d'autres travaux suggèrent que l'AMPK ne serait pas directement impliquée dans la production hépatique de glucose. En effet, la délétion des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans le foie de souris n'a pas de conséquence sur la glycémie et sur l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogénèse. Par ailleurs, l'incubation d'hépatocytes où l'AMPK ou LKB1 sont délétées avec de la metformine induit une baisse de l'expression de la PEPCK et de la G6Pase comparable à celle observée dans des hépatocytes normaux (Foretz et al., 2010a).

La synthèse de glycogène, processus très consommateur en énergie est aussi régulé par l'AMPK. En effet, les isoformes de la glycogène synthase sont phosphorylées par l'AMPK ce qui conduit à leur inactivation (Carling and Hardie, 1989).

Par ailleurs, en situation d'ischémie, l'AMPK phosphoryle la phosphofructokinase-2 (PFK2) cardiaque (Marsin et al., 2000). L'AMPK a également pour cible les formes ubiquitaires et inductibles de PFK2 qu'elle phosphoryle sur le résidu Ser461 (Bando, 2005). La phosphorylation de la PFK2 a pour conséquence d'augmenter la concentration du fructose-2,6-bisphosphate intracellulaire, un puissant stimulateur allostérique de la PFK1, ce qui stimule la glycolyse. Enfin, l'AMPK agit sur la translocation du transporteur du *glucose solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4* (GLUT4) dans le myocarde et y stimule ainsi le transport du glucose (Russell et al., 1999).

1.4.2.3 Rôle dans le contrôle de la synthèse protéique ou de la protéolyse

Lors de la traduction protéique, la phase d'élongation coûte l'équivalent d'environ 4 ATP par liaison peptidique formée. Ce coût énergétique important justifie pourquoi l'AMPK est impliquée dans le contrôle de la synthèse protéique et notamment de l'étape de traduction (Viollet et al., 2006).

L'action de l'AMPK sur la synthèse protéique se fait essentiellement via une inhibition de mTOR. L'AMPK peut effectivement phosphoryler et activer le *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2), une protéine qui forme un complexe avec *tuberous sclerosis complex 1* (TSC1) et stimule l'activité GTPase de RHEB. Ceci résulte en la conversion de RHEB-GTP en sa forme inactive RHEB-GDP qui n'est alors plus en mesure d'activer par phosphorylation mTOR1 (Luo et al., 2005). Par ailleurs, des approches protéomiques ont montré que l'AMPK était capable de phosphoryler directement la protéine Raptor associée à mTOR sur deux résidus Sérine et ainsi d'inhiber son activité (Gwinn et al., 2008).

En plus d'une action inhibitrice au niveau de la traduction de la synthèse protéique par l'intermédiaire de mTOR1, l'AMPK peut aussi bloquer l'étape d'élongation. En effet, l'AMPK a pour cible la kinase eEF2K et l'active par phosphorylation sur un résidu sérine (Ser398). Cette kinase va alors phosphoryler le facteur d'élongation eEF2 ce qui a pour conséquence d'empêcher sa fixation sur les ribosomes et bloque ainsi l'étape d'élongation. Par ailleurs, il a été montré que p70S6K1, kinase activée par mTOR, pouvait inhiber eEF2K par phosphorylation sur un autre résidu sérine (Ser366) (Browne et al., 2004), cette action inhibitrice est donc diminuée si l'activité de mTOR1 est réprimée.

Enfin, l'AMPK a un rôle important dans le contrôle de l'activité du protéasome et de l'autophagie. En effet, l'addition d'activateurs de l'AMPK dans un milieu contenant des fibroblastes de souris inhibe l'activité du protéasome et cet effet disparaît lorsque les deux isoformes de la sous-unité catalytique α de l'AMPK ne sont pas exprimés (Viana et al., 2008). L'inhibition de l'AMPK quant à elle inhibe complètement l'autophagie dans des hépatocytes (Meley et al., 2006). En accord avec ces résultats, il a été montré que l'AMPK est indispensable à l'activation par phosphorylation de la kinase ULK1 en réponse à la restriction en glucose (Kim et al., 2011). Les rôles de l'AMPK dans le métabolisme des glucides, lipides et protéines sont résumés dans la Figure 10.

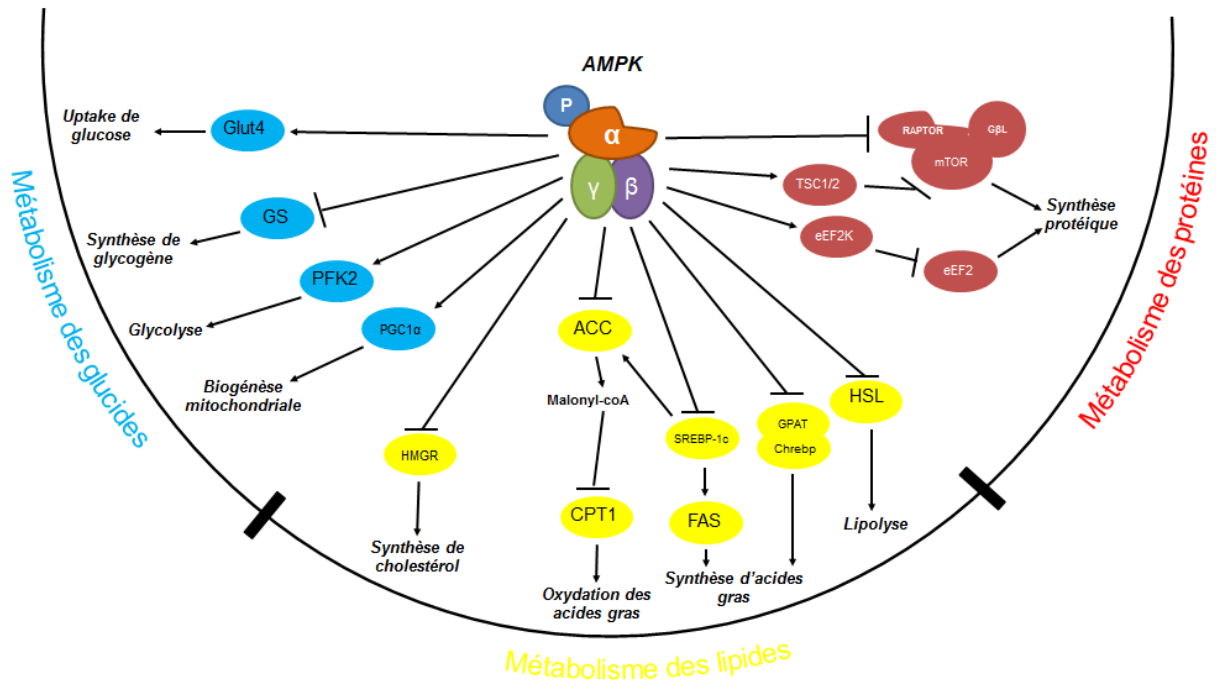


Figure 10: Rôle de l'AMPK dans le métabolisme énergétique et la synthèse protéique

L'AMPK a une place importante dans le contrôle du métabolisme des glucides, lipides et protéines. Son activation entraîne une stimulation des voies permettant de produire de l'ATP comme la glycolyse, le prélèvement du glucose, la biogénèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras et inhibe les voies consommatrices d'ATP comme la synthèse de glycogène, de cholestérol, d'acides gras et de protéines.

1.4.2.4 Rôle dans le contrôle de la prise alimentaire

L'expression d'une forme constitutivement active de l'AMPK dans l'hypothalamus médiobasal augmente l'expression des neuropeptides orexigènes *neuropeptide Y* (NPY) et *agouti-related peptide* (AgRP) dans le noyau arqué (Minokoshi et al., 2004) alors que la baisse de l'activité de l'AMPK est directement associée à une inhibition de l'expression de NPY et à une stimulation du précurseur protéique pro-opiomélanocortine (POMC) (Ropelle et al., 2008).

Les effets de l'AMPK sur la prise alimentaire pourraient être médiés directement par la concentration en malonyl-CoA dans les cellules de l'hypothalamus. En effet, le malonyl-CoA, produit de l'ACC qui est une enzyme cible inhibée par l'AMPK (Figure 10), sert d'indicateur du statut énergétique dans les cellules de l'hypothalamus (Lane et al., 2008). Ainsi l'augmentation de la concentration de malonyl-CoA dans l'hypothalamus par inhibition de la FAS diminue la prise alimentaire tandis que la surexpression de la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) qui réduit la concentration de malonyl-CoA l'augmente. En résumé, l'activation de l'AMPK inhibe l'activation de l'ACC conduisant à une plus faible synthèse de malonyl-CoA ce qui aurait pour conséquence de stimuler la prise alimentaire (Lane et al., 2008).

1.4.2.5 Réponse de l'activité de l'AMPK aux conditions nutritionnelles et hormonales

L'activité de l'AMPK est stimulée par phosphorylation sur le résidu Thréonine 172 en réponse à une augmentation du ratio AMP:ATP. Ainsi, les conditions nutritionnelles en modifiant ce ratio peuvent modifier l'état de phosphorylation de l'AMPK.

Trois études ont ainsi rapporté que la phosphorylation de l'AMPK dans l'hypothalamus et le foie était sensible à la transition à jeun/nourri (Kim et al., 2004; Minokoshi et al., 2004; Suchankova et al., 2005). De même, il a été démontré que l'AMPK est activée par phosphorylation dans le foie lors d'une restriction énergétique (Jiang et al., 2008) ou lors d'une période de jeûne de 24 heures (Munday et al., 1991; Winder et al., 1997). L'AMPK est par contre désactivée lorsque la concentration en glucose est augmentée dans des myocytes en culture (Itani et al., 2003), des cellules d'hépatomes HepG2 (Zang et al., 2004) ou des hépatocytes (Chotechuang et al., 2009). En accord avec ces résultats, il a été montré que maintenir une hyperglycémie par perfusion de glucose diminuait l'activité de AMPK dans le muscle et le foie chez le rat (Kraegen, 2005). De même, l'injection icv de glucose inhibe l'activité de l'AMPK dans plusieurs zones de l'hypothalamus (Minokoshi et al., 2004). De façon surprenante, la consommation d'un régime riche en sucres mais faibles en protéines induit une augmentation du contenu en AMPK et de sa forme phosphorylée dans le muscle *soleus* de rats en croissance sans pour autant avoir d'impact sur le ratio P-AMPK:AMPK (Batistela et al., 2014). Une étude similaire ne rapporte toutefois aucun effet d'un tel régime sur les contenus en AMPK et P-AMPK et leur ratio dans le muscle *extensor digitorum longus* (dos Santos et al., 2016).

La disponibilité énergétique cellulaire peut aussi être indiquée par la concentration en glycogène de la cellule. Il a été montré que la sous-unité β de l'AMPK était lié au glycogène (Hudson et al., 2003; Polekhina et al., 2003) et que le glycogène une fois lié inhibait l'activité de l'AMPK (Derave et al., 2000; Wojtaszewski et al., 2002).

L'augmentation de l'apport en protéines dans le régime induit une diminution l'activité AMPK dans le foie (Chotechuang et al., 2009) et dans l'hypothalamus (Ropelle et al., 2008). Cette dernière étude montre également que la consommation d'un régime riche en protéines est associée à un plus faible niveau d'AMP et un plus faible ratio AMP:ATP en comparaison avec un régime normo protéique. En accord avec ces résultats, les acides aminés (comme le glucose), diminuent la phosphorylation de l'AMPK dans des hépatocytes (Chotechuang et al., 2009) et dans des cellules β pancréatiques (Leclerc and Rutter, 2004). La leucine, en particulier, inhibe la phosphorylation de l'AMPK dans des myoblastes en culture (Du et al., 2006) ou dans l'hypothalamus de souris après une injection icv (Ropelle et al., 2008). Toutefois, les résultats de Kimball et al. ont montré une induction de la phosphorylation de l'AMPK en réponse à de fortes concentrations en acides aminés dans des hépatocytes (Kimball, 2004). Les mécanismes à l'origine de cette action paradoxale des acides aminés restent incompris mais repose probablement sur les concentrations en acides aminés utilisés dans le milieu.

L'activité de l'AMPK est sensible à la disponibilité en lipides dans la cellule, une augmentation de leur disponibilité ayant une action stimulatrice sur l'activité de l'AMPK. Clark et al. ont ainsi montré une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK dans des cœurs de rats perfusés avec des acides gras saturés sans changement du statut énergétique de la cellule (Clark et al., 2004). De même, l'addition d'acides gras polyinsaturés dans un régime permet de diminuer l'inhibition de la phosphorylation de l'AMPK dans les foies de rats renourris après un jeûne de 21 heures (Suchankova et al., 2005). Dans une étude *in vivo*, Watt et al. ont montré que l'incubation de cellules musculaires avec de l'acide palmitique ou linoléique augmentait la phosphorylation de l'AMPK de 56 et 38 % respectivement en comparaison de cellules non traitées (Watt et al., 2006).

L'AMPK intègre enfin des messages hormonaux. Ainsi, dans l'hypothalamus, la leptine inhibe tandis que l'adiponectine stimule l'activité de l'AMPK (Minokoshi et al., 2008). Dans le muscle squelettique, ces deux hormones stimulent l'activation de l'AMPK ce qui va entraîner une augmentation de l'oxydation des acides gras. L'insuline quant à elle inhibe l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus (Minokoshi et al., 2004) et entraîne la phosphorylation de la sous-unité catalytique alpha au niveau du résidu Sérine (485/491) inhibant son activité dans des hépatocytes ou des myocytes en culture (Valentine et al., 2014)

Les réponses de l'activité de l'AMPK aux différents stimuli nutritionnels ou hormonaux sont récapitulées dans le Tableau 2 :

Tableau 2: Effet des différents stimuli nutritionnels ou hormonaux sur l'activité de l'AMPK

| Stimuli nutritionnel ou hormonal | Tissu | Impact sur l'activité de l'AMPK | Références |
|--|--------------------------|---------------------------------|--|
| Transition à jeun nourri | Foie | ↓ | (Suchankova et al., 2005) |
| | Hypothalamus | | (Kim et al., 2004; Minokoshi et al., 2004) |
| Restriction énergétique | Foie | ↑ | (Jiang et al., 2008) |
| Jeun | Foie | ↑ | (Munday et al., 1991; Winder et al., 1997) |
| ↑[Glucose] | Myocyte | ↓ | (Itani et al., 2003) |
| | Hépatocytes | | (Chotechuang et al., 2009) |
| | Hépatome | | (Zang et al., 2004) |
| | Hypothalamus | | (Minokoshi et al., 2004) |
| | Muscle | | (Kraegen, 2005) |
| | Foie | | |
| Consommation d'un régime hyperglucidique | Muscle | ↑ | (Batistela et al., 2014) |
| | Muscle | → | (dos Santos et al., 2016) |
| ↑[Acides aminés] | Hépatocytes | ↑ | (Kimball, 2004) |
| | Hépatocytes | ↓ | (Chotechuang et al., 2009) |
| | Cellules β-pancréatiques | | (Leclerc and Rutter, 2004) |
| ↑[Leucine] | Myoblastes | ↓ | (Du et al., 2006) |
| | Hypothalamus | | (Ropelle et al., 2008) |
| Consommation d'un régime HP | Foie | ↓ | (Chotechuang et al., 2009) |
| | Hypothalamus | | (Ropelle et al., 2008) |
| ↑[Lipides] | Myocytes | ↑ | (Watt et al., 2006) |
| | Coeur | | (Clark et al., 2004) |
| | Foie | | (Suchankova et al., 2005) |
| Leptine | Hypothalamus | ↓ | (Minokoshi et al., 2008) |
| | Muscle | ↑ | |
| Adiponectine | Hypothalamus | ↑ | (Minokoshi et al., 2008) |
| | Muscle | | |
| Insuline | Myocytes | ↓ | (Valentine et al., 2014) |
| | Hépatocytes | | (Minokoshi et al., 2004) |
| | Hypothalamus | | |

1.4.3 Les senseurs des acides aminés: GCN2

1.4.3.1 Généralités

La kinase *General control non-derepressible 2* (GCN2) aussi appelée chez les mammifères *eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase* (eIF2AK4) a été identifiée pour la première fois chez la levure comme acteur central de la signalisation de la déficience en acides aminés (Baird and Wek, 2012; Chaveroux et al., 2010; Hinnebusch, 2005). GCN2 est composée de cinq domaines différents (RWD, pseudokinase, protéine kinase, HisRS-like, and C-terminal (CTD)) et est activée par autophosphorylation en réponse à la déficience en acides aminés (Chaveroux et al., 2010).

1.4.3.2 Rôle dans le métabolisme énergétique

Le rôle de GCN2 dans le contrôle du métabolisme énergétique est encore peu connu. Toutefois quelques études, ayant recours à des modèles de souris où GCN2 a été délété ont démontré que cette kinase intervient dans le contrôle de la néoglucogénèse, de la lipogénèse et de la sécrétion de *fibroblast growth factor 21* (FGF21).

Guo et Cavener ont montré qu'en réponse à un régime déficient en leucine, des souris KO-GCN2 ne sont pas capables de diminuer la synthèse des TG et l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse comme SREBP-1c et la FAS, ce qui conduit au développement d'une stéatose hépatique (Guo and Cavener, 2007). GCN2 est aussi impliqué dans le contrôle de la néoglucogénèse. En effet, Xu a observé chez des souris KO-GCN2 total une moindre augmentation des taux circulants de glucose suite à l'injection de pyruvate, un précurseur du glucose, ce qui suggère une moindre activation de la néoglucogénèse chez les souris n'exprimant pas GCN2. L'étude rapporte également que les souris KO-GCN2 ne sont pas capables de réprimer l'expression de la PEPCCK et de CCAAT *enhancer-binding protein-β* (C/EBPβ), deux protéines clefs impliquées dans la néoglucogénèse, lors de la transition à jeun/nourri (Xu et al., 2013).

Enfin, GCN2 est impliqué dans le contrôle de la sécrétion de FGF21, facteur fibroblastique impliqué dans le contrôle de l'oxydation et la synthèse des acides gras et la néoglucogénèse (Laeger et al., 2014b).

1.4.3.3 Rôle dans le contrôle de la synthèse protéique ou de la protéolyse

Lors d'une baisse de la disponibilité en un ou plusieurs acides aminés, les ARN de transfert non associés aux acides aminés se lient aux domaines HisRS-like et CTD de GCN2 ce qui résulte en un changement de conformation allostérique de la protéine. Ceci va conduire à son autophosphorylation et son activation au niveau des thréonines 898 et thréonines 903 situées dans la boucle d'activation du domaine protéine kinase lui permettant en retour de phosphoryler sa protéine cible eIF2α et de bloquer la traduction protéique (Harding et al., 2000; Romano et al., 1998; Sood et al., 2000). eIF2α est indispensable à la traduction protéique car il fournit aux ribosomes les méthionyl-tRNA en

hydrolysant son GTP en GDP lors de la première étape de la traduction. Lorsque eIF2 α est phosphorylé au niveau de la sérine 51 par GCN2 cela empêche le facteur d'initiation de la traduction eIF2B de recycler le GDP en GTP et de rendre à nouveau fonctionnel eIF2 α (Dever and Hinnebusch, 2005). Ainsi, il a été montré que les souris chez lesquelles GCN2 est délété présentent une synthèse protéique aberrante dans le foie sous régime déficient en leucine (Anthony et al., 2004). L'activation par phosphorylation d'eIF2 α permet d'inhiber la synthèse protéique globale et est indispensable à l'activation de l'autophagie en réponse à la déficience en acides aminés. Cette phosphorylation permet également d'augmenter la traduction du facteur de transcription appelé *activating transcription factor 4* (ATF4) chez les eucaryotes et *general control non-derepressible 4* (GCN4) chez la levure. Ce dernier, en se fixant sur un élément de réponse aux acides aminés, promeut en retour l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation au stress et codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés (Hinnebusch, 2005; Sikalidis et al., 2011). Parmi les gènes dont l'expression est induite par ATF4 figure CHOP pour *C/EBP homologous protein*, qui a un rôle dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire ainsi que dans le métabolisme énergétique. (Averous et al., 2004).

1.4.3.4 Rôle dans le contrôle de la prise alimentaire

Il existe un mécanisme inné permettant aux omnivores d'exprimer une aversion pour les aliments ayant une déficience en un ou plusieurs acides aminés (Gietzen, 1993). Cette aversion permet ainsi à l'individu d'orienter son choix vers des aliments équilibrés afin de maintenir l'homéostasie des acides aminés indispensables (Morrison et al., 2012).

On sait que la consommation de régimes déséquilibrés en acides aminés induit une augmentation de la forme phosphorylée de eIF2 α dans les neurones du cortex piriforme antérieur, laissant supposer que eIF2 α ainsi que GCN2 en amont pourraient être impliqués dans le phénomène d'aversion en réponse à une déficience en acides aminés (Gietzen et al., 2004). Maurin et al. ont ainsi montré que chez des souris où GCN2 était délétée dans le cerveau, le niveau de phosphorylation de eIF2 α dans les neurones du cortex piriforme antérieur ainsi que l'amplitude du phénomène aversif étaient tous deux diminués (Maurin et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que GCN2 était aussi activé dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus en réponse à un régime déficient en leucine et que, dans cette zone précise, la délétion partielle de GCN2 par injection d'ARN interférents supprimait en partie le phénomène aversif. Cette même étude rapporte aussi que l'activation de GCN2 dans l'hypothalamus médiobasal par injection de L-leucinol, ou l'inhibition de la phosphorylation d'eIF2 α par le salubrinal, étaient tous deux capables de diminuer la prise alimentaire chez des souris sauvages (Maurin et al., 2014).

Toutefois, une étude récente rapporte que GCN2 n'est pas activé dans le cerveau en réponse à la consommation d'un régime déficient en acides aminés. Par ailleurs, aucune différence de prise alimentaire n'est observée entre des souris sauvages et des souris KO-GCN2 nourries avec des

régimes déficients en leucine, thréonine ou en acides aminés, remettant en question les précédents résultats de la littérature (Leib and Knight, 2015).

1.4.3.5 Réponse de l'activité de GCN2 aux conditions nutritionnelles et hormonales

Comme évoqué précédemment, GCN2 répond à la déficience en acides aminés et bloque la synthèse protéique par phosphorylation d'eIF2 α .

Ainsi, dans des cultures cellulaires d'hépatomes, la déficience en un seul acide aminé, indispensable ou non, conduit à une augmentation de la phosphorylation de eIF2 α et de l'activité de GCN2 (Kilberg et al., 2005; Palii et al., 2009) (Figure 11).

:

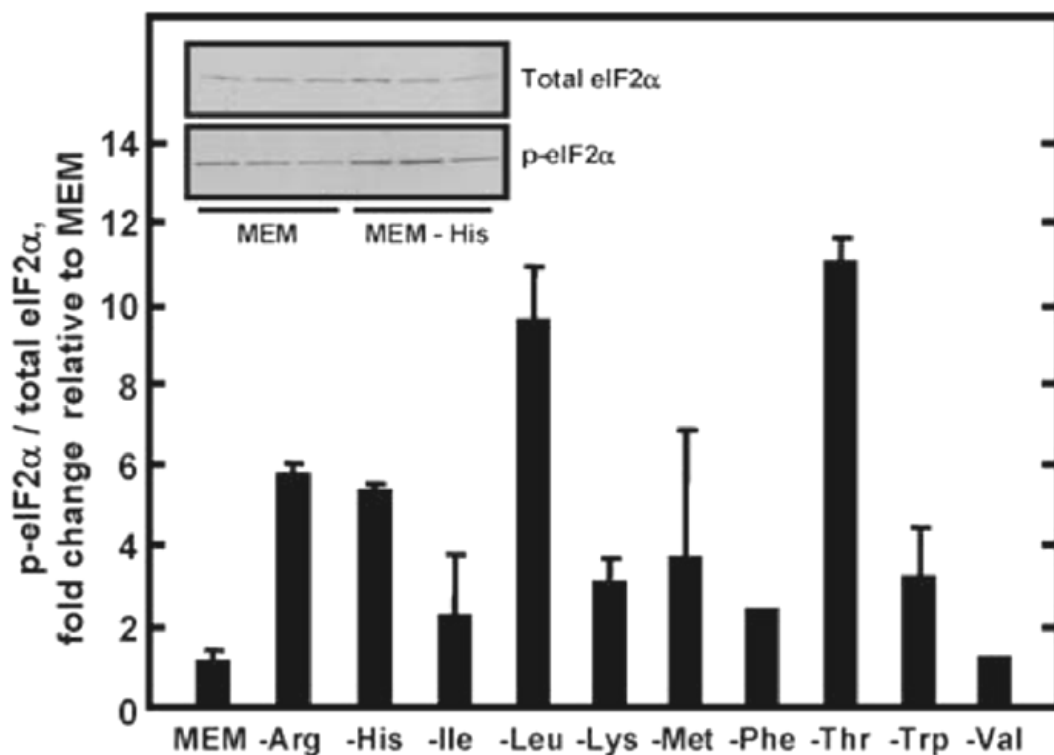


Figure 11: Conséquences de la déficience en un acide aminé sur la phosphorylation d'eIF2 α (Palii et al., 2009).

Des cultures d'hépatomes ont été réalisées dans un milieu dans lequel un acide aminé a été retiré (arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine). Les mesures de la forme phosphorylée et totale de eIF2 α ont été réalisées par Western-Blot. La figure représente le ratio de ces deux formes.

En plus d'être un marqueur de la déficience en acides-aminés, GCN2 signale également la surabondance en acides aminés. Chotechuang et al. ont en effet montré que les niveaux de phosphorylation de GCN2 dans le foie étaient diminués à jeun et à l'état nourri chez des rats nourris pendant 14 jours avec un régime à forte teneur en protéines (Chotechuang et al., 2009).

GCN2 intègre également un signal glucose. Il a été montré que la déficience en glucose entraînait une augmentation de la phosphorylation de GCN2 et de sa cible eIF2 α (Ye et al., 2010).

1.4.4 Les transporteurs d'acides aminés

Le groupe des *solute carrier* est une famille de transporteurs, pour la plupart membranaires, qui regroupe 300 protéines regroupées en 52 familles (Hediger et al., 2004). Parmi ces 52 familles, 6 sont impliquées dans le transport des acides aminés (SLC1, SLC6, SLC7, SLC36, SLC38, SLC43) (Taylor, 2014).

Les transporteurs d'acides aminés jouent aussi un rôle dans la détection des acides aminés. En effet, il a bien été établi qu'ils disposaient d'un rôle clé dans le maintien de la concentration en acides aminés libres dans la cellule. Ceci suggère que les activités des voies de signalisation intracellulaires mTOR, AMPK et GCN2 dépendent de l'activité de ces transporteurs situés sur la membrane cellulaire (Taylor, 2014). Les exemples sont nombreux concernant la phosphorylation de mTOR1. Il a été observé que l'activation de mTOR1 par les acides aminés nécessite la présence du transporteur *Proton-assisted Amino acid Transporter 1* (PAT1)/SLC36A1 (Ögmundsdóttir et al., 2012). De la même manière, la délétion des gènes codant pour les transporteurs SLC38A2, SLC1A5, SLC7A5 réduit la croissance et la prolifération de cellules en culture parallèlement à une diminution de l'activation de mTOR1 (Nicklin et al., 2009; Sinclair et al., 2013) et la surexpression de SLC7A5 dans des cellules de carcinomes (Elorza et al., 2012) ou de SLC38A2 (Uno et al., 2015) dans le foie entraîne l'activation de mTOR1. Enfin, il semble que le recrutement de mTOR1 au niveau de la membrane du lysosome soit associée à l'accumulation d'acides aminés dans cet organelle et donc à l'activité des transporteurs d'acides aminés situés sur la membrane du lysosome (Zoncu et al., 2011).

2 Modulation du niveau d'apport en acides aminés et conséquences sur la composition corporelle

2.1 Partie introductive

2.1.1 L'obésité et dysfonctions associées

L'OMS définit l'obésité «comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui représente un risque pour la santé». Considérée comme une maladie depuis 1997, l'obésité se caractérise par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 30 kg/m². Selon l'OMS, en 2014, plus de 600 millions de personnes dans le monde sont touchées par l'obésité soit 9% de la population mondiale avec de fortes disparités selon les continents. La prise de poids excessive conduisant à l'état d'obésité est due à un déséquilibre de la balance énergétique consécutive à une forte sédentarité et un excès d'apport calorique selon la théorie des « Big Two » factors (Tremblay and Chaput, 2008). L'énergie ingérée en excès est alors stockée sous forme de graisse dans le tissu adipeux. Toutefois, de nombreuses études montrent que l'étiologie de l'obésité est plus complexe combinant des facteurs environnementaux, génétiques et épigénétiques. En effet, selon un rapport de l'OCDE, la prévalence de l'obésité est supérieure à 30% aux Etats-Unis et au Mexique tandis qu'elle est inférieure à 5% au Japon (Sassi, 2010). L'obésité touche également plus les femmes que les hommes : selon l'étude Obépi/Roche de 2012 réalisée sur la population française, 15,7% des femmes contre 14,3% des hommes sont obèses. Il est aussi à noter, selon la même étude, qu'il existe une inégalité sociale face à l'obésité, les populations défavorisées ayant un revenu inférieur à 1200 euros présentent une prévalence de l'obésité de 24.1% tandis que chez les populations avec un revenu supérieur à 3800 celle-ci chute à 8% (Eschwege et al., 2012). La prévalence de l'obésité varie également beaucoup selon les ethnies, concept qui recouvre bien souvent des différences à la fois sociales et génétiques. Ainsi aux Etats-Unis, une étude récente rapporte que l'obésité sévère est plus importante chez les enfants d'origine hispanique (11.4%) ou noire (16.6%) que chez des enfants d'origine caucasienne (8.4%) ou asiatique (7.9%) (Ford et al., 2016).

L'obésité est associée à de nombreuses comorbidités responsables de nombreux décès chaque année. Outre une augmentation de maladies telles que le cancer, l'obésité est associée à de nombreuses dysfonctions métaboliques qui sont des facteurs de risque de développement du diabète de type 2, de troubles cardiovasculaires et d'accident vasculaire cérébral (hypertension, hypercholestérolémie, obésité abdominale, hyperinsulinémie, hyperglycémie). Un individu contractant au moins trois de ces dysfonctions métaboliques est atteint de ce qui est appelé le « syndrome métabolique » (Pritchett, Foreyt, et Mann 2005). Les interventions hygiéno-diététiques associant un niveau d'exercice modéré à un régime de restriction permettent d'améliorer les symptômes associés à l'obésité et au syndrome

métabolique du moins à court-terme (Pritchett et al., 2005). Mais il n'existe encore pas de consensus sur le type de régime le plus efficace (Sacks et al., 2009). Toutefois, il a été montré, chez l'homme et chez l'animal, que la modulation de la quantité des protéines dans le régime pouvait permettre d'améliorer la composition corporelle.

2.1.2 L'hypothèse de l'effet de levier des protéines

Dès le début XXème siècle, des recherches suggèrent que lorsque des rats sont mis en position de choix alimentaire, ils régulent leur apport protéique de telle manière à ce qu'il soit adapté à leurs besoins nutritionnels (Menaker and Navia, 1973). Sur cette idée, Rozin et al. ont montré que plus la quantité de protéines est faible dans l'aliment plus les rats consomment de cet aliment pour garantir leur apport protéique (Rozin, 1968). En accord avec ces résultats, des expériences chez les souris ont montré une augmentation de la prise alimentaire lorsque la concentration en protéines baisse aux dépens des glucides (Sørensen et al. 2008).

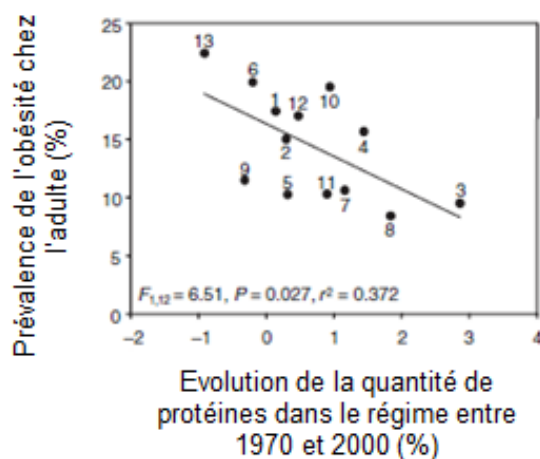


Figure 12: Corrélation entre l'évolution de la quantité de protéines dans le régime entre 1970 et 2000 et la prévalence de l'obésité chez l'adulte en 2000 dans 13 pays (Simpson and Raubenheimer, 2005).

(1 : Australie, 2 : Canada, 3 : Danemark, 4 : Finlande, 5 : France, 6 : Allemagne, 7 : Italie, 8 : Pays-Bas, 9 : Nouvelle-Zélande, 10 : Espagne, 11 : Suède, 12 : Royaume-Uni, 13 : Etats-Unis)

et faible teneur en protéines, expliquerait une prise de poids accrue chez ces individus. Afin d'illustrer leur hypothèse, ils ont montré qu'il y avait une corrélation étroite entre la variation de la quantité de protéines dans le régime entre les années 1970 et 2000 et la prévalence de l'obésité chez l'adulte (Voir Figure 12 ci-dessus) (Simpson et Raubenheimer 2005). Ceci suggère un rôle central des protéines dans les phénomènes de régulation du poids.

L'hypothèse de l'effet de levier des protéines « protein leverage hypothesis » émise par Simpson and Raubenheimer propose que de manière paradoxale, les protéines, qui ne constituent qu'entre 10 et 15% de l'apport énergétique moyen chez l'adulte, représentent le facteur clé expliquant la prise de poids et l'obésité (Simpson and Raubenheimer, 2005). Ces auteurs ont, en effet, observé que le ratio entre les protéines et les autres nutriments (glucides et lipides) avaient baissé dans l'alimentation. Les individus, selon leur hypothèse, auraient donc tendance à consommer plus pour couvrir leur besoin en protéines. Cette consommation excessive, souvent d'aliments à forte densité énergétique

Nous étudierons donc dans la partie suivante les conséquences sur la composition corporelle des variations d'apport en protéines, tenterons de comprendre les mécanismes sous-jacents et l'implication des voies de signalisation des protéines.

2.2 Régime fort en protéines et conséquences sur la composition corporelle

2.2.1 Introduction sur les régimes hyperprotéiques

2.2.1.1 Utilisation des régimes hyperprotéiques

Il existe un débat important sur l'efficacité des régimes permettant de garantir une perte de poids rapide et pérenne. Certaines études prônent une baisse de la quantité de gras dans l'alimentation tandis que d'autres encouragent une baisse de la quantité de sucres lors de régimes céto-gènes (Freedman et al., 2001; Willett, 1998). En effet, alors que la recommandation pour l'apport en protéines est fixée aux alentours de 0.8 g/kg/jour chez l'adulte (Pesta and Samuel, 2014), l'augmentation des protéines aux dépens des sucres dans le régime jusqu'à des niveaux atteignant 3.5 g/kg/jour est couramment utilisée comme stratégie pour permettre la perte de masse grasse et le maintien de la masse maigre lors de régimes amaigrissants. Ce type de régime appelé régime hyperprotéique (HP) est aussi largement utilisé chez les athlètes en quête de développement musculaire. Déjà, lors des Olympiades de Berlin de 1936, il est rapporté que les athlètes consommaient déjà plus de 800 g de viande par jour (Bilsborough and Mann, 2006)

2.2.1.2 Risques des régimes hyperprotéiques

Les régimes HP populaires recommandent des apports de l'ordre de 71 à 162 grammes par jour (Bilsborough and Mann, 2006) et aucune limite supérieure d'apport n'a été établie. Plusieurs études ont cependant montré que les régimes HP provoquent une hyperfiltration au niveau rénal proche du point de saturation. Une étude prospective menée chez 45,000 hommes âgés de 40 à 75 ans a ainsi montré une association positive entre la consommation de protéines d'origine animale et la survenue de calculs rénaux (Curhan et al., 1993). Cependant, aucun effet d'un apport protéique de l'ordre de 2.8 gramme par jour, soit plus de trois fois l'apport recommandé, n'a été montré sur la fonction rénale chez des bodybuilders (Poortmans and Delalieux, 2000).

Des études de métabolomique ont montré que la consommation de grandes quantités d'acides aminés ramifiés ou aromatiques sous régime gras pouvait conduire à l'accumulation de deux produits de dégradation, le propionyl-CoA et le succinyl-CoA, qui interagissent avec le cycle d'oxydation des acides gras entraînant la fabrication d'acylcarnitine et pouvant ainsi générer un stress au niveau de la mitochondrie (Pesta and Samuel, 2014). Il a été aussi suggéré que les régimes forts en protéines ont une action acidifiante due principalement aux sulfates provenant de l'oxydation des acides aminés soufrés : méthionine et cystéine. Cet effet est contré en partie par une perte calcique au niveau des os et une réduction de leur masse (Barzel and Massey, 1998). Toutefois, cette hypothèse a été réfutée, une étude récente ayant montré que la consommation de régime HP a des effets bénéfiques sur la santé osseuse et l'absorption du calcium au niveau de l'intestin (Cao and Nielsen, 2010).

2.2.2 Effet d'un régime HP sur la composition corporelle et la prise de poids

De nombreuses études rapportent que les régimes HP permettent de diminuer la prise de poids voire de diminuer le poids tout en maintenant la masse maigre chez l'Homme et chez l'animal (Blouet et al., 2008; Clifton et al., 2009; Kim et al., 2014; Lacroix, 2004; Pichon et al., 2006; Skov et al., 1999; Westerterp-Plantenga et al., 2004). Les régimes HP avec restriction calorique sont aussi caractérisés par un meilleur suivi que les autres régimes restrictif ce qui garantit un meilleur maintien de la composition corporelle sur le long terme (Pesta and Samuel, 2014). Chez le rat, il a été montré que la consommation d'un régime, où 50% de l'énergie est apportée par les protéines, réduit de manière drastique au bout de 6 mois le tissu adipeux blanc comparé à un régime normo-protéique (Lacroix, 2004). En accord avec ces résultats, Pichon et al. ont observé que l'augmentation des protéines dans le régime diminue la prise de poids et ce d'autant plus fortement que le ratio glucides/lipides est faible (Pichon et al., 2006). Une autre étude a observé que cette baisse de prise de poids pouvait être associée à une diminution de la taille des adipocytes (Blouet et al., 2006).

Chez l'homme, Clifton et al. ont rapporté qu'un régime HP était plus efficace qu'un régime normoprotéique (NP) pour diminuer la masse grasse chez des individus obèses (Clifton et al., 2009). En outre, Westerterp-Plantenga et al. ont montré que les régimes HP permettaient un meilleur maintien du poids sur le long terme puisque l'augmentation de 20% de la consommation en protéines pendant trois mois après une période d'amaigrissement diminue la reprise de poids de l'ordre de 50% (Westerterp-Plantenga et al., 2004).

2.2.3 Effet d'un régime HP sur la prise alimentaire

2.2.3.1 Caractéristiques satiétogènes des protéines

Les effets bénéfiques des régimes HP sur la prise de masse grasse sont en grande partie dus à leur capacité à infléchir la prise alimentaire (Halton and Hu, 2004; Westerterp-Plantenga, 2008). En effet, les protéines sont décrites comme ayant un effet satiétogène, plus élevé que les autres nutriments, lipides et glucides chez l'Homme et chez l'animal (Bensaïd et al., 2002; Bensaïd et al., 2003; Marmonier et al., 2000). En plus de cet effet satiétogène, les régimes riches en protéines ont été décrit comme étant moins palatable que les autres nutriments sans pour autant causer d'aversion (Bensaïd et al., 2003; Jean et al., 2001). La consommation de protéines permet également de maintenir la satiété pendant une période supérieure aux deux autres nutriments. Il a ainsi été montré chez de jeunes adultes que la consommation de snacks de 240 Kcal composés principalement par des protéines, des sucres ou du gras décalaient l'heure du dîner de 60, 34 et 25 minutes respectivement (Marmonier et al., 2000).

L'effet de diminution de la prise alimentaire de régimes HP est surtout visible lors de l'introduction du nouveau régime. Une fois les animaux habitués aux régime HP, ces derniers tendent à revenir à une prise alimentaire équivalente au régime NP (Blouet et al., 2006).

L'effet des protéines sur la prise alimentaire dépend aussi du type de protéine notamment de sa vitesse de digestion et de son profil en acides aminés. Des études ont montré que les protéines rapides comme les protéines du lactosérum ou du soja inhibent la prise alimentaire à court terme (1 h) de façon plus importante que les protéines plus lentement digérées ou absorbées comme la caséine ou l'albumine. Cet effet n'est toutefois plus observable à 3h (Anderson et al., 2004; Bellissimo and Akhavan, 2015). Les formes hydrolysées des protéines qui sont plus digestibles sont également plus satiétogènes que les formes intactes (Grimble et al., 1986).

Il a été montré que les effets d'un régime HP sur la prise alimentaire pouvaient être reproduits par la supplémentation en certains acides aminés. Ceci a été observé chez le rongeur avec des régimes supplémentés en histidine, leucine, phénylalanine, tryptophane, alanine et arginine (Block and Harper, 1991; Endo et al., 2010; Freudenberg et al., 2012; Jobgen et al., 2008; Kasaoka et al., 2004; Ruan et al., 2014).

2.2.3.2 Mécanismes de régulation

Il est important de noter que l'augmentation des protéines dans le régime se fait souvent aux dépens des sucres, notamment ceux raffinés à fort index glycémique qui génèrent une faible satiété et ne réduisent que faiblement la prise alimentaire (Ludwig et al., 1999)

Par ailleurs, l'effet satiétogène des protéines s'accompagne de la stimulation de la sécrétion de peptides gastro-intestinaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et la diminution de la motilité intestinale. L'équipe de Batterham a observé une augmentation des taux plasmatiques du peptide anorexigène *peptide YY* (PYY) chez des hommes et des souris suite à l'ingestion d'un régime HP (Batterham et al., 2006). Dans cette même étude, ils montrent que des souris délétées pour le gène PYY ne présentent plus de diminution de la prise alimentaire sous régime HP et développent une obésité. D'autres études ont montré qu'un repas riche en protéines et en glucides stimulent également la libération de *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (Lejeune et al., 2006; Nilsson et al., 2007). Peu d'études se sont penchées sur l'effet des régimes HP sur la cholécystokinine (CCK) (Veldhorst et al., 2008). Sa sécrétion semble toutefois augmentée en régime HP (Journel et al., 2012). En plus de son effet anorexigène, la CCK joue probablement un rôle dans la stimulation de la sécrétion pancréatique de protéases permettant la digestion des protéines (Liddle, 1997). Les effets des régimes HP sur la sécrétion de la grhélina, peptide orexigène sécrété par l'estomac, à la suite d'un repas sont plus contrastés. Tandis que certaines études ne montrent aucune modification supplémentaire sur sa sécrétion par rapport à un régime normoprotéique, Blom et al. ont montré, chez l'homme, qu'un petit-déjeuner où 58.1% de l'énergie était apportée par les protéines baissait de manière plus importante la sécrétion postprandiale de grhélina qu'un petit-déjeuner où seulement 19.3% de l'énergie était apporté par les protéines (Blom et al., 2006). Le GLP-1 et la CCK ont une action stimulatrice sur le nerf vague qui transmet ensuite les signaux de satiété au noyau du tractus solitaire (Journel et al., 2012).

On sait désormais depuis plusieurs années que le contenu en acides aminés dans le liquide céphalorachidien reflète les taux d'acides aminés circulants, lui-même lié à la composition en protéines du régime (Arrieta-Cruz and Gutierrez-Juarez, 2016). Mellinkoff, selon la théorie aminostatique (Mellinkoff and Frankland, 1956), a été le premier à émettre l'hypothèse que les fluctuations plasmatiques des concentrations en d'acides aminés pourraient agir sur le contrôle de la prise alimentaire. Constatant, en effet, que « a rise in the serum amino acid concentration appears to be accompanied by a waning of appetite », il a émis l'hypothèse que lorsqu'une concentration seuil des acides aminés est atteinte dans le plasma, la faim cesse, la satiété est atteinte. Veldhorst rappelle que plusieurs études vont dans ce sens en montrant que l'amplitude de la satiété générée par des peptides dépend en grande partie de l'augmentation des concentrations plasmatiques en acides aminés (Veldhorst et al., 2008).

Les acides aminés ramifiés seuls, et notamment la leucine, peuvent reproduire les effets d'un régime riche en protéine ou d'un mélange d'acides aminés. Il n'est pas surprenant que la leucine puisse servir de signal de satiété. En effet, sa concentration, contrairement à celle du glucose ou des TG, est multipliée plusieurs fois à la suite d'un repas (Lynch, 2006). De même, la supplémentation en leucine dans le régime ou dans l'eau de boisson diminue la prise alimentaire chez des rats et des souris (Freudenberg et al., 2012; Zhang et al., 2007), et l'injection icv de leucine, mais pas celle tryptophane, thréonine, méthionine, lysine et sérine, diminue la prise alimentaire et le poids corporelle (Cota, 2006; Laeger et al., 2014a) ce qui indique qu'au moins une part du signal anorexigène induit par la leucine est générée au niveau central. L'action centrale de la leucine et des régimes HP s'effectue via une augmentation de l'activité de mTOR et une diminution de l'activité AMPK au niveau de l'hypothalamus, ce qui conduit à une augmentation de pro-opiomélanocortine (POMC), anorexigène, et à une diminution de NPY et AgRP, orexigènes, dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Cota, 2006; Morrison et al., 2007; Ropelle et al., 2008).

Enfin, la consommation d'un régime HP est associée logiquement à une augmentation de l'apport d'histidine qui peut avoir un effet répressur sur l'appétit par l'intermédiaire de la production d'histamine et l'activation neurones histaminergiques (Nakajima et al., 2001).

2.2.4 Effet « protéines »

2.2.3.3 Expériences sur le pair-feeding

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, une grande partie des effets bénéfiques des régimes HP sur l'adiposité est associée à la diminution de la prise alimentaire due à l'effet satiétogène des protéines. Toutefois, des études de pair-feeding ont montré que lorsque l'on contrôle l'ingéré calorique de rats nourris en régime NP de telle manière à ce qu'il soit équivalent à celui de rats nourris en régime HP. Les rats nourris en régime NP-pair fed (NP-PF) présentent au bout de 14 jours de régime

une adiposité plus grande que les rats sous régime HP (Jean et al., 2001). Ceci est décrit dans la Figure 13 suivante :

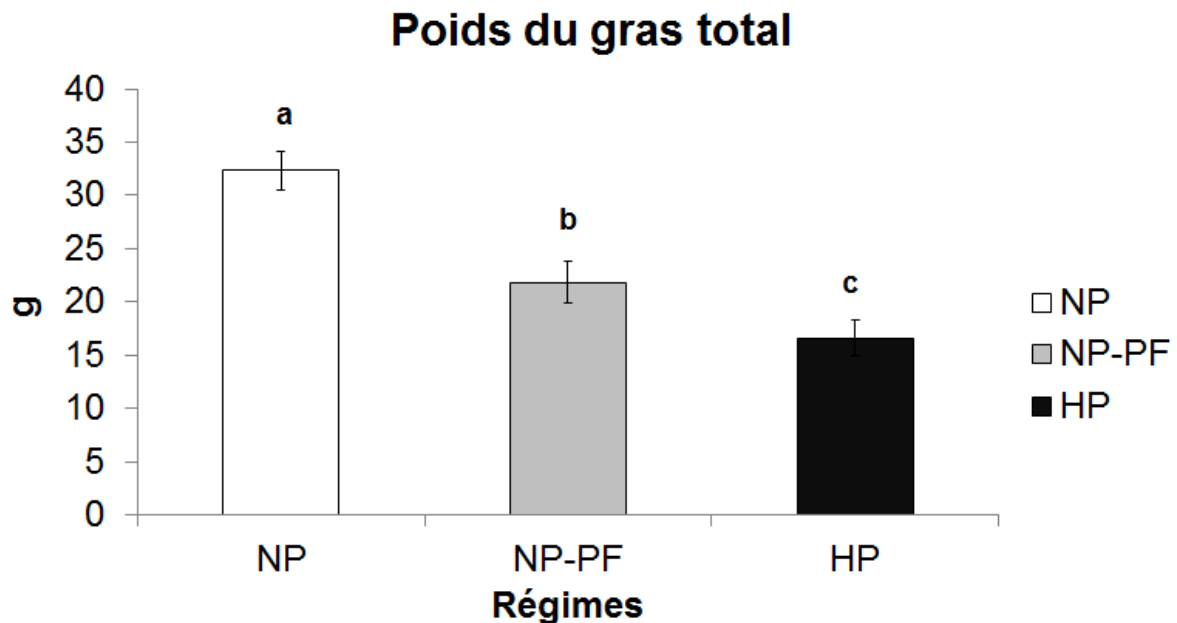


Figure 13: Masse grasse totale chez des rats nourris en régime normoprotéique (NP), hyperprotéique (HP) ou en normoprotéique pair-fed (NP-PF) (Jean et al., 2001).

Des rats ont été nourris pendant 14 jours avec un régime normoprotéique (NP), hyperprotéique (HP) ou en normoprotéique pair-fed (NP-PF). A la fin de ces 14 jours, une composition corporelle a été réalisée et le poids de gras total mesuré. Des lettres différentes indiquent des différences significatives ($P < 0.05$). Les rats NP pair-fed étaient plus gras que les rats sous régime HP suggérant un effet spécifique des protéines alimentaires

Il existe donc un effet spécifique des protéines sur le métabolisme énergétique qui, malgré leur densité énergétique équivalente à celle des glucides, permet de réduire la prise de poids et de masse grasse. Cet effet « protéines » sur la masse grasse est médié par une réorientation des acides aminés vers d'autres voies que celle du stockage sous forme de lipides et par une augmentation de la dépense énergétique.

2.2.3.4 Réorientations des protéines vers la synthèse de glucose, corps cétoniques et glycogène

Une partie des acides aminés alimentaires est réorientée vers la synthèse de glucose, corps cétoniques et glycogène plutôt que vers le stockage de lipides. Sous régime NP, il a été montré que tous les acides aminés désaminés étaient oxydés. Sous régime HP, au contraire, seulement la moitié des acides aminés désaminés sont oxydés ce qui conduit à la génération d'une réserve de squelettes carbonés sous forme d'acides aminés et d' α -cétoacides (Fromentin et al., 2010; Stepien et al., 2011). Par ailleurs, l'élévation des niveaux d'acides aminés dans le plasma stimule à la fois la sécrétion d'insuline et de glucagon et ainsi la néoglucogenèse. Ainsi, Veldhorst et al. ont observé une hausse de la

néoglucogénèse chez des hommes en bonne santé nourris avec un régime hyperprotéique (Veldhorst et al., 2012). Chez le rat, l'augmentation de la quantité de protéines dans le régime induit une augmentation de la synthèse des ARN messagers codant pour la PEPCK, enzyme contrôlant la conversion de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, à l'état de jeûne comme à l'état nourri, et de la glucose 6- phosphatase (G6Pase), uniquement à l'état de jeûne, ce qui suggère une augmentation de la synthèse hépatique de glucose sous régime HP (Azzout-Marniche et al., 2006). La synthèse de glucose par les acides aminés pourrait participer à l'effet satiétogène des protéines. En effet, cette néoglucogénèse hépatique maintiendrait de façon prolongée une glycémie haute et permettrait ainsi de prolonger la satiété (Pesta and Samuel, 2014).

Une autre voie par laquelle les squelettes carbonés dérivés de la désamination des acides aminés peuvent être gérés est la cétogénèse. En effet, chez l'homme et l'animal, une augmentation des taux circulants de corps cétoniques (particulièrement le β -hydroxybutyrate) a été observée en réponse à l'ingestion d'un régime HP (Veldhorst et al., 2012; Chaumontet et al., 2015).

Enfin, selon le contenu en glucides du régime, l'ingestion d'un régime HP peut être associé soit un maintien soit à une petite baisse des concentrations en glycogène hépatique (Baum et al., 2006; Gannon, 1993; Gannon and Nuttall, 1995; Krebs et al., 2003; Obeid et al., 2006). La stimulation de la sécrétion d'insuline et de glucagon qui accompagne l'ingestion d'un régime HP permet également un renouvellement des stocks en glycogène ainsi qu'une hausse de la conversion des acides aminés alimentaires en glycogène (Baum et al., 2006; Obeid et al., 2006; Stepien et al., 2011). En accord avec ces résultats, il a été montré que la glutamine, la proline et l'alanine avaient un effet stimulateur sur la synthèse de glycogène. Le mécanisme de stimulation de la synthèse de glycogène par la glutamine serait basé sur une augmentation du volume cellulaire, appelé « cell swelling », et ferait intervenir un transport Na⁺-dépendant des acides aminés (Baquet et al., 1991).

2.2.3.5 Effet sur la synthèse et l'oxydation des acides gras

La diminution de la masse adipeuse observée sous régime HP est également la résultante de l'effet des régimes HP sur la baisse de la lipogénèse. En effet, Stepien et al. ont observé que les niveaux d'expression de la FAS et de l'ACC dans le foie étaient réprimés pendant au moins 14 jours après l'introduction d'un régime HP (Stepien et al., 2010). Par ailleurs, il a été observé que les expressions de la FAS et de SREBP-1c étaient réduites dans le foie de rats nourris pendant 8 semaines sous régime HP par rapport à des rats nourris en régime NP et NP-pair fed et donc indépendamment du niveau d'énergie ingérée (Blouet et al., 2006).

La supplémentation en un seul acide aminé est également associée à une diminution de la lipogénèse. Ceci est vrai pour des acides aminés indispensables comme l'histidine (Endo et al., 2010; Kasaoka et al., 2004), la leucine (Freudenberg et al., 2012; Zhang et al., 2007), le tryptophane (Ruan et al., 2014) mais également pour des acides aminés non indispensables comme l'alanine (Araujo et al., 2016;

Freudenberg et al., 2012) et l'arginine (Jobgen et al. 2008). Cette dernière étude suggère par ailleurs que cette diminution de la masse grasse pourrait être médiée par une augmentation de l'oxydation des lipides dans le tissu adipeux via une induction de l'expression de l'AMPK et de PGC1- α . De même, la supplémentation en alanine peut diminuer la lipogénèse dans le tissu adipeux par l'intermédiaire d'une stimulation de la phosphorylation de l'AMPK qui en retour inactive l'ACC (Araujo et al., 2016).

2.2.3.6 Effet sur la dépense énergétique par rapport aux autres macronutriments

La thermogénèse postprandiale est définie comme l'augmentation de la dépense énergétique à la suite d'un repas ou de l'ingestion d'un nutriment. Elle résulte du coût énergétique de l'absorption de la digestion et de la métabolisation des nutriments apportés par le repas et nous informe sur le coût d'interconversion des nutriments dans les voies du métabolisme énergétique. Il a été montré que la thermogénèse postprandiale est de l'ordre de 15 à 30% de l'énergie ingérée pour les protéines tandis que pour les sucres et les lipides cette valeur n'est que de 5 à 10% et de 0 à 3 % respectivement (Acheson, 1993; Westerterp, 2004). Mikkelsen, de même, a mis en évidence que tripler la contribution énergétique des protéines dans le repas de 11 à 29 % augmentait la dépense énergétique de l'ordre de 10% par jour (Mikkelsen et al., 2000).

L'augmentation de la dépense énergétique associée à la consommation des protéines pourrait expliquer en partie leur effet satiétogène. En effet, plusieurs auteurs ont suggéré que l'augmentation du métabolisme avait un effet inhibiteur sur la prise alimentaire (Even and Nicolaidis, 1985; Friedman, 1995). Les régimes HP peuvent également moduler l'expression des protéines de découplage (UCP). Les protéines UCP sont des transporteurs qui découplent le retour des protons H⁺ dans la matrice mitochondriale de la production d'ATP. L'énergie issue de l'oxydation des substrats est alors dissipée sous forme de chaleur. Ainsi, Ropelle et al. ont montré que la consommation d'un régime HP pendant trois semaines augmentait la quantité d'UCP1 dans le tissu adipeux brun chez le rat ou la souris obèse comparé à des animaux nourris avec un régime NP (Ropelle et al., 2008). Une autre étude a montré des résultats similaires chez le rat mais aussi que l'augmentation des protéines dans le régime augmentait la quantité d'UCP2 dans le foie. Ces changements d'abondance en protéines découplantes étaient corrélés positivement à la dépense énergétique (Petzke et al., 2007).

Il est possible qu'une partie de l'effet des régimes HP sur la dépense énergétique soit médié par l'augmentation de l'apport en certains acides aminés. En effet, la supplémentation en histidine dans le régime augmente le contenu en UCP1 dans le tissu adipeux brun (Kasaoka et al., 2004). La supplémentation en arginine a également un effet important sur le tissu adipeux brun en augmentant sa masse de près de 34%, participant ainsi à l'augmentation de la dépense énergétique (Fu et al., 2005; Jobgen et al., 2008).

2.2.5 Effet d'un régime HP sur la masse maigre, la synthèse protéique et la protéolyse

Les régimes HP permettent de mieux préserver la masse maigre que les autres types de régimes en particulier au cours de régimes hypocaloriques (Kim et al., 2014; Westerterp-Plantenga et al., 2004). Une récente méta-analyse de 18 essais contrôlés randomisés a rapporté que chez des adultes de plus de 50 ans, la préservation de la masse maigre était également plus importante lors d'un régime d'amaigrissement avec une forte teneur en protéines (Kim et al., 2014). Ce maintien de la masse maigre permet ainsi de limiter la diminution du métabolisme de repos induite par la restriction alimentaire et garantit un meilleur maintien de la composition corporelle sur le long-terme (Dériaz et al., 1992).

2.2.5.1 Effet d'un régime HP sur la synthèse protéique

Les effets des régimes HP sur la synthèse protéique sont toutefois controversés. Le temps d'exposition au régime, la fenêtre sur laquelle est mesurée la synthèse protéique, l'espèce ainsi que l'organe considérés sont autant de paramètres qui peuvent expliquer ces résultats contradictoires.

De nombreuses études ne rapportent aucun effet des régimes HP sur l'anabolisme protéique au niveau du muscle squelettique ou au niveau de protéines musculaires spécifiques comme la myosine et les protéines sarcoplasmiques (Chevalier et al., 2009; Frank et al., 2005; Harber et al., 2005; Laurent et al., 1984); d'autres rapportent que la vitesse de synthèse fractionnaire dans le muscle est diminuée chez des animaux nourris avec de grandes quantités de protéines (Masanes et al., 1999; Taillandier et al., 1996). Des inhibitions de l'ordre de 34% et de 20% du taux de synthèse protéique ont aussi été observées dans le foie et dans le rein de rats sous régime HP (Chevalier et al., 2009). Dans un contexte différent, il a été montré qu'une augmentation de la quantité de protéines dans le régime 12.7 à 20.7% augmentait la synthèse protéique dans le foie, le rein, le pancréas et le muscle chez le porcelet (Deng et al., 2009). Chez l'homme, l'augmentation des protéines dans le régime peut induire une hausse de la synthèse protéique jusqu'à 20% (Fereday et al., 1998; Forslund et al., 1998; Harber et al., 2005).

La supplémentation en acides aminés est couramment utilisée afin de garantir un haut niveau de synthèse protéique. C'est le cas particulièrement en alimentation animale car elle permet de maximiser la croissance des animaux de rente. Les acides aminés supplémentés sont ceux dont la quantité est considérée comme limitante dans la ration. Ainsi la lysine est souvent supplémentée dans les rations de porcs car souvent déficitaire dans une alimentation à base de céréales (Kerr and Easter, 1995).

Il a aussi été mis en évidence par des expériences *in vivo* et *in vitro* qu'une mixture d'acides aminés permettait de stimuler la synthèse protéique dans un diaphragme isolé de rat ou dans le muscle squelettique et que cet effet était reproduit par l'addition dans le milieu des trois acides aminés ramifiés (valine, leucine, isoleucine) (Fulks et al., 1975; Li and Jefferson, 1978). Les acides aminés ramifiés stimulent également la synthèse protéique dans des hépatocytes isolés (Dubbelhuis and Meijer, 2002; Ijichi et al., 2003).

Parmi les acides aminés ramifiés, la leucine semble avoir l'effet anabolique le plus important. En effet, la leucine, seule, stimule la synthèse protéique dans le muscle à un niveau quasiment équivalent à celui observé avec la combinaison des trois acides aminés ramifiés (Buse and Reid, 1975; Fulks et al., 1975; Li and Jefferson, 1978). Une autre étude a montré que l'administration chronique pendant 12 jours de leucine dans l'eau de boisson peut stimuler la synthèse protéique dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie chez le rat nourris *ad libitum* (Lynch et al., 2002). Toutefois ces résultats n'ont pas été reproduits lors d'une administration aiguë de leucine (Anthony et al., 2001). Les effets des acides aminés ramifiés et en particulier de la leucine sont médiés par la stimulation de la phosphorylation de mTOR et de ses cibles en aval (Chotechuang et al., 2009). La leucine stimule aussi la phosphorylation de eIF4G, p70S6K1 et de la protéine ribosomale S6 permettant ainsi de faciliter l'initiation de la traduction protéique dans le muscle squelettique (Kimball and Jefferson, 2006).

L'arginine et la glutamine ont aussi des effets anaboliques. En effet, il a été montré que la supplémentation en arginine ou l'augmentation de sa synthèse endogène augmente l'accrétion protéique dans le muscle ou le corps entier (Frank et al., 2007; Wu et al., 2004). Concernant la glutamine, une relation positive entre sa concentration et le niveau de synthèse protéique a été observée chez le poulet (Watford and Wu, 2005). Par ailleurs, la perfusion de glutamine dans le muscle squelettique de rat augmente la synthèse protéique (MacLennan et al., 1987). Ces effets anaboliques sont probablement médiés par une action sur la voie mTOR (Xia et al., 2003; Yao et al., 2008). Il est important de noter que les acides aminés ramifiés sont des précurseurs de la glutamine, il est ainsi possible qu'une partie de leur effet soit médié par la glutamine.

2.2.5.2 Effet d'un régime HP sur la protéolyse

La protéolyse, comme la protéosynthèse est sous le contrôle des acides aminés. Le gain protéique sous régime HP est d'ailleurs probablement plus dû à la diminution de la protéolyse qu'à l'augmentation de la synthèse.

Il a ainsi été montré que l'ingestion aiguë de protéines diminuait la protéolyse (Fereday et al., 1998; Forslund et al., 1998) et que dans le foie, la protéolyse est inhibée à l'état nourri avec l'augmentation des protéines dans le régime (Chevalier et al., 2010). Chotechuang et al. ont aussi montré que la protéolyse était diminuée de l'ordre de 14% chez des rats nourris pendant deux semaines sous régime HP (Chotechuang et al., 2011). Cette même étude montre que cette baisse est associée à une baisse de l'expression de l'ubiquitination des protéines, et qu'elle nécessite à la fois l'inhibition de l'AMPK et l'activation de mTOR. Des acides aminés isolés peuvent également avoir un effet inhibiteur sur l'autophagie. Ainsi, la leucine, seule, inhibe la dégradation des protéines dans le muscle et dans le foie (Meijer and Dubbelhuis, 2004; Nakashima et al., 2007; Tischler et al., 1982). En accord avec ces résultats, il a été montré que les acides aminés ramifiés, en activant mTOR, diminue l'autophagie (Yoon, 2016). Une autre étude a rapporté que la glutamine inhibe la protéolyse dans les cellules à

mucus de l'intestin grêle notamment par l'intermédiaire d'une diminution de l'ubiquitination des protéines (Coëffier et al., 2003).

2.3 Régime faible en protéines et conséquences sur la composition corporelle

2.3.1 Introduction sur les régimes faibles en protéines

Dans les pays en voie de développement, les enfants, après le sevrage, sont souvent nourris avec des régimes à fort contenu en glucides mais faible en protéines (Patel and Srinivasan, 2011; Steyn et al., 2014). Il est donc important de déterminer les effets sur le poids et la composition corporelle des régimes faibles en protéines chez l'individu et particulièrement pendant la croissance.

Il n'existe pas de définition très claire d'un régime faible en protéines mais ce type de régime est souvent conseillé aux personnes ayant des défauts métaboliques de type phénylcétonurie ainsi qu'à ceux ayant des problèmes rénaux ou hépatiques (MacLeod and Ney, 2010; Mandayam and Mitch, 2006). La contribution énergétique des protéines dans un régime faible en protéines tourne généralement autour de 5 à 6% soit environ la moitié ou le tiers de l'apport journalier recommandé (Aparecida de França et al., 2014; dos Santos et al., 2016).

La restriction en protéines permettrait de reproduire les effets d'une restriction calorique sur une période courte de 8 semaines chez la souris avec une diminution du poids total, de l'insuline, des TG circulants, de la tolérance au glucose, de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la dépense énergétique, des HDL circulants ceci malgré une augmentation de la prise alimentaire (Solon-Biet et al., 2014).

2.3.2 Effet d'un régime LP sur la composition corporelle et la prise de poids

Sur des périodes longues, la consommation d'un régime faible en protéines chez la souris est généralement associée à une augmentation du poids, de l'adiposité et de la quantité de gras intra-hépatique qui suggèrent que l'augmentation de la prise alimentaire n'est que partiellement compensée par une augmentation de la dépense énergétique (Huang et al. 2013; Solon-Biet et al. 2014).

Chez le rat en croissance nourri pendant 15 jours avec un régime faible en protéines, au contraire, il a été montré que ces derniers présentaient un poids plus faible comparé à des rats nourris avec un régime témoin mais toujours une adiposité plus grande avec notamment une augmentation de la taille des tissus adipeux blancs et bruns (Aparecida de França et al., 2009).

2.3.3 Mécanismes explicatifs de l'effet des régimes LP sur la composition corporelle

2.3.3.1 Effet sur la prise alimentaire

L'effet sur la prise alimentaire d'un régime faible en protéines est fonction de la quantité de protéines dans le régime ainsi que du stade physiologique de l'individu (Menaker and Navia, 1973). Il a été montré chez l'homme et chez l'animal qu'un régime faible en protéines augmente la prise alimentaire

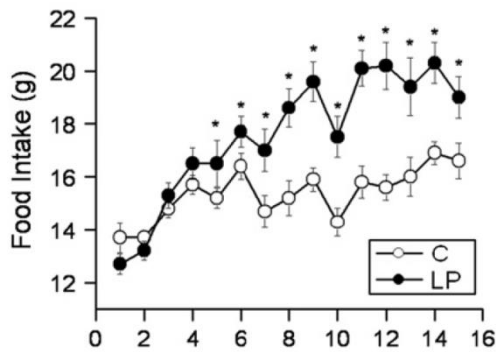


Figure 14: Prise alimentaire sous régime témoin (C) et sous régime faible en protéines (LP) chez le rat en croissance (Aparecida de França et al., 2009).

Des rats en croissance ont été nourris pendant 15 jours avec un régime témoin (C) ou faible en protéines (LP) où respectivement 17 ou 6% de l'énergie est apportée par les protéines. La prise alimentaire a été suivie quotidiennement pendant les 15 jours de test.

tandis qu'un régime très faible en protéines crée un phénomène aversif et la diminue (Du et al., 2000; Morrison and Laeger, 2015). Malgré cette augmentation de la prise alimentaire, il a été montré que les rats hyperphagiques ne parviennent pas à atteindre l'apport en protéines des rats nourris sous régime témoin et présentent ainsi des concentrations sanguines en acides aminés plus faibles (Aparecida de França et al., 2009; Henagan et al., 2016). En accord avec ces résultats, il a été montré que les régimes faibles en protéines induisent chez le rat une faible modulation de la sécrétion de CCK et de la ghréline en réponse au repas, cette altération de la réponse pourrait expliquer en partie le phénomène d'hyperphagie observé sous régime LP (Morrison and Laeger, 2015).

Par ailleurs, La quantité en protéines dans le régime peut conduire à une modulation du rapport tryptophane sur la somme des acides aminés neutres. La sérotonine est synthétisée à partir de tryptophane et sa synthèse est fonction de ce rapport car les acides aminés neutres sont des compétiteurs du tryptophane au niveau du passage de la barrière hémato-encéphalique (Fernstorn and Wurtman, 1972). Sous régime faible en protéines, le rapport tryptophane/acides aminés neutres est élevé ce qui induirait une forte synthèse de sérotonine et ainsi encouragerait les rats à augmenter leur prise protéique et leur prise alimentaire en conséquence (Arnal et al., 1997). En accord avec cette hypothèse, il a été récemment montré qu'un régime riche en leucine réduit simultanément la quantité de tryptophane disponible pour la synthèse de sérotonine et la prise alimentaire (Wessels et al., 2016).

2.3.3.2 Effet sur la synthèse d'acides gras

Comme énoncé précédemment, la consommation de régimes faibles en protéines induit une augmentation de l'adiposité et du gras intra-hépatique des individus en comparaison avec un régime témoin (Huang et al., 2013; Solon-Biet et al., 2014). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'administration d'un régime faible en protéines augmente la lipogénèse hépatique totale de l'ordre de

150% Par ailleurs, le contenu en SREBP-1c, facteur de transcription impliqué dans l'expression de la *fatty acid synthase* (FAS) et de l'acétyl-coA carboxylase (ACC), et l'activité de la glycérokinase, enzyme qui catalyse la phosphorylation du glycérol, sont augmentés respectivement de 30 et 50% (Menezes et al., 2013). Par contre, Henegan et al. ont observé que la consommation d'un régime faible en protéines est associé à une diminution de la lipogénèse dans le foie et notamment de l'expression de la *stearoyl-coenzyme A desaturase* (SCD-1), FAS et SREBP1-c (Henagan et al., 2016). Toutefois, dans cette étude, 10% de l'énergie était apportée par les protéines contre 5 ou 6% dans les autres. Cette différence pourrait expliquer ces résultats contradictoires.

L'accumulation de TG dans les adipocytes pourrait être plus spécifiquement due à une baisse de la lipolyse. En effet, Buzelle et al. ont montré que la lipogénèse dans des adipocytes du tissu adipeux épидidymaire était globalement moins importante sous régime faible en protéines mais aussi que les adipocytes des rats nourris en régime faible en protéines ne répondaient pas à l'action lipolytique de la noradrénaline (Buzelle et al., 2010). Ainsi la moindre capacité à mobiliser les lipides expliquerait l'accumulation de TG dans le tissu adipeux blanc chez les individus nourris avec ce type de régime.

2.3.3.3 Effet sur la dépense énergétique

Sous régime faible en protéines, une grande partie de l'augmentation de la prise alimentaire est compensée par une augmentation de la dépense énergétique, ce qui explique que les différences en termes de composition corporelle entre des animaux nourris en régime normal ou faible en protéines sont finalement assez faibles (Huang et al., 2013).

Au niveau des organes, il a été montré que la température basale du tissu adipeux brun était augmentée de 1.1 °C chez des animaux nourris en régime faible en protéines (de França et al., 2016) et que l'administration de noradrénaline augmentait la température basale de 0.2 °C de plus chez les rats nourris en régime faible en protéines. En ligne avec ces résultats, le contenu en protéines découplantes UCP1 dans le tissu adipeux brun est augmenté de 60% probablement via une stimulation du système sympathique (de França et al., 2016).

Les effets d'un régime LP sur la dépense énergétique pourraient être médiés par la restriction en méthionine. En effet, Malloy et al. ont montré que la dépense énergétique chez des rats nourris avec un régime déficient en méthionine était supérieure à celle de rats nourris à satiété ou en *pair-feeding* sous régime témoin (Malloy et al., 2006). En accord avec ces résultats, d'autres études ont montré que la restriction en méthionine était accompagnée d'une augmentation de la dépense énergétique, notamment de la thermogénèse et de la température corporelle (Hasek et al., 2010, 2013).

Il est intéressant d'observer que les consommations de régimes faibles ou forts en protéines ont toutes deux pour conséquences d'augmenter la dépense énergétique. Certains effets des deux types de régime sont résumés dans la Figure 15 ci-dessous :

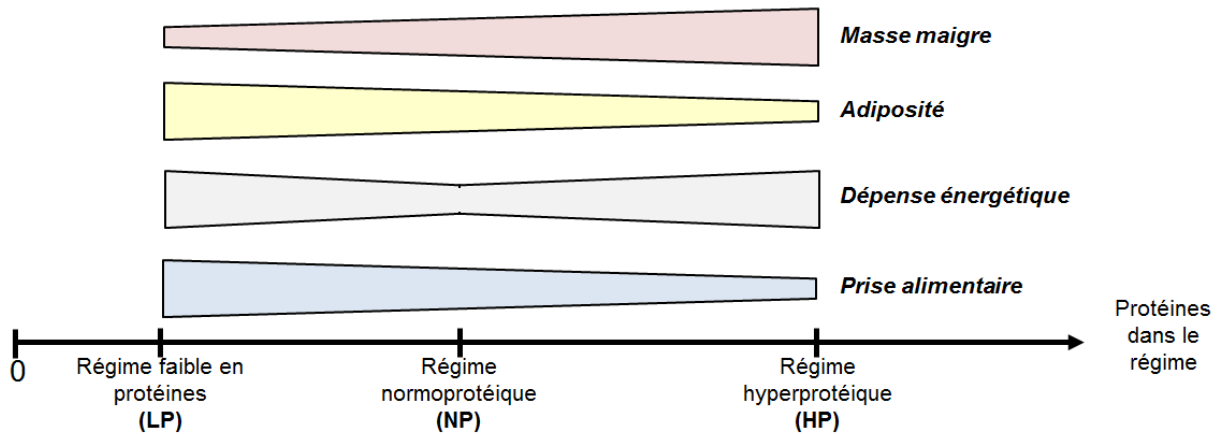


Figure 15: Effets des régimes faible et fort en protéines

La masse maigre est diminuée en régime LP et augmentée en régime HP par rapport à un régime NP, l'adiposité et la prise alimentaire suivent un schéma inverse. La dépense énergétique, par contre, est augmenté en régime LP et HP par rapport au régime NP.

2.3.3.4 FGF21, principal médiateur de l'effet des régimes LP

FGF21 est une protéine de 181 acides aminés appartenant à la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (Nishimura, T. et al., 2000). Dans le foie, FGF21 stimule la néoglucogénèse, l'oxydation des acides gras et la cétogénèse et inhibe la lipogénèse. FGF21 a également des actions au niveau du muscle, du tissu adipeux, du pancréas, du système nerveux central et des os que récapitule la Figure 16 (Gimeno and Moller, 2014) :

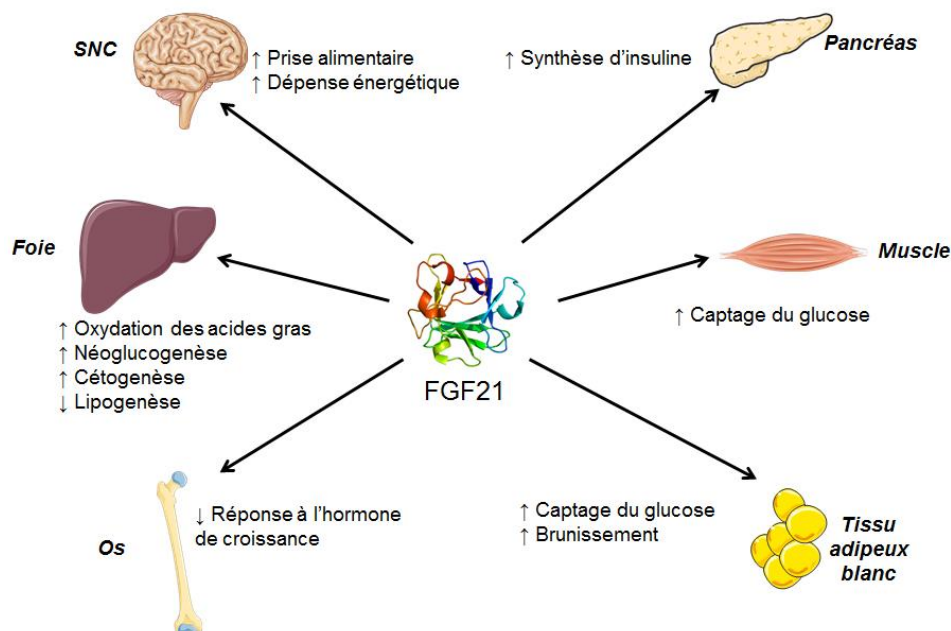


Figure 16: Les différents rôles de FGF21(Gimeno and Moller, 2014)

La protéine FGF21 a de multiples rôles au niveau de nombreux organes. Elle stimule l'oxydation des acides gras, la néoglucogénèse, la cétogénèse dans le foie, la prise alimentaire et la dépense énergétique, le captage de glucose dans le muscle et le tissu adipeux, la synthèse d'insuline dans le pancréas et le brunissement du tissu adipeux blanc. En parallèle, FGF21 diminue la lipogénèse dans le foie et la réponse à l'hormone de croissance dans l'os.

Il semble d'ailleurs que l'action de FGF21 sur l'oxydation des acides gras dans le foie passe par l'activation de l'AMPK (Zhu et al., 2014).

La sécrétion de FGF21 répond directement à la disponibilité en acides aminés. L'absence d'un seul acide aminé (leucine, histidine, méthionine, asparagine) est capable d'induire une augmentation de la sécrétion de FGF21 par un mécanisme impliquant l'activation de GCN2 et du facteur de transcription ATF4 (Ables et al., 2015; De Sousa-Coelho et al., 2012; Laeger et al., 2014b; Stone et al., 2014). La restriction en protéines seule induit également une forte augmentation de la synthèse de FGF21 qui est responsable de l'augmentation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. En effet, chez des souris KO-FGF21, ces augmentations sont absentes (Laeger et al., 2014b). Il paraît donc probable que les effets des régimes faibles en protéines sur la prise alimentaire soient médiés par FGF21. En accord avec ces résultats, il a été suggéré dans une étude récente que les effets bénéfiques sur la santé vasculaire d'un régime végétalien pourraient être médiés par FGF21 du fait de la légère restriction en acides aminés (McCarty, 2016).

2.3.4 Effet d'un régime LP sur la masse maigre, la synthèse protéique et la protéolyse

La consommation d'un régime LP est associée à une diminution de la masse maigre. Cette baisse est attribuable principalement à une diminution des muscles squelettiques car il a été montré que le poids du muscle *extensor digitorum longus* était réduit de 34% chez des rats nourris avec un régime faible en protéines (dos Santos et al., 2016)

Les régimes faibles en protéines modulent le métabolisme des protéines en diminuant la protéolyse et la synthèse protéique, effets en partie médiés par la baisse de la disponibilité en certains acides aminés dans le plasma. Seules les concentrations en histidine et en lysine plasmatiques ne sont pas affectées suite à la consommation d'un régime faible en protéines (Batistela et al., 2014).

Chez des rats en croissance, la synthèse protéique et la protéolyse dans le muscle *soleus* et dans des cellules de muscle *extensor digitorum longus in vitro* sont diminués (Batistela et al., 2014). La diminution de la protéolyse est un phénomène adaptatif permettant d'économiser les protéines corporelles lors de la diminution de la disponibilité en acides aminés (dos Santos et al., 2016). Cette diminution est médiée par une diminution de la synthèse d'ARN messagers codant pour des gènes impliqués dans le système ubiquitine-protéasome dont l'ubiquitine ligase (E3) (Batistela et al., 2014; dos Santos et al., 2016), et par une diminution du système caspase dont l'activité est réduite dans les muscles de rats au bout de 15 jours de régime faible en protéine (dos Santos et al., 2016). Les foies de souris nourries sous régime faible en protéines présentent un niveau élevé d'autophagie. De manière très intéressante, le blocage de cette autophagie hépatique empêche les autres adaptations du métabolisme hépatique comme la baisse de la biogénèse mitochondriale (Henagan et al., 2016).

La diminution de la synthèse protéique est médiée par une baisse de l'activité de la voie mTOR. En effet dans les muscles *extensor digitorum longus*, la phosphorylation de p70S6K1 et de 4E-BP1, toutes

deux cibles de mTOR, est diminuée. Il est possible que cela soit dû à une augmentation de l'activité de l'AMPK qui bloque alors mTOR car sa phosphorylation est multiplié par 3 dans le muscle soleus de rats nourris avec un régime faible en protéines (dos Santos et al., 2016). La diminution de la synthèse protéique sous régime faible en protéines pourrait être spécifiquement médiée par la baisse de l'apport en thréonine car il a été mis en évidence que lorsque l'apport de thréonine est réduit à 30% de l'apport adéquat pour la croissance, les taux de synthèse protéique des mucines dans le duodénum, l'iléon et le colon sont réduits alors que ceux des protéines des muqueuses ne sont pas affectés (Faure et al., 2005). Ceci est en accord avec les études de croissance chez le porcelet montrant que la thréonine est un acide aminé particulièrement limitant pour la synthèse protéique (Wang et al., 2007).

Chapitre II : Travaux de thèse

1 Justification des travaux et objectifs des études

Dans cette partie introductive, nous avons vu que la modulation de l'apport en acides aminés avaient des conséquences importantes sur le métabolisme énergétique et le métabolisme des protéines. Nous avons vu, par exemple, que l'augmentation des protéines ou la supplémentation en certains acides aminés représentaient une stratégie efficace pour limiter l'adiposité par l'intermédiaire d'une baisse de la prise alimentaire et une hausse de la dépense énergétique. Cette partie introductive a aussi rappelé l'existence de protéines kinases impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et de la synthèse protéique. L'activité de ces protéines kinases est sensible aux conditions nutritionnelles notamment à l'apport en protéines et en acides aminés : lorsque la disponibilité en acides aminés augmente, la phosphorylation et l'activité de mTOR augmentent tandis que celles de GCN2 et de l'AMPK diminuent. Par ailleurs, il a été montré que la sécrétion fibroblast growth factor 21 (FGF21) répondait à la restriction en acides aminés et était responsable d'une partie des effets des régimes faibles en protéines. Toutefois, le contrôle de sa sécrétion est encore peu clair.

Une grande partie des études sur la signalisation des acides aminés s'est focalisée sur la place du foie. En effet, cet organe complexe, en tant que premier organe traversé par les acides aminés issus de la digestion des protéines jouent un rôle primordial dans les adaptations au contenu en protéines du régime. Le rôle joué par les voies de signalisation dans le foie, AMPK et GCN2, et par FGF21 dans les adaptations du métabolisme énergétique et protéique en réponse à la modulation de l'apport en acides aminés n'a toutefois pas encore été bien défini.

L'objectif de cette thèse est donc de définir précisément les rôles de l'AMPK et de GCN2 hépatiques dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la synthèse protéique en réponse aux modulations de la teneur en protéines du régime, de préciser le contrôle nutritionnel de la sécrétion de FGF21 et de comprendre l'implication de cette hépatokine dans les conséquences physiologiques associées à la consommation de régimes faibles ou forts en protéines.

Ce travail de thèse comprend ainsi deux études menées chez l'animal ayant donné lieu à quatre articles

- Le premier a pour but de préciser les facteurs nutritionnels participant au contrôle de la sécrétion de FGF21 et l'éventuelle implication de FGF21 dans les phénotypes d'animaux nourris en régime à faible ou forte concentrations en protéines.
- Les deux suivants cherchent à caractériser le rôle de l'AMPK et de GCN2 hépatique dans le contrôle du métabolisme énergétique en réponse aux variations en protéines du régime.

- Le dernier article vise à préciser le rôle de ces deux voies dans le contrôle de la synthèse protéique *in vivo* en réponse à l'ingestion de régime à faible, normale ou forte concentrations en protéines.

2 Rappel méthodologique

Les études effectuées lors de ce travail ont utilisé deux modèles de souris KO. Notre travail ayant cherché à caractériser le rôle du foie, les souris présentaient des délétions de l'AMPK ou de GCN2 spécifiquement au niveau du foie. La reproduction des souris nécessaires à nos études a été effectuée au sein de l'animalerie. Les souris reproductrices ont été nourries avec du régime P20 croissance dont la composition est décrite dans le Tableau 3. Les souris étaient par la suite génotypées afin de déterminer la présence ou pas de la délétion de l'AMPK ou de GCN2 dans le foie.

2.1 Modèle expérimental: les souris KO

2.1.1 Modèle KO-AMPK foie spécifique

Nous avons collaboré avec l'équipe Gènes, nutriments et fer de l'Institut Cochin qui nous a fourni le premier modèle de souris qui possédait une double délétion des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la sous-unité catalytique de l'AMPK au niveau du foie spécifiquement. Le western-blot ci-dessous représente l'abondance des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans le foie de souris sauvages ou KO nourries sous régime normal (NP), faible (LP) ou fort (HP) en protéines et confirme que les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont bien délétées, les résidus de phosphorylation de l'AMPK sont probablement dus aux autres types cellulaires qui existent dans le foie et dont nous avons parlé dans la partie introductive.

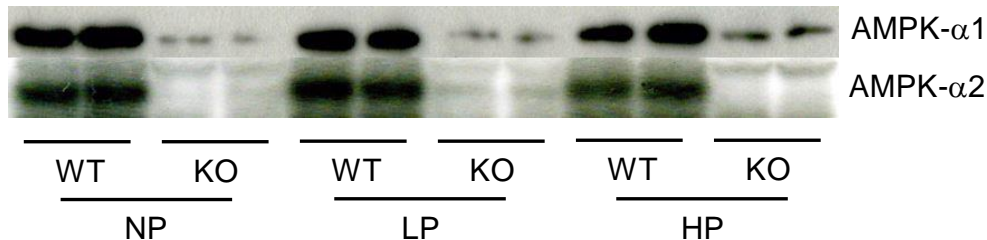


Figure 17: Abondance des isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans le foie de souris sauvages ou KO nourries sous régime normal (NP), faible (LP) ou fort (HP) en protéines.

Des souris KO-AMPK foie spécifique et sauvages ont été nourries pendant trois semaines avec un régime normal (NP), faible (LP) ou fort (HP) en protéines. A la fin de ces trois semaines, après une nuit à jeun, les souris ont été renourries avec 1 gramme de leur régime test. Deux heures plus tard, elles ont été euthanasiées par injection de pentobarbital en ip. Le foie a été immédiatement congelé, les protéines extraites et les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de l'AMPK révélées par la technique du western-blot.

Ce modèle de souris a déjà été étudié dans une étude récente (Hasenour et al., 2014). Cependant, dans cette étude, les auteurs ont étudié le rôle de l'AMPK dans la médiation des effets de l'augmentation de la disponibilité en AMP. Ils ont ainsi montré que l'inhibition de la production du glucose consécutive à l'augmentation en AMP était indépendante de l'AMPK. Aucune étude n'a porté sur le rôle de l'AMPK hépatique dans la détection des niveaux d'apport en protéines et par conséquent la modulation des orientations métaboliques, en utilisant les KO AMPK comme modèle.

2.1.2 Modèle KO-GCN2 foie spécifique

Le deuxième modèle, quant à lui, a été généré au sein de notre animalerie en croisant des souris portant de manière homozygote le gène codant dans le foie pour la Recombinase Cre avec des souris dont les gènes codant pour GCN2 étaient floxés : les souris GCN2-lox total. Ces dernières souris nous ont été fournies par l'équipe Gènes Nutriment de l'INRA de Theix dirigée par Pierre Fafournoux. Ces souris portent de courtes séquences palindromiques de 13 paires de bases, , appelées séquences lox, qui flanquent le douzième exon du gène GCN2. La recombinaison Cre peut reconnaître les séquences Lox et conduire à l'excision des bases nucléiques situées entre les deux séquences et ainsi à l'invalidation du gène là où cette dernière est exprimée. Ce premier croisement a permis d'obtenir une première génération de souris ayant un génotype intermédiaire. Ces dernières ont alors été recroisées (backcrossées) avec des souris GCN2-lox total. Ceci nous a permis de générer des souris ayant quatre génotypes différents dont le modèle d'étude possédant deux versions floxées de GCN2 ainsi que le gène codant dans le foie pour la recombinaison Cre. Ces souris ne présentent pas dans la séquence de leur protéine la région contenant la lysine 618 indispensable à l'activité kinase de GCN2. Les deux croisements successifs permettant d'obtenir notre modèle d'étude sont récapitulés dans la Figure 18 ci-dessous :

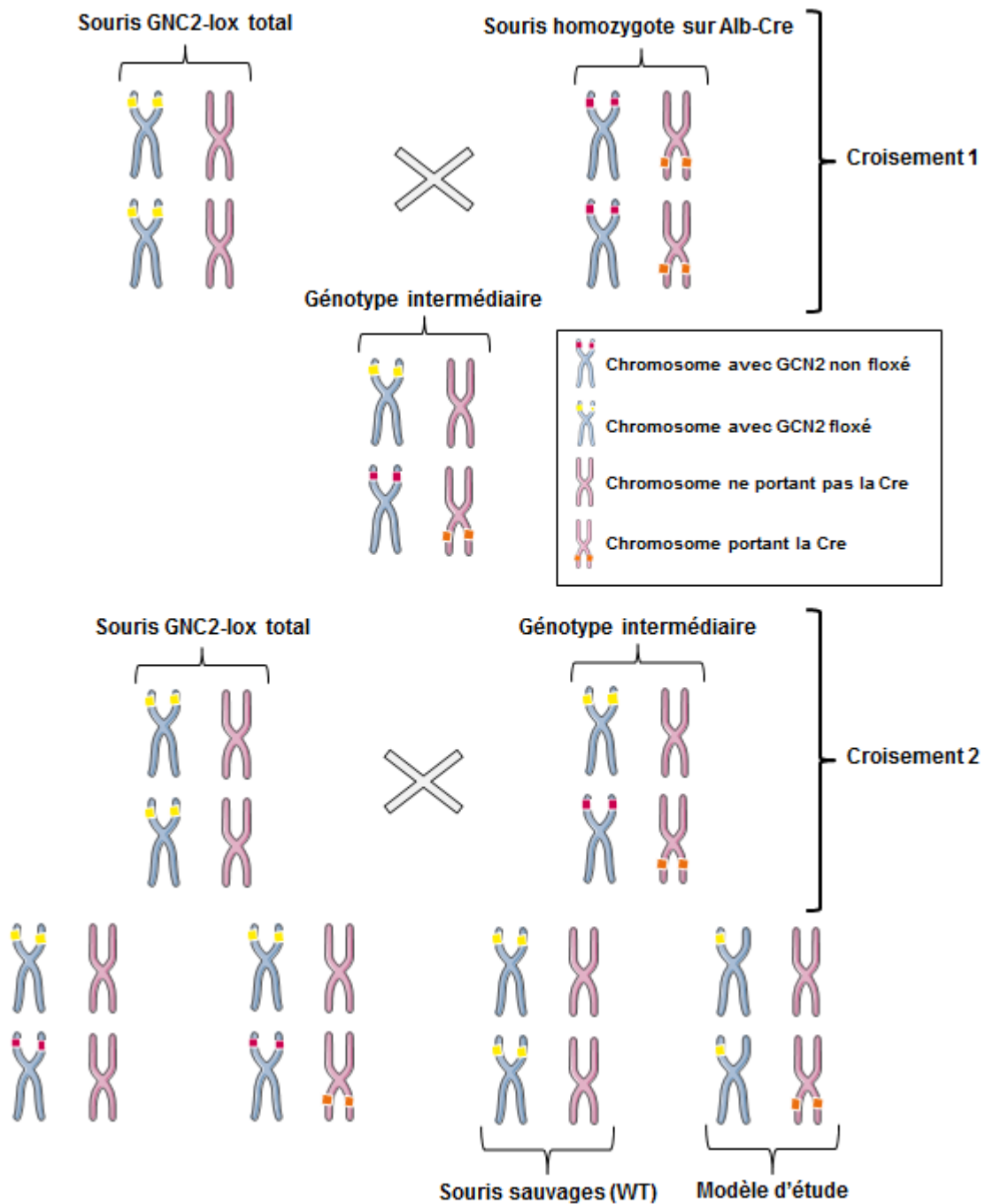


Figure 18: Création du modèle KO-GCN2 foie spécifique

Un croisement entre des souris *GNC2-lox* total et des souris homozygotes *Alb-Cre* permet d'obtenir un génotype intermédiaire. Cette génération intermédiaire est backcrossé avec les souris *GNC2-lox* total afin d'obtenir notre modèle d'étude : des souris KO-GCN2 foie spécifique.

2.2 Protocole expérimental

Les souris de 7 semaines de type sauvages (WT) ou n'exprimant plus la voie AMPK ou GCN2 dans le foie (KO) ont été nourries pendant trois semaines avec un régime à faible (LP), normale (NP) ou forte (HP) teneur en protéines où respectivement 5, 14 et 55% de l'énergie était apportée par les protéines (Tableau 3). La composition des régimes est décrite dans le tableau :

Tableau 3: Tableau de la composition des régimes utilisés dans notre étude

| | P20 | NP | LP | HP |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Contenu (g/kg) | | | | |
| Protéines de lait | 200 | 140 | 50 | 530 |
| Amidon | 570 | 622 | 700 | 287 |
| Saccharose | 93 | 100 | 113 | 46 |
| Huile de soja | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Minéraux | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Vitamines | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Cellulose | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Choline | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Contenu énergétique (%) | | | | |
| Protéines | 20.5 | 14.5 | 5.2 | 54.6 |
| Glucides | 68.5 | 75.0 | 84.0 | 34.9 |
| Lipides | 10.5 | 10.5 | 10.5 | 10.5 |
| Densité énergétique (kJ/g) | 14.57 | 14.56 | 14.54 | 14.60 |

Pendant cette période, la prise alimentaire et la composition corporelle ont été suivies, les variations des taux d'oxydation du glucose et des acides gras ont été mesurées par calorimétrie indirecte suite à l'ingestion d'un repas calibré de 1 g (17 kJ) de leur régime test après une nuit de jeûne. A la fin de l'expérimentation les organes ont été prélevés afin d'évaluer le flux de synthèse protéique, l'expression génique et les niveaux d'activation des voies de signalisation et de leurs cibles. Le protocole expérimental est décrit dans la Figure 19. :

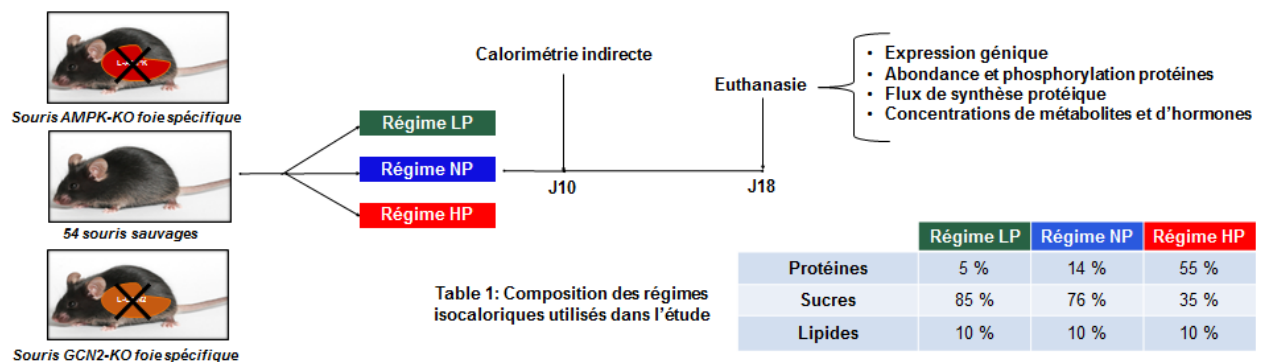


Figure 19: Protocole expérimental des deux études

Des souris de 7 semaines de type sauvages (WT) et des souris KO n'exprimant plus la voie AMPK ou GCN2 dans le foie ont été nourries pendant trois semaines avec un régime à faible, normale ou forte teneur en protéines où respectivement 5, 14 et 55% de l'énergie était apportée par les protéines. Au 10^{ème} jour, elles sont passées en calorimétrie indirecte afin de mesurer les modifications des oxydations des glucides et des lipides en réponse à un repas. Au 18^{ème} jour, les souris ont été euthanasiées, leur composition corporelle a été effectuée. Des organes ont été prélevés afin d'effectuer des mesures d'expression génique, d'abondance et de phosphorylation de protéines, de flux de synthèse protéique et enfin de concentrations plasmatiques en métabolites et hormones.

2.3 Calorimétrie indirecte

2.3.1 Notion de dépense énergétique

La dépense énergétique totale (total energy expenditure - TEE) est la somme de quatre grands postes : Le métabolisme de base (basal energy expenditure - BEE) qui correspond à la dépense énergétique minimale afin d'assurer le fonctionnement de l'organisme dans des conditions standardisées (à jeun, au repos, à neutralité thermique). Il s'agit en fait de l'énergie nécessaire au maintien du potentiel de membrane, au turnover des substrats et à la transcription des gènes (Hulbert and Else, 2004). L'énergie dépensée pour l'activité (activity energy expenditure – AEE) qui correspond à la dépense énergétique liée à toutes les activités de la vie quotidienne, sportives ou non. L'effet thermique des aliments ou thermogénèse postprandiale (thermic effect of feeding - TEF) qui correspond à l'énergie dépensée pour assurer les processus de digestion et d'assimilation des aliments et enfin la thermorégulation qui est la quantité d'énergie dépensée pour maintenir la température corporelle (Even and Nadkarni, 2012; Faisy and Taylor, 2009).

Ainsi, $TEE = BEE + AEE + TEF + \text{Thermoregulation}$

2.3.2 Mesure de la dépense énergétique en calorimétrie indirecte

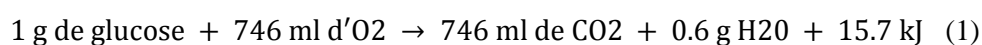
La méthode de calorimétrie indirecte est une technique permettant de mesurer la dépense énergétique totale. Contrairement à la calorimétrie directe qui mesure la dépense énergétique par mesure directe de la production de chaleur, la calorimétrie indirecte utilise le fait que la que la dépense énergétique est intimement liée au métabolisme oxydatif des nutriments (lipides, protéines, glucides) et utilise donc la consommation d'oxygène comme une mesure « indirecte » de la dépense énergétique.

Une première équation permet ainsi d'évaluer la dépense énergétique en considérant que l'énergie provient de moitié de l'oxydation des glucides et de l'autre moitié de l'oxydation des lipides :

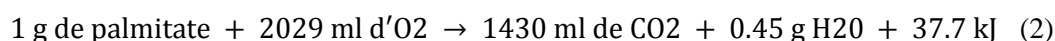
$$DET \text{ (kcal/min)} = VO_2 \times 4,85 \text{ (L/min)}$$

Toutefois, on sait que la production d'énergie par litre d'oxygène consommé est de 5,01 kcal (20,96 kJ) pour le glucose, 4,66 kcal (19,5 kJ) pour les lipides et 4,34 kcal (18,16 kJ) pour les protéines. La dépense énergétique par litre d'oxygène consommé dépend donc du substrat utilisé. Afin de l'évaluer, il est nécessaire de connaître la contribution de chacun des nutriments à l'oxydation totale. La mesure simultanée de l'oxygène consommé et du dioxyde de carbone expiré permet de réaliser ce calcul.

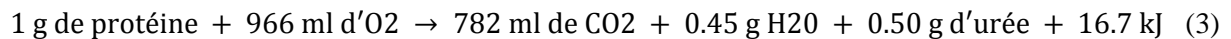
En effet, l'équation de l'oxydation d'un gramme de glucose :



D'un gramme de palmitate :



Et d'un gramme de protéine :



Ainsi le quotient respiratoire, QR, défini comme le ratio entre le CO₂ expiré, VCO₂, et l'O₂ consommé, VO₂, par l'individu est respectivement de 1.0 pour le glucose et de 0.7 pour les lipides, et de 0.8 pour les protéines. Le quotient respiratoire est différent entre glucides, lipides et protéines car le ratio entre le nombre d'atomes de carbone et d'oxygène est supérieur dans les protéines et les lipides que dans les glucides. Par conséquent, il faut apporter plus d'oxygène afin d'oxyder les lipides et les protéines que les glucides (Even and Nadkarni, 2012). Des équations permettent ainsi d'évaluer de manière plus précise la dépense énergétique totale (DET) par litre d'oxygène consommé en prenant en compte le QR, dont la plus populaire, l'équation de Weir (Weir, 1949) : $DET = 16.3 \text{ VO}_2 + 4.57 \text{ VCO}_2$.

Cette équation ne prend pas en compte l'oxydation protéique car celle-ci n'affecte que marginalement la dépense énergétique.

2.3.3 Mesure de l'oxydation des glucides, lipides et protéines

Le calcul des trois valeurs d'oxydation à partir des seules valeurs de l'oxygène consommé et de dioxyde de carbone expiré constitue un système de deux équations à trois inconnus. L'oxydation des protéines ne peut donc pas être directement estimée à partir des échanges gazeux, il est nécessaire de collecter les urines afin de mesurer l'urée excrétée qui est fonction de l'oxydation des protéines. L'oxydation des glucides et des lipides est calculée grâce aux équations de Ferrannini (Ferrannini, 1988), dérivées des réactions d'oxydation d'un gramme de glucose, de plasmate et de protéines (1), (2), (3). Ces équations prennent en compte VO₂ et VCO₂:

$$Gox = (4.55 \times VO_2) - (3.21 \times VCO_2)$$

$$Lox = (1.67 \times VO_2) - (1.67 \times VCO_2)$$

Et optionnellement N, qui correspond à la quantité d'azote excrétée et qui estime l'oxydation des protéines :

$$Gox = (4.55 \times VO_2) - (3.21 \times VCO_2) - 2.87 \times N$$

$$Lox = (1.67 \times VO_2) - (1.67 \times VCO_2) - 1.92 \times N$$

2.3.4 Récupération des données de calorimétrie

La collecte des échanges gazeux chez l'animal est généralement réalisée dans une cage de calorimétrie. La cage calorimétrique est une chambre hermétique, ventilée, qui permet de mesurer la composition de l'air entrant et sortant de la cage et de déterminer ainsi par différence l'oxygène consommé VO₂ et le dioxyde de carbone expiré VCO₂.

Dans le système utilisé au laboratoire, la cage repose sur des capteurs de force qui permettent de mesurer l'activité locomotrice et est maintenue à une température assurant la thermoneutralité de l'animal (environ 30°C pour une souris). En s'affranchissant ainsi de la dépense énergétique liée à la thermorégulation, il est possible de déterminer séparément les dépenses liées au métabolisme de base, à l'activité motrice et à l'effet thermique des aliments.

Dans nos études, les souris ont été placées dans une cage de calorimétrie vers 17h et ont été maintenues à jeun toute la nuit. Le lendemain à 9h, les souris ont été nourries avec une boulette de 1g de leur régime test respectif. La mesure des échanges respiratoires est effectuée en continu de 17:00 à 16:00 le lendemain. Afin d'avoir une valeur moyenne de l'oxydation protéique à jeun et à l'état nourri, le fond de la cage de calorimétrie a été recouvert d'un papier buvard permettant de récolter l'urine. Ce dernier a été changé lorsque la boulette a été introduit dans la cage ce qui a permis d'obtenir une valeur moyenne de l'oxydation des protéines avant, puis après l'ingestion du repas. Après avoir baigné les papiers buvards dans de l'eau distillée, l'urée totale excrétée a été dosée et à partir de cette valeur, les oxydations protéiques à jeun et à l'état nourri ont pu être estimées en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Pox (Watts)} = 6.25 * \text{Urée excrétée (mg/min)} * 2 * (18.06/60)$$

2.4 Mesure des flux de synthèse protéique tissulaires

2.4.1 Principe

Lors de notre travail, nous nous sommes intéressés au rôle de GCN2 et de l'AMPK hépatiques dans le contrôle de la synthèse protéique dans le foie et en périphérie dans le muscle, en période postprandiale chez la souris. Pour cela après une nuit de jeûne, les souris sauvages ou KO ont été nourries avec un repas calibré de 1 g. 1h40 après le début de leur repas, de la ^{13}C -valine a été injecté en excès en intrapéritonéal. Vingt minutes plus tard, les souris ont été euthanasiées, le foie et les quadriceps ont été prélevés. La technique à laquelle nous avons fait appel repose sur un modèle simplifié du métabolisme protéique impliquant deux pools d'acides aminés :

- Le pool des acides aminés libres intracellulaires considéré comme le compartiment précurseur de la synthèse protéique
- Le pool protéique tissulaire

Le principe consiste à surcharger le pool des acides aminés intracellulaires en ^{13}C -valine et à évaluer l'enrichissement en valine marquée dans les protéines tissulaires au bout d'une période de 20 minutes. Le rapport entre l'enrichissement entre les deux compartiments permet par la suite de calculer le taux fractionnaire de synthèse protéique comme illustrée sur la Figure 20 ci-dessous ;

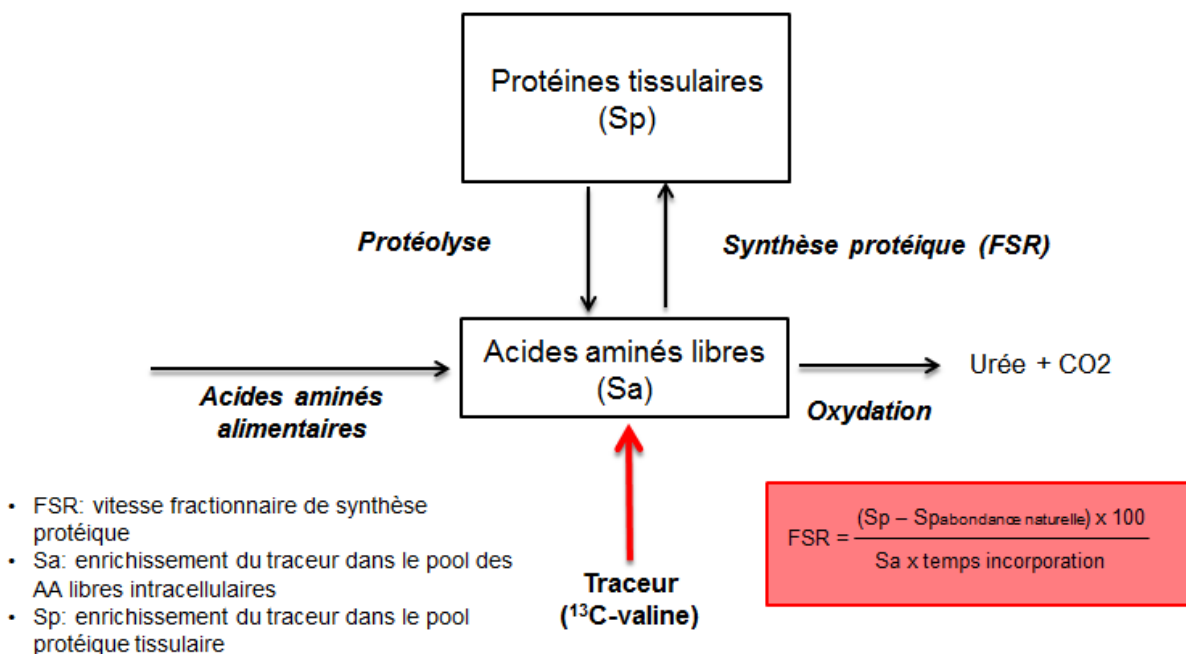


Figure 20: Modèle à deux compartiments utilisé pour les mesures in vivo des taux de synthèse protéique

Le principe de la mesure de la vitesse fractionnaire de synthèse protéique est de surcharger le pool des acides aminés libres en ^{13}C -Valine et de calculer sur une période définie l'enrichissement en ce marqueur du pool protéique tissulaire. Le rapport entre l'enrichissement des deux pools permet de calculer le taux fractionnaire d'enrichissement.

2.4.2 Outils utilisés pour les mesures

Après avoir séparé et rendu volatils les acides aminés, la mesure de l'enrichissement du pool des acides aminés libres est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) tandis que celle du pool protéique tissulaire est effectuée par chromatographie en phase gazeuse suivie d'une combustion et d'un couplage à un spectromètre de masse à ratio isotopique (GC-C-IRMS).

2.5 Autres techniques utilisées

La réalisation de nos études a aussi nécessité l'utilisation d'autres techniques plus classiques : qPCR, western-blot ainsi que plusieurs dosages biochimiques.

2.5.1 qPCR

Les ARN totaux des tissus ont été extraits en utilisant du Trizol (Invitrogen). Leur concentration a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop à 260 nm et leur intégrité confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose. La rétrotranscription a été effectuée sur 0,4 µg d'ARN pour le foie, les hépatocytes, la peau, le muscle gastrocnémien, les tissu adipeux blanc et brun, l'hypothalamus et le noyau accumbens, et sur 4 µg pour les cellules épithéliales du duodénum, jéjunum et iléon. Des témoins négatifs ont été utilisés pour détecter la contamination potentielle (contrôle sans rétrotranscriptase ou sans ARN). La PCR en temps réel a été réalisée sur Step One (Applied Biosystems) pour mesurer l'expression des gènes sur 5 ng d'ADNc pour le foie, la peau, le muscle gastrocnémien, les tissu adipeux blanc et brun, l'hypothalamus et le noyau accumbens, et sur 50 ng pour les cellules épithéliales du duodénum, jéjunum et iléon mélangés à de l'eau, des amorces et du Power SYBR GREEN PCR MIX (Applied Biosystems). L'expression du gène a été calculée comme le $2^{-\Delta CT}$, où $\Delta CT = CT_{\text{Gene}} - CT_{18S}$.

2.5.2 Western-Blot

Brièvement, des échantillons de foie congelés (100 mg) ont été homogénéisés dans un tampon de lyse. Après homogénéisation, les échantillons ont ensuite été soumis à une sonication et la concentration en protéine a été déterminée dans le surnageant en utilisant le kit de dosage de protéine DC (Bio-Rad Laboratories). Un équivalent de 50 µg de protéines du foie a été déposé sur gel. Après électrophorèse, les protéines ont été transférées deux heures à 4°C sur une membrane de nitrocellulose (0,2 µm, Bio-Rad Laboratories). La membrane a ensuite été bloquée et incubée avec un anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. A la fin de l'incubation et après rinçage, les membranes ont été mises en incubation avec un anticorps secondaire et un anticorps anti-actine conjugué à la peroxydase de raifort (1/2000; Santa Cruz Biotechnology) pendant 2 heures à la température ambiante. Après un nouveau rinçage, la révélation des membranes a été effectuée en utilisant Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories).

2.5.3 Dosages biochimiques

Le profil plasmatique en métabolites (acides gras non estérifiés, urée, acide urique, albumine, cholestérol, glycérol, cholestérol HDL, β-hydroxybutyrate, triglycérides) a été mesuré en utilisant un automate : TG Olympus AU400. Les concentrations hépatiques en triglycérides ont été évaluées sur des homogénats de foie en utilisant un kit de dosage TG (Randox triglycérides). Le glycogène a été extrait à partir du foie à l'aide de KOH à 30%, digéré en glucose par l'amyloglucosidase (Sigma) et dosé à l'aide d'un kit de dosage du glucose (Randox Gluc). Le profil plasmatique en hormones

(glucagon, GLP-1 et ghréline) a été dosé à l'aide d'un Luminex (Bio-Rad Laboratories). Enfin, les concentrations plasmatiques en insuline et FGF21 ont été analysés en utilisant un dosage immuno-enzymatique (Merckodia Mouse Insulin /FGF21 ELISA, Symansis).

3 Travail personnel

3.1 Article I: Un régime faible en protéines augmente tandis qu'un régime fort en protéines diminue la production hépatique de FGF21 mais le glucose et pas les acides aminés, stimule l'expression de FGF21 dans des hépatocytes en culture.

(Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes)

3.1.1 Contexte :

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) est un polypeptide sécrété par le foie et impliqué dans plusieurs processus métaboliques tels que la cétogenèse, l'oxydation des lipides, la thermogénèse et le brunissement du tissu adipeux. Les mécanismes nutritionnels contrôlant sa sécrétion sont complexes: des études ont rapporté que FGF21 était sécrété en réponse à un jeûne, à l'ingestion d'un régime déficient en acides aminés mais également à la disponibilité en glucose ou fructose. Par ailleurs, le rôle de FGF21 dans les adaptations métaboliques en réponse aux variations du ratio protéines/glucides du régime ont été peu étudiées.

3.1.2 Objectif :

Cette étude vise à clarifier l'effet de la modulation du ratio protéines/glucides du régime sur la synthèse et la sécrétion de FGF21 et de comprendre l'implication de FGF21 dans les effets métaboliques observés sous des régimes avec un ratio protéine/glucide faible, normal ou fort.

3.1.3 Méthodes:

25 souris mâles âgés de 7 semaines ont été divisés en 3 groupes (n = 8-9 / groupe) et nourries pendant 3 semaines avec des régimes contenant un ratio protéine/glucide faible (LPHC), normal (NPNC) ou haut (HPLC). Durant l'expérimentation, la prise alimentaire et le poids ont été suivis, la thermogénèse postprandiale et les taux d'oxydation des protéines, glucides et lipides ont été mesurés par calorimétrie indirecte à la suite d'un repas. À la fin de l'expérimentation, des échantillons de sang, de foie, de tissus adipeux brun et épидidymaire ont été prélevés afin d'effectuer des mesures d'expressions géniques, de quantités de protéines et de métabolites. Parallèlement à cette manipulation *in vivo*, des cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été réalisées pour mesurer les effets des acides aminés, de la leucine et du glucose en présence d'insuline et/ou de glucagon sur la synthèse de FGF21 dans des hépatocytes isolés.

3.1.4 Résultats principaux:

La consommation d'un régime avec un ratio protéine/glucide faible, LPHC, entraîne une forte augmentation de la synthèse de FGF21. A l'état nourri, cette synthèse est inversement proportionnelle

au contenu protéique du régime. Les cultures d'hépatocytes montrent toutefois que les acides aminés ou la leucine seuls n'ont pas d'effet sur la synthèse de FGF21 mais que l'augmentation de concentration en glucose suffit à stimuler la synthèse de FGF21. Les consommations de régimes LPHC et HPLC sont toutes deux associées à une augmentation de la thermogénèse postprandiale mais avec des cinétiques différentes. Le régime LPHC augmente l'expression la protéine découplante UCP2 dans le tissu adipeux blanc tandis que le régime HPLC est associé à une augmentation de la cétogénèse à jeun.

3.1.5 Conclusion:

Ces résultats suggèrent que la sécrétion de FGF21 dépend fortement du ratio protéine/glucide du régime : un régime riche en glucides mais faible en protéines stimule la sécrétion de FGF21 tandis qu'un régime faible en glucides mais fort en protéines l'éteint. Le glucose et non les acides aminés serait le principal facteur qui module l'expression de FGF21. L'effet du régime LPHC sur l'augmentation de la thermogénèse pourrait donc être médié par FGF21 tandis que l'effet du régime HPLC sur la cétogénèse et la thermogénèse repose probablement sur une autre voie métabolique.

3.1.6 Manuscrit:

Le manuscrit a été accepté et publié dans the Journal of Nutritional Biochemistry :
J Nutr Biochem. 2016 Jul 25;36:60-67. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.002

Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes^{☆,☆☆}

Tristan Chalvon-Demersay, Patrick C. Even, Daniel Tomé, Catherine Chaumontet, Julien Piedcoq, Claire Gaudichon, Dalila Azzout-Marniche*

UMR PNCA, AgroParisTech, INRA, Université Paris Saclay, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Received 24 February 2016; received in revised form 10 June 2016; accepted 5 July 2016

Abstract

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a polypeptide secreted by the liver and involved in several metabolic processes such as thermogenesis and lipid oxidation. The nutritional mechanisms controlling FGF21 production are poorly understood. This study aimed to investigate how dietary carbohydrates and proteins impact FGF21 production and how in turn, FGF21 is involved in the metabolic adaptation to changes in the carbohydrate and protein contents of the diet. For that purpose, we fed 25 male C57BL/6 mice diets composed of different protein and carbohydrate contents (normal-protein and carbohydrate diet ($N=9$, NPNC), low-protein high-carbohydrate diet ($N=8$, LPHC), high-protein low-carbohydrate diet ($N=8$, HPLC) for 3 weeks. We measured liver *Fgf21* gene expression, synthesis and secretion as well as different parameters related to energy and glucose metabolism. We also investigated the direct role of amino acids and glucose in the control of *Fgf21* gene expression in hepatocyte primary cultures ($n=6$).

In vivo, FGF21 responds acutely to LPHC intake whereas under an HPLC diet, plasma FGF21 circulating levels are low in the fasted and refed states. In hepatocytes, *Fgf21* expression was controlled by glucose but not amino acids. Both diets increased the thermic effect of feeding (TEF) and ketogenesis was increased in fasted HPLC mice. The results presented suggest that dietary glucose, rather than amino acids, directly controls FGF21 secretion, and that FGF21 may be involved in the increased TEF response to LPHC. The effects of the HPLC diet on ketogenesis and TEF are probably controlled by other metabolic pathways. © 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: FGF21; Amino acids; Glucose; Calorimetry; Physiology

1. Introduction

Fibroblast growth factor 21 (FGF21) is a 181-amino acid polypeptide encoded by the *Fgf21* gene that belongs to a family of fibroblast growth factors [1]. It is secreted primarily by liver, but also by several tissues including white adipose tissue, brown adipose tissue, striated muscle, heart, and pancreas [2]. FGF21 appears as a regulator of glucose and lipid metabolism with potential involvement in obesity,

dyslipidaemia, diabetes and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [3–9].

Gene expression of FGF21 is sensitive to the nutritional state [10]. However, conflicting effects are reported in the literature, particularly concerning the effect of fasting and refeeding. Indeed, fasting has been shown to stimulate FGF21 secretion in humans [11] and in rodents [12,13]. However, in humans, two days of fasting were not sufficient to stimulate FGF21 secretion, proving the importance of fasting duration [11]. On the other hand, refeeding was shown to decrease [12,13], to increase [14] or to have no effect [14] on FGF21 secretion. In these different studies, the duration of the fasting/refeeding periods, as well as the caloric intake during refeeding, were not equally controlled. These discrepancies prevent us from concluding with certainty the effect of fasting and refeeding on FGF21 secretion.

Hormone and nutrient concentrations are modulated according to the nutritional state, and it has been reported that insulin [15] and glucose [16] increased *Fgf21* mRNA synthesis and secretion in cultured rat hepatocytes. Fructose is also a potent activator of FGF21 secretion [17]. However, as for the fasting effect, the effect of glucagon on *Fgf21* mRNA synthesis has not been clearly established. Glucagon is usually increased with fasting and it has been shown either to induce *Fgf21* gene expression, an effect counteracted by insulin [18], or to

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AEE, energy cost of activity; BAT, brown adipose tissue; FAS, fatty acid synthase; FGF21, fibroblast growth factor 21; CPT1a, carnitine palmitoyltransferase 1a; Gox, glucose oxidation; HPLC, high-protein low-carbohydrate diet; LPHC, low-protein high-carbohydrate; Lox, lipid oxidation; NPNC, normal-protein and carbohydrate diet; Pox, protein oxidation; RMR, resting metabolic rate; TEF, thermic effect of feeding; UCP, uncoupling protein.

* Grants: This work was supported by UMR 914 funds.

** Disclosure: No potential conflicts of interest are reported.

* Corresponding author: Tel.: +33144087244; fax: +33144081858.

E-mail address: dalila.azzout_marniche@agroparistech.fr

(D. Azzout-Marniche).

reduce *Fgf21* mRNA abundance in rat hepatocytes and to potentiate insulin action [15].

Plasma FGF21 secretion is also sensitive to the macronutrient content of the diet. A high-fat diet increases mRNA encoding *Fgf21* in both adipose tissue and liver, and increases plasma FGF21 concentration in rodents [19]. In isolated hepatocytes, BSA-conjugated linoleic acid, but not palmitic and stearic acid, increases *Fgf21* mRNA abundance significantly [13]. FGF21 concentration is also increased 10-fold higher in mice and rats fed a low-protein high-carbohydrate (LPHC) [14] diet, and is induced by methionine and leucine restriction or deprivation [20–22]. Lastly, high-protein low-carbohydrate (HPLC) diet intake stimulates fatty acid mobilization through a FGF21/glucagon pathway in obese rats fed a 30% caloric restricted diet [18]. This is in contrast to a high-protein low-carbohydrate (HPLC) meal, which has no effect on FGF21 secretion in rats refed after a 48 h-fast [14].

In this context, the present study aims to clarify the effect of dietary protein to carbohydrate ratio of the diet on liver *Fgf21* gene expression, synthesis and secretion, and to understand how FGF21 is involved in the metabolic effects of these diets. For that purpose, we fed male C57BL/6 mice diets composed of different protein and carbohydrate contents. We then measured liver *Fgf21* gene expression, synthesis and secretion as well as different parameters related to energy and glucose metabolism. We also aimed to investigate the direct role of amino acids and glucose in the control of *Fgf21* gene expression in hepatocyte primary cultures.

2. Research design and methods

2.1. Animals

The study was approved by the French National Animal Care Committee (number 14–15) and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals. Twenty-five male C57BL/6 mice were generated in the light and temperature-controlled animal facility of AgroParisTech (Temp 22°C±1, humidity 60%, 12/12 reversed L/D cycle lights on at 21:00). The mice were weaned at the age of 25 days and fed during the 24 following days with a standard diet conforming to AIN93 requirements, thus containing normal protein and carbohydrate contents (NPNC) as a run-in prior to the experiment.

2.2. Experimental design

After the run-in period, mice were then divided into 3 groups: one was maintained on the same NPNC diet as during the run-in period ($n=9$); one was switched to a low protein high carbohydrate (LPHC) diet ($n=8$); and one was switched to a high protein low carbohydrate (HPLC) diet ($n=8$). The three groups of mice were maintained on their test diet for another 3-week period. Diet compositions are reported in Table 1.

Each group of mice received the test diet for 3 weeks. Body weight and food intake were measured every morning except on weekends. During the second week, the thermogenic response and the changes in glucose, lipid and protein oxidation induced by ingestion of a 1 g (14.5 kJ) calibrated meal of the test diets were measured.

At the end of the study, blood (50 µl) was collected from the tail after an overnight fast. Mice were then refed 1 g of their test diet. Four hours after meal onset, mice were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg) then killed following exsanguination by blood sampling from the vena cava (500 µl). Glycaemia was immediately assayed on a drop of blood using an automatic analyzer (Life-Scan, One Touch Vita). The blood samples were collected on EDTA, immediately centrifuged (4°C, 3000 rpm for 15 min) and stored at –80°C until assayed. Body composition was determined by dissection and weighing of the main organs and tissues. All visceral

Table 1

Macronutrient composition of the three diets used in the study.

| | LPHC | NPNC | HPLC |
|-----------------------|-------|-------|-------|
| Weight content (g/kg) | | | |
| Milk proteins | 50 | 140 | 530 |
| Starch | 700 | 622 | 287 |
| Sucrose | 113 | 100 | 46 |
| Soy Oil | 40 | 40 | 40 |
| Minerals | 35 | 35 | 35 |
| Vitamins | 10 | 10 | 10 |
| Cellulose | 50 | 50 | 50 |
| Choline | 2 | 2 | 2 |
| Energy content (%) | | | |
| Protein | 5.2 | 14.5 | 54.6 |
| Carbohydrate | 84.0 | 75.0 | 34.9 |
| Fat | 10.5 | 10.5 | 10.5 |
| Energy density (kJ/g) | 14.54 | 14.56 | 14.60 |

and subcutaneous adipose pads were dissected and weighed. Adiposity was defined as the ratio of adipose tissue weight to body weight and was expressed as % of body weight. Samples of liver, epididymal adipose tissue, and brown adipose tissue (BAT) were deep frozen in liquid nitrogen then stored at –80°C for further gene expression measurement and biochemical analysis. Other liver samples were placed in lysis buffer and stored at –80 °C for western-blot analysis.

2.3. Assays

Plasma insulin and FGF21 were assayed using enzyme-linked immunoassay (Mercodia Mouse Insulin/FGF21 ELISA kit, Symansis). β-Hydroxybutyrate concentrations in plasma were assessed using the automated chemistry analyzer Olympus AU400.

2.4. Macronutrient oxidation and thermic effect of feeding

Mice were housed close to thermoneutrality (30°C) in a calorimetry cage at 17:00 and were fasted overnight. At 09:00 the next day, 1 g of their respective test diet was introduced into the cage and it was monitored that the food was ingested within 30 min. Measurements of respiratory exchanges were performed continuously from 17:00 to 16:00 the next day. Data were acquired in 2 s intervals to allow precise analysis of the changes in total metabolic rate induced by activity in order to determine energy cost of activity (AEE) and extract resting metabolic rate (RMR) while animals were freely moving (for details see [23]). Glucose (Gox) and lipid oxidation (Lox) were computed from resting oxygen and carbon dioxide consumption and protein oxidation (Pox) using standard stoichiometric equations [23]. Protein oxidation was computed from urea nitrogen excreted in urine, assuming that all deaminated amino acids were oxidized [24]. To this end, the floor of the calorimetry cage was covered with blotting paper to absorb urine. The blotting paper was changed when the meal was given to separate urine collected during the pre- and post-meal period. Urea was recovered by soaking the blotting paper in sterile water overnight and was measured using a kit (Urea kit, Biomérieux).

To compute the rate of Gox and Lox, it was assumed that the rate of protein oxidation followed the changes in RMR, as previously measured in rats [24,25].

TEF was computed from the meal-induced increase in RMR vs. its average values during the two hours that preceded meal delivery.

2.5. Primary culture of rat hepatocytes

Five rats were fed *ad libitum* with a commercial laboratory chow diet and had free access to water for 1 week. The day of

hepatocyte collection, rats were deeply anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg), the liver was dissected and hepatocytes were isolated using the collagenase method [26] as described previously [27]. Once cell viability was assessed by the trypan blue exclusion test (viability >85%) hepatocytes were plated at a density of 7×10^6 cells/dish in 100 mm petri dishes in M199 medium with Earle's salts (GIBCO, Invitrogen), supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin, 0.1% (wt/vol) bovin serum albumin, 2% (vol/vol) Ultrocser G (Pall Life Sciences), 100 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 1 nM insulin (Sigma-Aldrich), and 100 nM triiodothyronine (Sigma-Aldrich). The cells were allowed to attach for 4–5 h before the medium was replaced by M199 medium salts supplemented with 5 mM glucose and amino acids (at a concentration previously measured in the portal vein of NPNC rats in the fasting state) as previously described [27]. Cells were maintained in this medium overnight (18–24 h) and then incubated for an additional 2 h under one of the twenty-five conditions described in Fig. 2. Each treatment was performed in duplicate.

2.6. Western-blot analysis

Frozen pieces of liver (100 mg) were homogenized in a lysis buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM sodium fluoride, 25 mM sodium-B-glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 10% glycerol (vol/vol) and 1% (vol/vol) Triton X-100 supplemented with a protease inhibitor cocktail (1 tablet/50 ml, Complete, EDTA-Free, Roche). Samples were then sonicated (2 W, 10 s, 0.5 s pulse) and centrifuged at 4°C and 10,000×g for 10 min. The supernatant was collected and protein concentration was determined using the DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). An equivalent of 100 µg of protein from liver was deposited and resolved with Criterion TGX Gels, 4–15% (Bio-Rad Laboratories). After electrophoresis, the proteins were transferred 2 h at 4°C to a 0.2 µm nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories). The membrane was incubated 5 min in Ponceau S and washed with water to assess the quality of the transfer. The membrane was then blocked for 1 h at room temperature in a solution of 5% (wt/vol) low-fat milk powder in 10 mM Tris HCl (pH 7.4), 0.5 M NaCl, and 0.1% (vol/vol) Tween-20 (TBST) and then washed with TBST at room temperature. Incubation with the primary anti-FGF21 antibody (ab1719471, Abcam) was performed overnight at 4°C (dilution 1/1000). The following day, the membrane was incubated with an anti-rabbit secondary antibody (dilution 1/2000) and an anti-actine antibody, both conjugated to horseradish peroxidase for 2 h at room temperature. After further washing with TBST, the blot was recovered with Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories) to reveal the bands. Data are expressed as a percentage of the values of the NPNC fed mice.

2.7. RNA preparation and gene expression measurement

Total RNA from liver, epididymal adipose tissue, BAT and hepatocytes from primary cultures was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA concentrations were assessed using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm. RNA integrity was confirmed by electrophoresis on agarose gel. Retrotranscription was performed on 0.4 µg of RNA to synthesize cDNA using High Capacity cDNA Archive Kit Protocol (Applied Biosystems). Real Time PCR was performed to measure gene expression on the ABI 7300 (Applied Biosystems) using Power SYBR GREEN PCR MIX (Applied Biosystems). We studied mRNA encoding *Fgf21* and other proteins involved in glucose metabolism, lipid metabolism, and adipose tissue browning. The primer sequences of genes were designed with Primer Express software. Primers are available in supplemental Table S1. RT-PCR was performed using 5 ng

(2.5 µl) of cDNA in addition to 7.5 µl of the reagent mix containing RNase-free water, PCR Mix, forward and reverse primers. Negative controls were used to detect potential contamination (control without RTase or RNA). The threshold (CT) was set with a constant value for all of the genes and samples to quantify the mRNA concentration, and gene expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{Gene} - CT_{18S}$. Data are expressed as a percentage of the values of the NPNC group.

2.8. Statistics

The data are presented as means ± SEM. The effect of the diets was tested by one-way ANOVA. For FGF21 plasma concentrations in the fasted and refed states, the effects of the diets and fasted/fed states were tested by two-way ANOVA. For *Fgf21* mRNA levels in hepatocytes, the effects of glucose, hormone and amino acids were tested by three-way ANOVA. Pairwise comparisons were performed with post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, *P* value were multiplied by the number of comparisons performed. Linear regression analyses were performed to correlate the logarithm of FGF21 plasma concentration and the areas under the curve of protein and glucose oxidations between 3 and 4 h after meal onset. Statistical analyses were performed using R. Differences were considered significant at *P* < .05.

3. Results

3.1. Food intake, body weight, body composition and plasma glucose, insulin and β-hydroxybutyrate concentration

Food intake was increased in LPHC fed mice and decreased in HPLC fed ones (Table 2). Retroperitoneal, subcutaneous and epididymal fat pads and total body fat were less in HPLC fed mice whereas no difference was observed between LPHC and NPNC mice. BAT was not modified. No effect of the diet was observed on fasted and fed plasma glucose and insulin concentrations, but fasted β-hydroxybutyrate concentrations were higher in mice fed the HPLC diet that in those fed the LPHC diet, suggesting an increased oxidation of amino acids during fasting in HPLC fed mice (Table 3).

3.2. Liver FGF21 synthesis and excretion in vivo and in vitro

In vivo, liver *Fgf21* mRNA level expressed relative to NPNC mice was 4 times larger in LPHC mice and almost completely blunted in HPLC mice (Fig. 1A). Liver FGF21 proteins were also significantly higher in LPHC fed mice, but differences were of much smaller amplitude than for *Fgf21* mRNA, suggesting that FGF21 protein was rapidly exported (Fig. 1B). Fasting plasma FGF21 levels were similar in LPHC and NPNC mice but very low in HPLC mice. Ingestion of the test

Table 2
Food intake and body composition of mice fed LPHC, NPNC or HPLC diets.

| | LPHC | NPNC | HPLC | ANOVA |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------|
| Cumulated food intake (g) | 94.55 ± 1.64 ^a | 73.91 ± 2.78 ^b | 54.09 ± 2.28 ^c | <0.001 |
| Initial weight (g) | 23.38 ± 0.22 | 22.97 ± 0.31 | 23.2 ± 0.36 | — |
| Final weight (g) | 23.53 ± 0.01 | 24.24 ± 0.01 | 23.5 ± 0.03 | — |
| Lean body mass | 21.15 ± 0.31 ^a | 21.99 ± 0.43 ^{ab} | 22.80 ± 0.16 ^b | <0.05 |
| Body fat (g) | 2.39 ± 0.01 ^a | 2.25 ± 0.02 ^a | 1.61 ± 0.02 ^b | <0.001 |
| Adiposity (%) [*] | 10.15 ± 0.07 ^a | 9.21 ± 0.10 ^a | 6.92 ± 0.09 ^b | <0.001 |
| Epididymal fat (g) | 0.46 ± 0.07 ^a | 0.45 ± 0.09 ^a | 0.31 ± 0.17 ^b | <0.01 |
| Mesenteric fat (g) | 0.24 ± 0.00 | 0.24 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 | — |
| Retroperitoneal fat (g) | 0.21 ± 0.01 ^a | 0.18 ± 0.04 ^{ab} | 0.13 ± 0.03 ^b | <0.05 |
| Subcutaneous fat (g) | 1.38 ± 0.02 ^a | 1.28 ± 0.02 ^a | 0.86 ± 0.03 ^b | <0.01 |
| Brown adipose tissue (g) | 0.095 ± 0.02 | 0.092 ± 0.01 | 0.079 ± 0.02 | — |

Values are mean ± SEM *Adiposity (%) = ((Body fat (g)/Final weight (g)) * 100.

^{a,b,c} Values with different letters within a line are statistically different (post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons, *P* < 0.05).

Table 3
Results from assays performed in plasma of mice fed LPHC, NPNC or HPLC diets.

| | | LPHC | NPNC | HPLC | ANOVA |
|--------|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------|
| Fasted | β -hydroxybutyrate (mmol/l) | 0.09±0.01 ^a | 0.19±0.02 ^{ab} | 0.28±0.06 ^b | <0.05 |
| | Glucose (mg/dl) | 86.63±14.1 | 113.00±9.43 | 111.62±17.1 | — |
| | Insulin (UI/ml) | 0.13±0.04 | 0.14±0.06 | 0.15±0.05 | — |
| Fed | β -hydroxybutyrate (mmol/l) | 0.61±0.22 | 0.41±0.09 | 0.63±0.15 | — |
| | Glucose (mg/dl) | 163.25±10.8 | 153.75±5.86 | 122.00±7.93 | — |
| | Insulin (UI/ml) | 1.23±0.66 | 1.54±0.31 | 1.85±0.53 | — |

Values are mean±SEM.

^{a,b,c} Values with different letters within a line are statistically different (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, $P<0.05$).

meal increased plasma FGF21 three times in LPHC mice but did not affect plasma FGF21 in NPNC and HPLC mice (Fig. 1C).

In primary hepatocyte cultures (Fig. 2), *Fgf21* mRNA levels incubated with 5 mM glucose were identical with low and high amino-acid concentrations and were not modified by the addition of insulin or insulin and glucagon. In contrast, glucagon alone significantly decreased *Fgf21* mRNA levels, and insulin alone in the presence of 25 mM glucose strongly increased *Fgf21* mRNA levels.

3.3. Macronutrient oxidation and thermic effect of feeding

In the fasted state, before ingestion of the test meal, RMR and glucose oxidation were not different between groups (Fig. 3A–D), Lox was significantly lower in HPLC mice than in NPNC and LPHC mice (Fig. 3B), and Pox was in proportion to the protein content of the diet. In response to ingestion of the test meals, and in accordance with the carbohydrate and protein contents of the diets, Gox increased the most and Pox the least after ingestion of the LPHC diet, while Pox increased the most and Gox the least after ingestion of the HPLC diet (Fig. 3A–C). In contrast, smaller differences were observed for the meal-induced changes in lipid oxidation, although the decrease in lipid oxidation tended to be of lower amplitude in response to the HPLC meal. Accordingly, Lox decreased below 0 between 1 and 5 h after ingestion of the LPHC and NPNC meals, revealing the occurrence of a long-lasting period of lipogenesis in contrast to what was observed in HPLC fed mice (Fig. 3B). TEF was higher in LPHC and HPLC mice compared to NPNC mice (Fig. 3D). However, the kinetic did not

appear the same for the HPLC and LPHC diets. The increase in TEF occurred earlier after the meal for the HPLC diet (0–2 h) and was primarily due to the fact that Lox decreased slower after ingestion of the HP meal. The increase in TEF occurred later (2–4 h) for the LPHC diet and was due to a very high rate of Gox that over-compensated for the negative rate of Lox and the low rate of Pox. Interestingly, FGF21 plasma concentrations strongly correlated with glucose and protein oxidations between 3 and 4 h (Fig. 3E–F).

3.4. Adipose tissues and liver gene expressions

The protein content of the diet had no effect on mRNA expression of the gene encoding carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) or the different isoforms of uncoupling protein UCP in the BAT (Table 4), but *Ucp1* expression tended to be lower in the BAT of LPHC fed mice compared to NPNC fed mice ($P=.11$). However, the expression of acetyl-CoA carboxylase beta (*Acacb*) decreased with the increase in the protein content of the diet ($P<0.05$) and was significantly lower in HPLC than in LPHC mice (Table 4). In the epididymal white adipose tissue no significant change was observed for mRNA encoding *Cpt1a*, *Acacb* and *Ucp3or* key enzymes involved in lipogenesis (fatty acid synthase (*Fas*) and acetyl-CoA carboxylase alpha (*Acaca*)) (Table 4). *Cpt1a* expression, however, tended to decrease in mice fed the HPLC diet ($P=.06$) and the expression of *Ucp2* was higher in mice fed the LPHC diet than in those fed the NPNC and HPLC diet (Table 4). Moreover, the expression of *Ucp1* was not detected, suggesting no browning process in this tissue. In the liver, no major changes were observed in gene encoding lipogenesis, β -oxidation and ketogenesis (Table 4).

4. Discussion

FGF21 is involved in numerous metabolic processes such as glucose uptake, lipolysis, hepatic lipid oxidation, ketogenesis, and thermogenesis and is therefore a potential target for the treatment of metabolic dysfunctions [3–9]. The main goal of this study was to determine the possible relationships between metabolic and behavioral adaptation to the dietary level of protein and liver FGF21 synthesis and secretion. In vivo, FGF21 responds acutely to LPHC intake whereas under HPLC diet, plasma FGF21 circulating levels are low in the fasted and refed states. In hepatocytes, *Fgf21* expression is controlled by glucose but not amino acids. The results presented herein suggest that FGF21 may be involved in the metabolic effects of high carbohydrate but not high protein diets.

Table 4
mRNA expression in brown and epididymal adipose tissues and in liver of mice fed LPHC, NPNC or HPLC diets.

| | LPHC | NPNC | HPLC | Test |
|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------|
| Brown adipose tissue | | | | |
| <i>Acacb</i> (acetyl-CoA carboxylase beta) | 116.7±24.3 ^a | 100±5.46 ^{ab} | 85.1±9.30 ^b | <0.05 |
| <i>Cpt1a</i> (carnitine palmitoyltransferase 1a) | 158.7±24.3 | 100±15.1 | 123.7±15.8 | — |
| <i>Ucp1</i> (uncoupling protein 1) | 61.90±5.10 | 100±14.2 | 96.88±12.4 | — |
| <i>Ucp2</i> (uncoupling protein 2) | 158.1±46.5 | 100±10.2 | 86.91±6.02 | — |
| <i>Ucp3</i> (uncoupling protein 3) | 93.92±8.16 | 100±4.53 | 111.4±9.64 | — |
| Epididymal adipose tissue | | | | |
| <i>Acaca</i> (acetyl-CoA carboxylase alpha) | 157.8±43.1 | 100±9.65 | 134.9±43.0 | — |
| <i>Acacb</i> (acetyl-CoA carboxylase beta) | 97.41±5.38 | 100±8.51 | 143.5±29.1 | — |
| <i>Cpt1a</i> (carnitine palmitoyltransferase 1a) | 102.5±6.70 | 100±9.74 | 73.04±6.65 | — |
| <i>Fas</i> (fatty acid synthase) | 155.0±28.8 | 100±17.6 | 176.5±75.0 | — |
| <i>Ucp2</i> (uncoupling protein 2) | 157.9±13.5 ^a | 100±6.92 ^b | 100.2±5.84 ^b | <0.01 |
| <i>Ucp3</i> (uncoupling protein 3) | 132.4±20.7 | 100±15.3 | 127.4±31.1 | — |
| Liver | | | | |
| <i>Acaca</i> (acetyl-CoA carboxylase alpha) | 97.16±12.1 | 100±5.63 | 112.3±20.8 | — |
| <i>Acox</i> (peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase) | 76.57±12.6 | 100±9.90 | 69.80±16.2 | — |
| <i>Cpt1a</i> (carnitine palmitoyltransferase 1a) | 106.45±12.2 | 100±8.91 | 128.1±19.3 | — |
| <i>Fas</i> (fatty acid synthase) | 93.66±13.8 | 100±12.1 | 96.62±18.7 | — |
| <i>Hmgcl</i> (3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA lyase) | 94.65±6.57 | 100±9.70 | 71.77±9.57 | — |
| <i>Hmgcs1</i> (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1) | 155.15±40.9 | 100±10.4 | 143.9±18.3 | — |

^{a,b,c} Values with different letters within a line are statistically different (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, $P<0.05$).

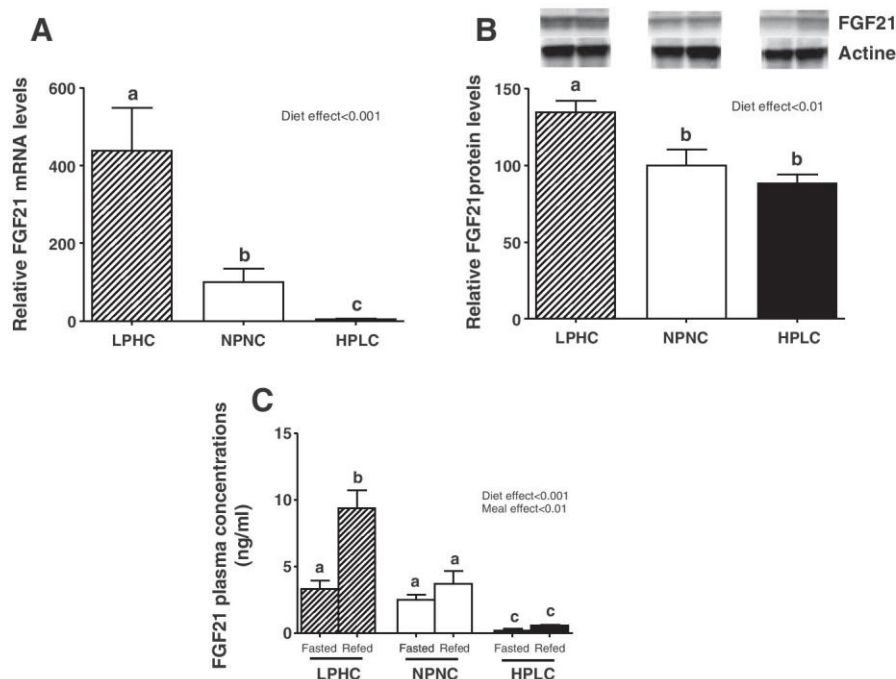


Fig. 1. Modulation of FGF21 protein and mRNA abundance in the liver and in plasma. A: Changes in *Fgf21* mRNA levels in the liver. Data are mean \pm SEM ($n=8-9$). Values were log-transformed before statistical analysis. B: Changes in FGF21 protein levels in the liver. Data are mean \pm SEM ($n=8-9$). Values were log-transformed before statistical analysis. C: FGF21 protein abundance in mouse plasma in the fasted and fed states. Data are mean \pm SEM ($n=5-6$). Values were log-transformed before statistical analysis. The effect of the diet was tested by one-way ANOVA except for FGF21 protein abundance where two-way ANOVA was performed using R. Pairwise comparisons were performed with post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P<.05$. Bars with different letters within a graph are statistically different.

FGF21 has been proposed as a signal of protein restriction because rats fed an LPHC diet exhibit high FGF21 secretion [14]. We observed that refeeding fasted mice an LPHC diet induced FGF21 secretion, which confirms this previous observation. Additionally, we showed that incubating hepatocytes with a low concentration of amino acids

had no direct effect on FGF21 gene expression whereas glucose in the presence of insulin strongly induced FGF21 mRNA synthesis. Moreover, a recent study has reported that fructose was also an activator of FGF21 synthesis and secretion [17]. Thus, the LPHC diet intake, characterized by a large bulk of glucose and fructose associated with a low concentration of amino acids, could explain its strong and acute effect on FGF21 secretion during refeeding. We also observed that refeeding fasted mice a high-protein diet did not induce any secretion of FGF21 in mice that already had very low plasma FGF21 levels in the fasted state. In contrast, Uebanso et al. observed a higher expression of FGF21 in obese rats fed an HPLC diet than in a similar group fed a control diet [18]. However, in this study, rats were obese, had a fatty liver and were fed a 30% caloric restricted diet, which may have affected the long-term regulation of FGF21 secretion. In line with these results, Laeger et al. have shown that refeeding an HPLC meal had no effect on FGF21 secretion [14], but did not show a lower circulating level of FGF21 in HPLC refeed rats, suggesting that our observation may be due to a chronic effect of the HPLC diet possibly through a decrease of hepatic triglyceride concentration. Indeed, it has been shown that a high-protein diet decreases hepatic triglyceride concentration [28], and that FGF21 secretion is closely linked to this concentration [29]. We observed no difference in FGF21 secretion in NPNC and HPLC between the fasted and the refeed states, which is in contradiction with results from previous studies on the effect of fasting on FGF21 secretion [12–14]. Gene expression of FGF21 is sensitive to the nutritional state, possibly through PPAR- α , insulin and glucagon pathways [10]. Indeed, fasting stimulates FGF21 secretion in humans [11] and in wild-type mice [12], but not in PPAR- α null mice [13]. However, FGF21 also induces hepatic expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator protein-1 α (PGC-1 α), upstream key transcriptional regulator of PPAR- α , in livers of mice injected with FGF21 [30]. Thus it is unclear if glucagon induces FGF21 through PPAR- α or if FGF21 induces PPAR- α through the induction of

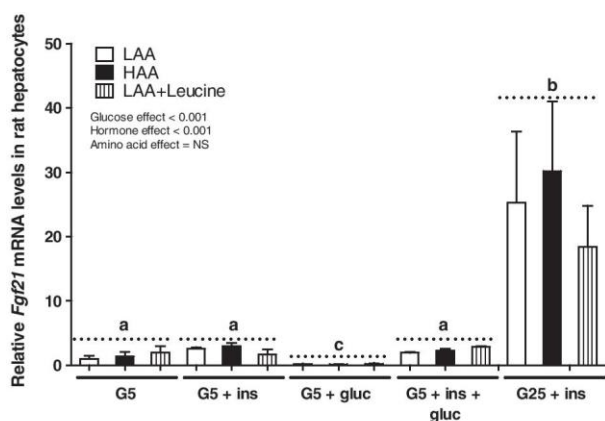


Fig. 2. Changes in *Fgf21* gene expression in rat primary hepatocytes. LAA (Low amino acid) corresponds to amino acid concentration measured in the portal vein of fasted rats, HAA (High amino acid) and Leucine correspond respectively to amino acid and leucine concentrations measured in the portal vein of rats in the post-prandial state fed an HPLC diet as previously described [27]. Hepatocytes were either treated with 5 mM of glucose (G5) or 25 mM of glucose (G25) in the presence or not of insulin (100 nM) (ins) and glucagon (100 nM) (gluc). Data represent mean \pm SEM ($n=6$). Values were log-transformed before statistical analysis. The effect of the incubation conditions (glucose, hormone, amino acid) was tested by three-way ANOVA using R. Pairwise comparisons were performed with post hoc Bonferroni tests for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P<.05$. Bars with different letters within a graph are statistically different.

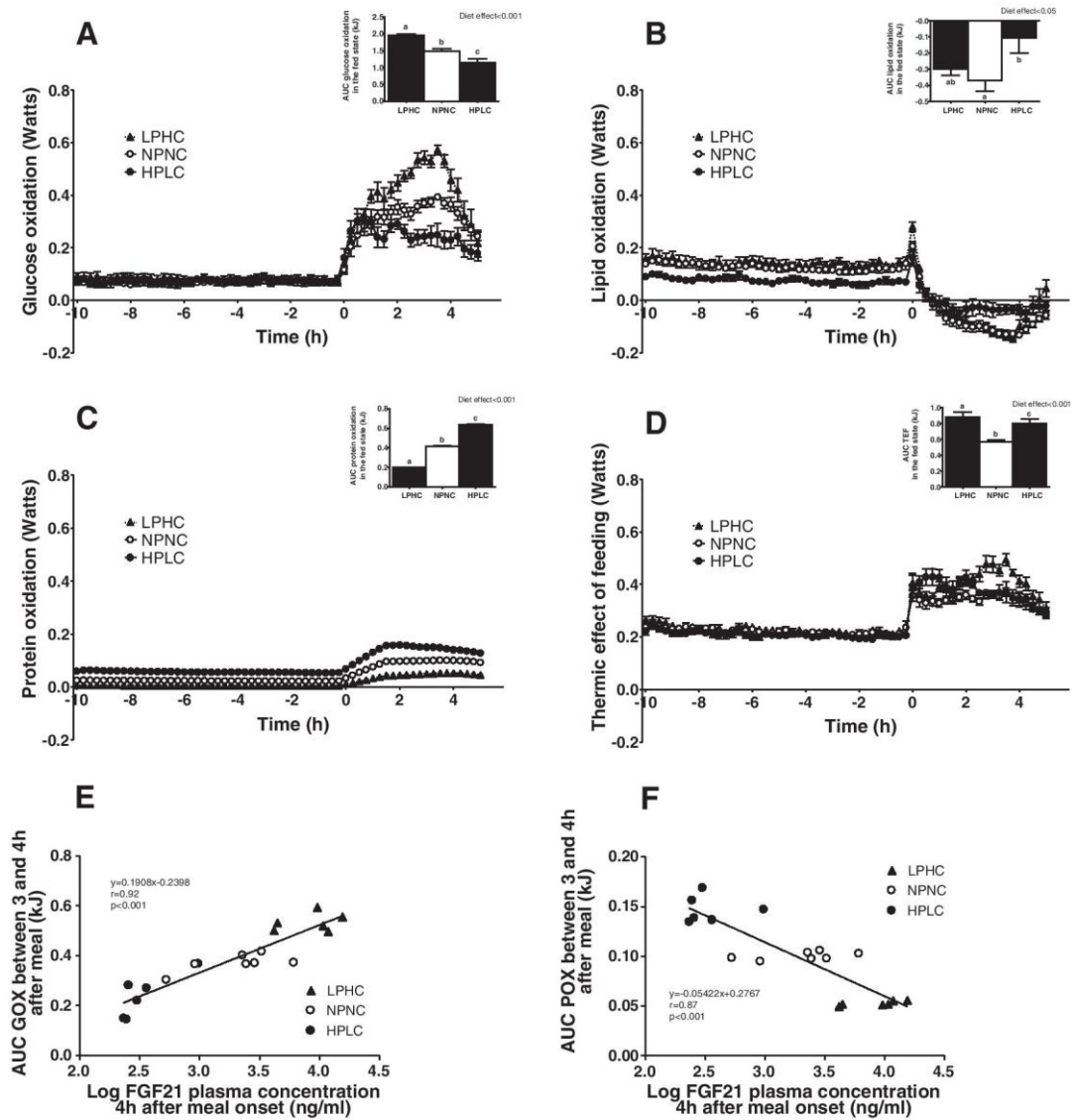


Fig. 3. Meal-induced changes in oxidation and thermic effect of feeding following the ingestion of a test meal. A: Glucose oxidation and calculated area under curve in the fed state. Fasted mice were fed at 9:00 ($T=0$) with 1 g (15.5 kJ) of their test diet. B: Lipid oxidation and calculated area under curve in the fed state. C: Protein oxidation and calculated area under curve in the fed state. D: Thermic effect of feeding and calculated area under curve in the fed state. E: Correlation between the logarithm of FGF21 plasmatic concentration in the fed state and glucose oxidation between 3 and 4 h after meal onset. Data represent mean + SEM ($n=6-7$). F: Correlation between protein oxidation between 3 and 4 h after meal onset and the logarithm of FGF21 plasmatic concentration in the fed state. Data represent mean + SEM ($n=6-7$). The effect of the diet was tested by one-way ANOVA using R. Pairwise comparisons were performed with post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Bars with different letters within a graph are statistically different.

PGC-1 α . Moreover, in the same study, no changes in the phosphorylation of FOXO1, CREB, or TORC2 were observed in livers of mice injected with FGF21. Thus, these data do not enable us to draw conclusions about the mechanism involved in the regulation of FGF21 by fasting or by glucagon. However, as presented in the introduction of the paper, the duration of fasting, which was short in our case, as well as the composition of the diets used in the study, could explain this discrepancy. The effect of fasting observed in the present study is in line with the decrease of *Fgf21* expression by glucagon in primary culture of hepatocytes.

The present study also suggests that FGF21 may be involved in the metabolic effect of a LPHC diet. The results showed a tight relationship between whole body glucose and protein oxidation and the concentration of FGF21 in the plasma. Indeed, FGF21 has been shown to help regulate blood glucose concentration by increasing glucose uptake [5] and by reducing hepatic glucose output [31]. In this

context, the increase in FGF21 secretion in response to the ingestion of an LPHC diet could serve to limit hepatic glucose output and stimulate glucose utilization by peripheral tissues. Accordingly, despite the higher carbohydrate content of the LPHC diet, there were no important differences in post-prandial blood glucose and insulin between the three diets. The present results also do not show any differences in RMR in fasted mice housed at thermoneutrality, but TEF was higher in HPLC fed mice as has been previously observed [32,33]. This higher TEF was fueled by an increased rate of glucose oxidation that could also contribute to burning part of the excess glucose intake, and thus maintaining body adiposity at the level of NPNC fed mice. On the other hand, the balance between food intake, energy expenditure and fat accumulation in the various groups clearly points out that in the typical housing conditions (22°C in the animal facility), energy expenditure was lowest in HPLC fed mice, intermediate in NPNC fed ones and highest in LPHC fed ones. In future studies, how the cost of

thermoregulation and the energy expended with activity can differ between LP, NP and HP fed mice should be investigated because the RMR, TEF and activity values (not shown) measured at thermoneutrality cannot explain the differences observed in fat accumulation under typical living conditions at 22°C. In contrast to the observations in the present study, it was recently [8] reported that FGF21 administration to Siberian hamsters, a model of obesity, reduces hepatic lipid content by decreasing glucose oxidation and increasing lipid oxidation flux through β -oxidation. Similarly, in obese animals in which FGF21 secretion and regulatory effects should be impaired, FGF21 treatment reduces body weight, adiposity, hepatosteatosis, hyperglycemia, and dyslipidemia, possibly through enhanced insulin sensitivity (3–9). These data suggest that in obese and metabolic dysfunction models, the control of FGF21 secretion and/or metabolic effect of FGF21 may be different from their effects under physiological conditions. Our results also indicate that the effect of an HPLC diet previously observed in rodents on ketogenesis (29–31), thermogenesis [34] and lower adiposity [35,36] is independent of FGF21 levels since FGF21 circulating levels were very low in both the fasted and re-fed states.

Interestingly, analysis of gene expression showed that an LPHC compared to an HPLC diet induced an increased expression of *Ucp2* in the epididymal white adipose tissue and a decreased expression of *Acacb* in BAT. The increased expression of *Ucp2* in white adipose tissue of mice fed the LPHC could limit the evolution of body weight and body adiposity despite a significantly higher caloric intake. This concurs with the observation that LPHC fed mice did not gain more weight and deposited only a slightly larger amount of fat than NPNC-fed mice. *Ucp2* expression is stimulated by ingestion of a high-fat diet in obesity-resistant but not in obesity-prone mice [37,38]. Increased expression of *Ucp2* in white adipose tissue was also reported to occur simultaneously with increased expression of *Ucp1* in the BAT and sometimes in white adipose tissue [38]. This was not observed in the present study but it was recently shown that not all white adipose tissues express *Ucp1* (this included the epididymal depot selected in the present study) [39]. The increase in *Acacb* expression in the BAT of mice, induced by high carbohydrate diets, could be associated with both an inhibition of fatty acid oxidation in this tissue and a reorientation towards triglyceride synthesis [40]; however, ACACB activity is tightly regulated post-transcriptionally by AMPK phosphorylation and this prevents concluding with certainty [41].

In conclusion, *ex-vivo* analysis of mRNA expression of FGF21 in cultured hepatocytes suggests that liver FGF21 synthesis and secretion is mainly controlled by hepatic glucose levels when insulin is also high. In vivo, ingestion of a high-carbohydrate low-protein diet through the high blood glucose delivery, but also the low amino acid concentration, stimulates FGF21 synthesis and secretion. On the one hand this acts to limit hepatic output of glucose and on the other to stimulate peripheral glucose oxidation in periphery, as suggested by the high level of glucose oxidation in LPHC fed rats. The increased UCP2 expression observed in adipose tissue may be one of the FGF21 mechanisms by which peripheral glucose utilization may be increased. The metabolic role of FGF21 in the increase of thermogenesis and/or glucose and protein oxidation after the LPHC diet remains to be clarified, using a more direct and mechanistic study such as blocking of FGF21 or beta-Klotho which is involved in FGF21 signaling [42].

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.07.002>.

Author contributions

T.C.D., P.C.E., D.A.M., C.C., J.P. conducted research. T.C.D., P.C.E., D.A.M. interpreted the data. T.C.D., P.C.E., D.A.M., D.T. wrote the manuscript. T.C.D., D.A.M., C.G. designed the study. T.C.D. and D.A.M.

had primary responsibility for final content. All authors have read and approved the manuscript submission.

Acknowledgements

The authors acknowledge Morgane Dufay and Nicolas Trépié who took care of the animals.

References

- [1] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* 2000;203–6.
- [2] Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, et al. Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 2014;63:4057–63.
- [3] Camporez JPG, Jornayvaz FR, Petersen MC, Pesta D, Guigni BA, Serr J, et al. Cellular mechanisms by which FGF21 improves insulin sensitivity in male mice. *Endocrinology* 2013;154:3099–109. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-1191>.
- [4] Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, et al. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008;149:6018–27. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2008-0816>.
- [5] Emanuelli B, Vienberg SG, Smyth G, Cheng C, Stanford KI, Arumugam M, et al. Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *J Clin Invest* 2014;124:515–27. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI67353>.
- [6] Hotta Y, Nakamura H, Konishi M, Murata Y, Takagi H, Matsumura S, et al. Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for Ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* 2009;150:4625–33. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0119>.
- [7] Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen Y-F, Clutinger CK, Tigno XT, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* 2007;148:774–81. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1168>.
- [8] Samms RJ, Murphy M, Fowler MJ, Cooper S, Emmerson P, Coskun T, et al. Dual effects of fibroblast growth factor 21 on hepatic energy metabolism. *J Endocrinol* 2015;227:37–47. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-15-0334>.
- [9] Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, et al. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009;58:250–9. <http://dx.doi.org/10.2337/db08-0392>.
- [10] Uebanso T, Taketani Y, Yamamoto H, Amo K, Ominami H, Arai H, et al. Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: is FGF21 a nutritional adaptation factor? *PLoS One* 2011;6:e22976. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022976>.
- [11] Gálman C, Lundäsén T, Kharitonov A, Bina HA, Eriksson M, Hafström I, et al. The circulating metabolic regulator FGF21 is induced by prolonged fasting and PPAR α activation in man. *Cell Metab* 2008;8:169–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.014>.
- [12] Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* 2007;5:415–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.003>.
- [13] Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, Maratos-Flier E. Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPAR α and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in Ketotic states. *Cell Metab* 2007;5:426–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.002>.
- [14] Laeger T, Henagan TM, Albarado DC, Redman LM, Bray GA, Noland RC, et al. FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J Clin Invest* 2014;124:3913–22. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI74915>.
- [15] Cyphert HA, Alonge KM, Ippagunta SM, Hillgartner FB. Glucagon stimulates hepatic FGF21 secretion through a PKA- and EPAC-dependent posttranscriptional mechanism. *PLoS One* 2014;9:e94996. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094996>.
- [16] Iizuka K, Takeda J, Horikawa Y. Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett* 2009;583:2882–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.07.053>.
- [17] Dushay JR, Toschi E, Mitten EK, Fisher FM, Herman MA, Maratos-Flier E. Fructose ingestion acutely stimulates circulating FGF21 levels in humans. *Mol Metab* 2015;4:51–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.008>.
- [18] Uebanso T, Taketani Y, Fukaya M, Sato K, Takei Y, Sato T, et al. Hypocaloric high-protein diet improves fatty liver and hypertriglyceridemia in sucrose-fed obese rats via two pathways. *AJP Endocrinol Metab* 2009;297:E76–84. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00014.2009>.
- [19] Muise ES, Azzolina B, Kuo DW, El-Sherbeini M, Tan Y, Yuan X, et al. Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* 2008;74:403–12. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.044826>.
- [20] De Sousa-Coelho AL, Relat J, Hondares E, Perez-Marti A, Ribas F, Villarroya F, et al. FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation. *J Lipid Res* 2013;54:1786–97. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M033415>.

- [21] Stone KP, Wanders D, Orgeron M, Cortez CC, Gettys TW. Mechanisms of increased in vivo insulin sensitivity by dietary methionine restriction in mice. *Diabetes* 2014;63:3721–33.
- [22] Ables GP, Ouattara A, Hampton TG, Cooke D, Perodin F, Augie I, et al. Dietary methionine restriction in mice elicits an adaptive cardiovascular response to Hyperhomocysteinemia. *Sci Rep* 2015;5:8886. <http://dx.doi.org/10.1038/srep08886>.
- [23] Even PC, Nadkarni NA. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2012;303:R459–76. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00137.2012>.
- [24] Fromentin C, Azzout-Marniche D, Tomé D, Even P, Luengo C, Piedcoq J, et al. The postprandial use of dietary amino acids as an energy substrate is delayed after the deamination process in rats adapted for 2 weeks to a high protein diet. *Amino Acids* 2010;40:1461–72. <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-010-0756-3>.
- [25] Stepien M, Gaudichon C, Azzout-Marniche D, Fromentin G, Tome D, Even P. Postprandial nutrient partitioning but not energy expenditure is modified in growing rats during adaptation to a high-protein diet. *J Nutr* 2010;140:939–45. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.109.120139>.
- [26] Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969;43:506–20.
- [27] Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathe V, Huneau J-F, et al. Liver glyconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats? *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2006;292:R1400–7. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00566.2006>.
- [28] Freudenberg A, Petzke KJ, Klaus S. Comparison of high-protein diets and leucine supplementation in the prevention of metabolic syndrome and related disorders in mice. *J Nutr Biochem* 2012;23:1524–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.10.005>.
- [29] Morris-Stiff G, Feldstein AE. Fibroblast growth factor 21 as a biomarker for NAFLD: integrating pathobiology into clinical practice. *J Hepatol* 2010;53:795–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2010.07.003>.
- [30] Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, et al. FGF21 induces PGC-1 α and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106:10853–8.
- [31] Kong L-J, Feng W, Wright M, Chen Y, Dallas-yang Q, Zhou Y-P, et al. FGF21 suppresses hepatic glucose production through the activation of atypical protein kinase C α . *Eur J Pharmacol* 2013;702:302–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.065>.
- [32] Rothwell NJ, Stock MJ, Tyzbir TS. Mechanisms of thermogenesis induced by low protein diets. *Metabolism* 1983;25:7–61.
- [33] Even PC, Bertin E, Gangnerau M-N, Roseau S, Tomé D, Portha B. Energy restriction with protein restriction increases basal metabolism and meal-induced thermogenesis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R751–9. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2002>.
- [34] Halton TL, Hu FB. The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: a critical review. *J Am Coll Nutr* 2004;23:373–85.
- [35] Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Bos C, Mathé V, Tomé D, et al. The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J Nutr* 2006;136:1849–54.
- [36] Clifton PM, Keogh JB, Noakes M. Long-term effects of a high-protein weight-loss diet. *Am J Clin Nutr* 2008;87:23–9.
- [37] Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997;269–72.
- [38] Surwit RS, Wang S, Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, Ricquier D, et al. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:4061–5.
- [39] Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6 J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* 2012;53:619–29. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M018846>.
- [40] Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:1444–9.
- [41] O'Neill HM, Lally JS, Galic S, Thomas M, Azizi PD, Fullerton MD, et al. AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 2014;57:1693–702. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3273-1>.
- [42] Suzuki M, Uehara Y, Motomura-Matsuzaka K, Oki J, Koyama Y, Kimura M, et al. β Klotho is required for fibroblast growth factor (FGF) 21 signaling through FGF receptor (FGFR) 1c and FGFR3c. *Mol Endocrinol* 2008;22:1006–14. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2007-0313>.

3.2 Article II : La modulation du rapport glucide/protéine modifie le profil d'oxydation en période postprandiale de souris n'exprimant pas l'AMPK dans le foie

(Modification of dietary carbohydrate to protein ratio reveals an alteration in postprandial oxidation pattern in liver AMPK-deficient mice)

3.2.1 Contexte :

L'AMPK (AMP-activated kinase) est une kinase qui sert de senseur de l'énergie intracellulaire. Lors d'une déplétion en énergie, l'AMPK est activée et va en retour stimuler les voies cataboliques productrices d'ATP et inhiber les voies anaboliques qui en consomment. La phosphorylation de l'AMPK est sensible à la disponibilité en nutriments dans la cellule. Des études menées à l'unité PNCA ont ainsi rapporté que le glucose et les acides aminés pouvaient décroître le niveau de phosphorylation de l'AMPK dans des cultures cellulaires. De même, il a été montré que nourrir pendant deux semaines des rats avec un régime hyperprotéique entraîne une baisse de la phosphorylation de l'AMPK dans le foie tandis qu'un régime faible en protéines augmente sa phosphorylation dans le muscle. Le foie est l'organe central de l'adaptation du métabolisme aux modulations du rapport protéines/glucides du régime, toutefois le rôle de l'AMPK hépatique dans ces phénomènes adaptatifs n'a jamais été étudié.

3.2.2 Objectif :

Notre étude cherche à définir le rôle de cette protéine dans l'adaptation du métabolisme énergétique en réponse à la variation du ratio protéine/glucide du régime.

3.2.3 Méthodes :

Des souris sauvages (WT) et des souris KO AMPK-foie spécifique (KO) mâles ont été séparées en 3 groupes nourris pendant 3 semaines avec des régimes contenant une teneur en protéines faible (LPHC) normale (NPNC) ou haute (HPLC). La prise alimentaire et le poids ont été suivis. Les variations suite à l'ingestion d'un repas-test de 1 g (17 kJ) des taux d'oxydation du glucose et des acides gras (calorimétrie indirecte), ainsi que de la glycémie et de l'insulinémie (prises de sang séquentielles) ont été mesurées. A la fin de l'expérimentation, après 16h à jeun, les souris ont été à nouveau nourries avec un repas calibré de 1 g. Deux ou quatre heures plus tard, ces dernières ont été euthanasiées, différents organes ainsi que le sang ont été prélevés pour des mesures d'expression de gènes, de concentration de protéines et de métabolites.

3.2.4 Résultats principaux :

Les souris KO nourries sous régime LPHC ou HPLC, dans lesquels un nutriment est prédominant, les glucides ou les protéines respectivement, présentent une moindre augmentation de l'oxydation du glucose et une moindre diminution de l'oxydation des acides gras par rapport aux souris sauvages à la

suite d'un repas calibré. Au contraire, les souris KO nourries sous régime NPNC présentent un profil d'oxydation des glucides et des lipides normal associé avec une augmentation des TG et une baisse du glycogène dans le foie de manière transitoire. Ces souris présentent également une plus forte expression de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras, la synthèse de glycogène et la cétogénèse mais aussi une plus forte sécrétion de FGF21 que les souris sauvages, deux heures après le repas.

3.2.5 Conclusion :

Les conséquences de la délétion de l'AMPK sur le métabolisme énergétique dépendent de la composition du régime. En effet, sous régime NP, l'adaptation du métabolisme hépatique et l'augmentation de la sécrétion de FGF21 en période postprandiale pourrait compenser l'absence d'AMPK hépatique. Au contraire, sous régime LP et HP, l'absence d'adaptation du métabolisme hépatique en réponse à la délétion se traduit par un retard dans l'évolution des taux d'oxydation du glucose et des acides gras suite à un repas, autrement dit, par une moindre flexibilité métabolique.

3.2.6 Manuscrit :

Le manuscrit a été soumis le 23/09/2016 dans Cell Reports

Modification of dietary carbohydrate to protein ratio reveals an alteration in postprandial oxidation pattern in liver AMPK-deficient mice

Tristan Chalvon-Demersay¹, Patrick C. Even¹, Catherine Chaumontet¹, Julien Piedcoq¹, Benoit
Viollet^{2,3,4}, Claire Gaudichon¹, Daniel Tomé¹, Marc Foretz^{2,3,4} and Dalila Azzout-Marniche¹

¹UMR Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire, AgroParisTech, INRA,
Université Paris-Saclay, Paris, France

²Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

³Cnrs, UMR8104, Paris, France

⁴Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

Summary: The role of liver AMPK in the control of metabolic adaptation in response to nutritional variations has been little investigated. Wild-type (WT) and liver AMPK-deficient (KO) mice were fed either a normo-protein normo-carbohydrate diet (NP-NC), a low-protein high-carbohydrate diet (LP-HC) or a high-protein low-carbohydrate diet (HP-LC) for 3 weeks. During this period, measurements of metabolic parameters and indirect calorimetry were performed. In NP-NC re-fed mice, deletion of *AMPK* in the liver led to an adaptation of liver metabolism resulting in an increased secretion of Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21). These changes possibly compensated for the absence of liver AMPK as these mice exhibited normal post-prandial changes in carbohydrate and lipid oxidation. In contrast, in LP-HC and HP-LC re-fed mice, the lack of adjustment in liver metabolism in KO mice resulted in an alteration of meal-induced changes in carbohydrate and fatty acid oxidation.

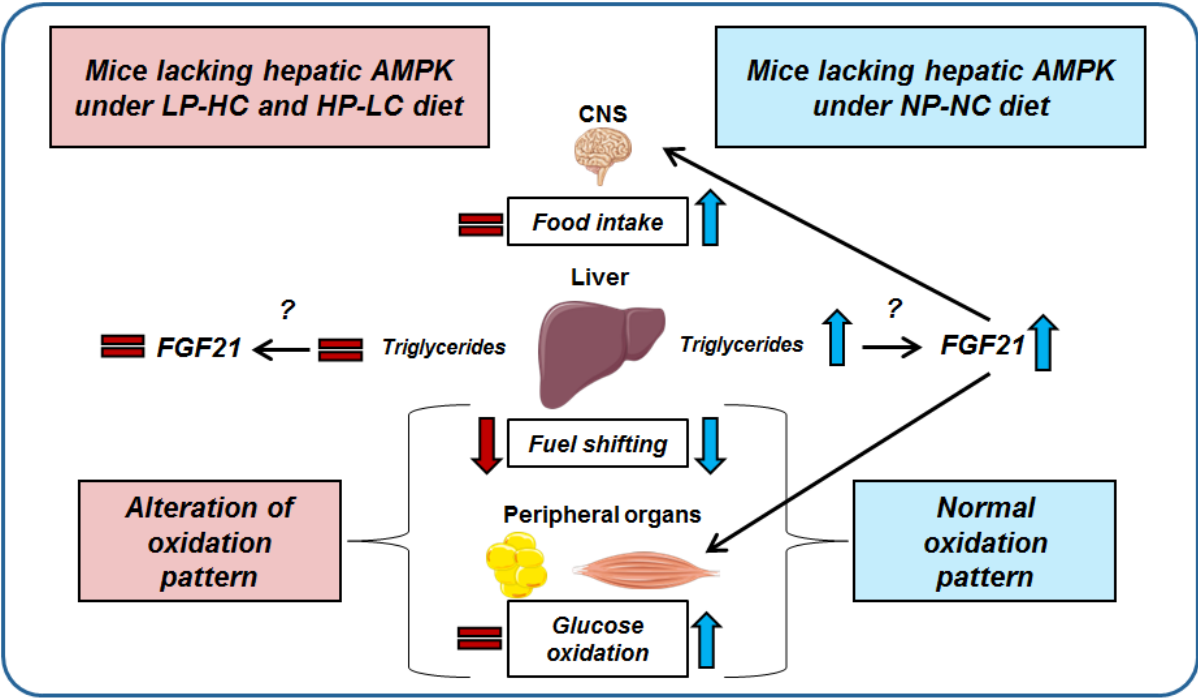
Keywords: AMPK, calorimetry, amino acids, liver, FGF21,

In brief: Chalvon-Demersay et al. found that mice fed a balanced diet, liver AMPK deletion exhibited a normal oxidation pattern, probably through an increased secretion of FGF21, whereas under low-protein high-carbohydrate diet or a high-protein low-carbohydrate diet, the lack of adjustment in liver metabolism resulted in an alteration in postprandial oxidation pattern.

Highlights:

- Mice lacking liver AMPK under NP-NC diet exhibit a normal oxidation pattern
- FGF21 compensates the lack of liver AMPK under a NP-NC balanced diet
- Liver AMPK deletion alters postprandial oxidation pattern under LP-HC and HP-LC diet

Graphical abstract:



Introduction

AMPK (AMP-activated kinase) is a kinase composed of three different subunits (α , β , γ), very well preserved throughout evolution (Carling 2004; Hardie 2004), that serves as an energy sensor in the cell. When a physiological stress occurs within the cell, the ATP/AMP ratio decreases. AMPK is then activated by allosteric binding of AMP to the subunit β which stimulates phosphorylation of the Thr172 residue of the catalytic subunit α by upstream kinases (LKB1 and CaMKKb), and inhibits its dephosphorylation by phosphatases (Viollet et al., 2014). In such conditions, AMPK causes cells to switch from an anabolic to a catabolic state in order to restore energy balance through the control of different pathways. These include activation of acetyl-coA carboxylase (Brownsey et al., 2006) and repression of *PEPCK* and *G6Pase* expression, leading to increased β -oxydation and inhibition of hepatic glucose production, respectively (Hardie, 2004).

AMPK phosphorylation is sensitive to energy substrate availability, including glucose and amino acids within cells. AMPK was shown to be decreased *in vitro* by glucose in myocyte (Itani et al., 2003) and hepatoma cells HepG2 (Zang et al., 2004) and by amino acids in β -cells (Leclerc and Rutter, 2004), primary cultures of hepatocytes (Chotechuan et al., 2009) and cultured myoblasts (Du et al. 2006). AMPK-activated kinase takes part in amino acid signaling in the liver either directly or indirectly (Chotechuan et al., 2009; Hu et al., 2015). In rats, high-protein intake (HP-LC) compared to a normal protein intake (NP-NC) leads to lower AMPK and higher mTOR phosphorylation in the liver (Chotechuan et al., 2009) and in the hypothalamus (Cota, 2006; Ropelle et al., 2008). In contrast, AMPK phosphorylation level is induced 3 times in soleus muscles of rats fed a low-protein diet (LP-HC) compared to control rats (Batistela et al., 2014).

These results show that AMPK is sensitive to the carbohydrate to protein ratio of the diet. In parallel, several studies have reported that the modulation of energy metabolism by protein diets is mainly due to hepatic adaptation (Blouet et al., 2006; Chotechuan et al., 2009; Freudenberg et al., 2012). The aim of the present study is therefore to define more precisely the implication of liver AMPK on the sensing of dietary amino acids and carbohydrate intake and the control of energy metabolism when mice are fed diets with different protein contents. For this purpose, we used wild-type mice and mice in which the two main isoforms of the catalytic subunit of AMPK were deleted in the liver. These mice were

fed during three weeks with either a low-protein high-carbohydrate (LP-HC), a normo-protein normo-carbohydrate (NP-NC), or a high-protein low-carbohydrate diets (HP-LC).

Results

In this study, AMPK-deficient (KO) mice and wild type (WT) mice were first adapted to a normo-protein normo-carbohydrate diet (NP-NC) during an initial 3-week running period. They were then either maintained on this control NP-NC diet, or switched to a low-protein high-carbohydrate diet (LP-HC) or high-protein low-carbohydrate diet (HP-LC) diet for three additional weeks. Mice were then analysed for phenotype and for liver metabolism after a calibrated meal consisting by their own diet two or four hours after meal onset. As expected, there was very little abundance of isoform $\alpha 1$ and $\alpha 2$ in KO mice, confirming the deletion of AMPK in the liver (supplemental Figure 1). As a consequence, the phosphorylation of both AMPK and ACC was also reduced in KO mice compared to WT mice (supplemental Figure 2). Residual phosphorylation is due to Kupffer, blood cells and vessels which are abundant in the liver.

Food intake, body weight, body composition

Body weight (BW), lean body mass, liver and kidney weights were lower in KO mice, whereas no effect was observed for fat mass (Table 2). Compared to the NP-NC control diet, mice fed the LP-HC diet had a lower BW and lean mass, whereas HP-LC fed mice exhibited a lower fat mass. Both in WT and KO mice, food intake was inversely related to the protein content of the diet (Table 2). In addition, when fed the control NP-NC diet, KO mice ate 9% more than WT mice, whereas no difference was observed between WT and KO mice under the LP-HC or HP-LC diets. However, no effect of the deletion of liver *AMPK* was observed on the expression of genes involved in the control of food intake in the Nucleus Accumbens (NACC), hypothalamus or intestine (supplemental Tables 1, 2, 3).

Whole body nutrient oxidation

Meal-induced carbohydrate and lipid oxidation was investigated by indirect calorimetry during the first hours after re-feeding with a 1 g-calibrated meal following an overnight fast. No difference in carbohydrate and lipid oxidations was observed between WT and KO control NP-NC-fed mice after the test-meal (Figure 2A). In contrast, in LP-HC-fed or HP-LC-fed mice, the test-meal induced smaller increases in carbohydrate oxidation and smaller decreases in lipid oxidation in *KO mice* compared to

WT mice (Figures 2B, 2C). These differences were transient and limited to the first 1.5 hours and to the first 4 hours after the test meal in HP-LC-fed and LP-HC-fed mice, respectively. Total protein oxidation in the fasting and fed states was estimated from urinary urea excretion. Urea excretion and total protein oxidation were increased by the meal in proportion to the protein content of the diet, but no difference was observed between *WT* and *KO* mice (supplemental Table 4). No effect of the deletion was observed no matter the protein level of the diet on plasma uric acid and urea (supplemental Table 5).

Liver lipid metabolism

Lipid metabolism was assessed by mRNA that encode key genes involved in lipogenesis, β -oxydation, ketogenesis, phosphorylation state of ACC and hepatic TG and β -hydroxybutyrate concentration two and four hours after re-feeding with a 1 g-calibrated meal following an overnight fast. Results showed that mRNA encoding *MTTP* and *FAS* was lower in *KO* mice compared to *WT* mice, particularly in mice under the NP-NC diet, 2 hours and 4 hours after meal ingestion of the test-meal, respectively (Table 3). In line with these results, *KO* mice fed the control NP-NC diet but not the LP-HC and HP-LC diets, exhibited higher hepatic TG and lower plasmatic TG concentrations than *WT* mice two, but not four hours, after meal onset ($P < 0.05$) (Figure 3A) as illustrated in Figure 3B. This effect was not due to a change in the TG export capacity of the liver, as an additional experiment performed in *KO* and *WT* mice ($n=5$) fed the NP-NC diet for 6 weeks did not reveal any difference in the TG export capacity of *KO* and *WT*, measured as previously described (Schwarz et al., 2012) (Data not shown). *In addition*, compared to *WT* mice fed the control NP-NC diet, *KO* mice exhibited higher liver expression of *ACOX* and *CPT1a* and lower expression of *KETO* (acetyl-CoA C-acetyltransferase) (Figure 3C) 2 h after the test meal, suggesting that acid oxidation and ketogenesis could be stimulated in these NP-NC-fed *KO* mice compared to *WT* mice. However, regardless of the protein level in the diet, no effect of the deletion was observed on β -hydroxybutyrate or plasma non-esterified fatty acid, albumin, glycerol, total cholesterol and HDL (supplemental Table 5). *We also performed an additional experiment (n=5) to investigate whether* liver TG accumulation during fasting was involved in the

higher liver TG content observed in KO mice fed the control NP-NC diet, but no difference was observed between fasted KO and WT mice.

Liver glucose metabolism

Carbohydrate metabolism modifications were assessed by measuring mRNA and the phosphorylation state of glycogen synthase (GS) as well as gene expression encoding key enzymes of glycolysis and gluconeogenesis, two and four hours after re-feeding with a 1 g-calibrated meal following an overnight fast. Glucose, but not the insulin response, was lower after the HP-LC meal than after the NP-NC and LP-HC meals (supplemental Figure 3). No difference in basal glucose and insulin or responses to a test meal between WT and KO mice was observed. Hepatic glycogen content was strongly affected by the protein concentration of the diet two or four hours after meal onset, with a very low content in HP-LC fed mice, which represented 25% of the hepatic glycogen content of LP-HC-fed mice (Figure 4B). KO mice fed the NP-NC diet exhibited lower glycogen content than WT mice two, but not four hours, after meal onset (Figure 4B) as illustrated in Figure 4C. GS expression was not affected by the protein content of the diet but tended to be lower ($P=0.06$) with the increase of protein content in the diet (Figure 4A). Interestingly, GS phosphorylation was lower (Figure 4A) and expression higher in KO mice 2 hours after the NP-NC test-meal (Table 3). *The deletion of liver AMPK also led to a lower expression of L-PK both 2 and 4 hours after meal onset, suggesting a lower glycolysis and synthesis of acetyl-CoA (Table 3). The differences were particularly marked under an NP-NC diet. For the gluconeogenesis pathway, PEPCK mRNA abundance increased with the protein content of the diet at both 2 and 4 hours after meal intake, and was transiently amplified at 2 hours in KO mice fed the NP-NC diet. In contrast, no effect was observed for G6PC1 (Table 3).*

In contrast to liver tissue, no effect of the deletion of *AMPK* was observed on gene expression in muscle or adipose tissue two or four hours after meal onset (supplemental Tables 6, 7).

Liver FGF21 secretion

Ingestion of the LP-HC test meal led to a strong increase in plasma FGF21 in both WT and KO mice. In contrast, ingestion of the HP-LC test meal did not increase plasma FGF21. In response to ingestion

of the NP-NC meal, plasma FGF21 was increased only in KO mice and to a level similar as that observed in response to ingestion of the LP-HC test-meal (Figure 5A). *FGF21* mRNA measured in the liver 2 hours after meal intake (Figure 5B) exhibited the same variations as plasma FGF21. In contrast, FGF21 protein content in the liver was similar in all groups (Figure 5C), suggesting that FGF21 synthesized in the liver was rapidly secreted in plasma. Interestingly, as portrayed in Figure 5D, plasma FGF21 and hepatic TG content were strongly correlated, suggesting a link between these two parameters.

Discussion

This study aimed to define the consequences of liver *AMPK* deletion on the adaptation of metabolic pathways to large changes in the carbohydrate to protein ratio of the diet in mice. Interestingly, the present results indicate that *AMPK* deletion did not affect amino acid deamination and oxidation and urea production in response to the level of protein intake, thus suggesting that *AMPK* is not predominantly involved in the adaptation of these pathways in response to the modulation of dietary protein intake. In contrast, some differences were observed between KO and WT mice in the adaptation of glucose metabolism and lipid metabolism in response to the variation of dietary carbohydrate to protein ratio.

Liver metabolism and feeding behavior were modified in response to *AMPK* deletion only when the mice were fed an NP-NC diet. Indeed, NP-NC-fed KO mice ate more, whereas no difference was observed for mice fed LP-HC and HP-LC diets. Moreover, these mice exhibited an increase in liver TG content and FGF21 secretion and a decrease in hepatic glycogen repletion 2 hours after ingestion of a meal following an overnight fast. Importantly, this phenomenon was transient and no longer observed 4 hours after meal ingestion. Surprisingly, concerning whole body metabolism, the rates of carbohydrate, lipid and protein oxidation after ingestion of an NP-NC test meal were the same as those observed in WT mice. In contrast, with LP-HC and HP-LC diets, no difference was observed in liver metabolism between the two types of mice, although KO mice exhibited an alteration of metabolic flexibility characterized by lower amplitudes of the meal-induced changes in carbohydrate and lipid oxidation (Kelley and Mandarino, 2000).

In the present study, we observed a transient increase in liver TG content in KO mice 2 hours after ingestion of the NP-NC test meal together with the absence of difference in the TG export capacity between KO and WT mice under the NP-NC diet. Lin et al. have reported that during fasting, mice accumulate triglycerides in the liver due to lipolysis in adipose tissue and delivery of free fatty acids (Lin, 2005). However, we observed no difference in triglyceride content in fasted KO and WT mice fed an NP-NC diet (data not shown), suggesting that the transient liver TG content in KO mice 2 hours after ingestion is not due to previous accumulation of TG in the liver during fasting.

The present study also highlights a regulatory role of FGF21 in situation of liver AMPK deletion. FGF21 is involved in numerous metabolic processes such as hepatic lipid oxidation, ketogenesis (Hotta et al., 2009; Kharitononkov et al., 2005) and glucose uptake in different organs, such as brown adipose tissue and skeletal muscle (Markan et al., 2014; Mashili et al., 2011). As we previously reported, the stimulation of FGF21 synthesis and secretion in response to an LP-HC diet is partly due to the direct stimulation of glucose whereas it is totally blunted under an HP-LC diet (Chalvon-Demersay et al., 2016). FGF21 is also involved in feeding behavior. Indeed, it has been reported that intra-cerebroventricular infusion of FGF21 increases both energy expenditure and food intake without affecting body composition (Sarruf et al., 2010), and that the increase in food intake induced by low-protein diets is not observed in FGF21-KO mice (Laeger et al. 2014). Our results suggest that in KO mice fed the NP-NC diet, increased FGF21 secretion could compensate for the lack of AMPK in the liver and therefore explain the slight increase in food intake without a marked effect on body composition that we observed in these mice. The increased FGF21 secretion could also stimulate glucose uptake and subsequent oxidation in the peripheral organs and explain why these KO mice had normal oxidation profiles.

In contrast, under LP-HC, the overload of glucose combined with protein restriction resulted in FGF21 secretion at a maximal level (Laeger et al., 2014b). Therefore, it was not possible for KO mice to further stimulate FGF21 synthesis and to compensate for the absence of liver AMPK. Under HP-LC, the overload of amino acids prevents the increase in FGF21 secretion and causes FGF21 secretion to be at a minimum. In this case, similar to what happens under an LP-HC diet, deletion of liver AMPK is not compensated by increased FGF21 secretion and KO-mice lower amplitudes of the meal-induced changes in carbohydrate and lipid oxidation.

In this study, all mice and all diets considered together, a significant correlation between FGF21 concentrations in the plasma and liver TG contents was observed 2 and 4 hours after ingestion of the test meals. Such an observation is in line with previous studies, suggesting that FGF21 could also be secreted in response to an increase in hepatic TG content to prevent further TG accumulation in patients with NAFLD (Morris-Stiff and Feldstein, 2010). This could explain why KO mice fed an NP-NC diet, with a high TG content, exhibit high FGF21 secretion in the postprandial period. Thus, in

these mice, FGF21 secretion could help normalize TG and glycogen content by modulating liver metabolism. This could be done through an increase in gene expression involved in fatty acid oxidation (*CPT1a*, *ACOX*) and ketogenesis (*KETO*), and through a reorientation of glucose towards glycogen synthesis rather than acetyl-coA synthesis in KO mice fed the NP-NC diet two hours after meal onset, as suggested by the decrease of L-PK expression and the decrease of GS phosphorylation and the increase of its expression. Accordingly, we observed a two-fold increase of hepatic glycogen content between two and four hours after meal onset, whereas triglyceride content remained constant in KO mice fed the NP-NC diet. In line with these results, parallel increases in *FGF21*, *CPT1a* and *ACOX* expression in mouse livers in response to fasting have previously been reported (Palou et al., 2008)

In conclusion, deletion of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of AMPK in the liver did not reveal dramatic effects on food intake and energy metabolism in mice, but suggests differential adaptive responses depending on the dietary carbohydrate to protein ratio. Livers of KO mice cannot easily adapt under LP-HC or HP-LC diets, where a macronutrient is predominant (carbohydrates and proteins, respectively), and where *AMPK* deletion is not compensated by FGF21 secretion. In contrast, under the NP-NC diet, when the diet is better balanced, KO mice adapt their liver metabolism through an increase in FGF21 secretion and therefore compensate for the absence of liver AMPK.

Experimental Procedures

Animals

The study was approved by the French National Animal Care Committee (number 14-15) and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals. Generation of AMPK knock-out liver specific C57BL/6 mice was performed by crossing albumin-Cre mice with mice containing floxed *AMPK* $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits. The deletion was confirmed by PCR genotyping and Western blot analysis as previously described (Foretz et al., 2010b). Ninety-eight males, of which 52 were wild-type mice *AMPK* $\alpha 1\alpha 2$ LS^{+/+} (WT) and 46 AMPK-KO liver specific mice *AMPK* $\alpha 1\alpha 2$ LS^{-/-} (KO), were generated in the light- and temperature-controlled animal facility of AgroParisTech (12:12 h reversed light/dark cycle, lights on at 21:00, 24°C). Spawners were fed the P20 diet throughout the experiment. The young mice were weaned at the age of 25 days, and for three weeks were fed a normo-protein normo-carbohydrate diet (NP-NC) as a run-in prior to the experiment. Mice were then either kept on the same diet (N=35, 19 WT mice/16 KO mice) or switched to a low-protein high-carbohydrate diet (LP-HC, N=33, 17 WT mice/16 KO mice) or a high-protein low-carbohydrate diet (HP-LC, N=30, 16 WT mice/14 KO mice) for another three-week period constituting the experimental-period. Diet compositions are detailed in Table 1.

Experimental Design

After the three-week run-in period, each group of mice received its test diet for three weeks. Throughout the test, body weight and food intake were measured every day except on weekends. During the second week of the test period, half of the mice were housed in turn in a calorimetry cage and respiratory exchanges were recorded to measure the response to the ingestion of a 1 gram, calibrated test-meal of their usual diet after an overnight fast. The other half of the mice were submitted to a meal tolerance test (MTT) to measure the glucose and insulin response to ingestion of the same 1 g test-meal after an overnight fast (see below for details). At the end of the test period, the mice were fasted overnight and 50 μ L of blood were collected from the tail vein between 9:00 and 09:30. Mice were then fed 1 g of their test diet at 10:00 and returned to their home cage. Two or four hours after the meal, they were deeply anesthetized with an overdose of pentobarbital (50 mg/kg), then killed following exsanguination by blood sampling from the vena cava (200 μ l). Blood samples were

collected on EDTA, centrifuged (4°C, 3000 rpm, 10 min), and plasma stored at -80°C until assayed for insulin. Body composition was detailed by dissection and weighing of the main organs and tissues. Samples of liver, skin, gastrocnemian muscle, epididymal adipose tissue, hypothalamus, nucleus accumbens and epithelial cells from the duodenum, jejunum and ileon were placed in TRIzol (Invitrogen) and frozen at -80°C for further measurement of mRNA abundance. Additional liver samples were frozen in lysis buffers for further western-blot analysis and for measurement of TG and glycogen.

Glucose and lipid oxidation in response to ingestion of the test-meal

Mice were housed in a calorimetry cage at 17:00 and were fasted overnight. At 09:00 the next day, 1 g of their respective test-diets was introduced to the cage, and food ingestion within 30 minutes was monitored. Cage temperature was maintained at 30°C and motor activity monitored with piezoelectric cells situated under the cage. Measurements of respiratory exchanges were performed continuously from 17:00 to 16:00 the next day. Carbohydrate (Cox) and lipid oxidation (Lox) were computed from resting oxygen and carbon dioxide consumption (VO₂ and VCO₂) and protein oxidation (Pox) according to the Weir formula (Even and Nadkarni, 2012):

$$\text{Cox (Watts)} = ((4.57 \cdot \text{VCO}_2) - (3.23 \cdot \text{VO}_2)) \cdot (15.6/60) - (2.87 \cdot \text{Pox}),$$

$$\text{Lox (Watts)} = ((1.69 \cdot \text{VO}_2) - (1.69 \cdot \text{VCO}_2)) \cdot (39.5/60) - (1.92 \cdot \text{Pox}),$$

with VO₂, VCO₂ in mL/min and N in mg/min. Pox was estimated assuming that it usually contributes to resting metabolic rate in proportion to the protein content in each diet, i.e. 5%, 14 %, and 55%, respectively, for LP-HC, NP-NC and HP-LC diets. However, it was taken into account that in response to ingestion of an HP-LC meal, only half of the deaminated amino acids are oxidized four hours after meal onset (Fromentin et al., 2010; Stepien et al., 2011) and therefore, protein oxidation was limited to 25% of resting metabolic rate after ingestion of the HP-LC test-meal. To validate these calculations and to compare protein oxidation between WT and KO mice, the floor of the calorimetry cage was covered with blotting paper to collect excreted urea. The blotting paper was changed when the meal was given to separate collection during the pre- and post-meal periods. Urea was retrieved by soaking the blotting paper in sterile water overnight. Urea was measured using a kit (Urea kit, Biomérieux) and real protein oxidation calculated assuming (Even and Nadkarni, 2012):

$$\text{Pox}_r \text{ (Watts)} = 6.25 * \text{Excreted urea (mg/min)} * 2 * (4.32 * 4.18/60).$$

Glucose and insulin responses to an MTT

Mice were fasted overnight in their home cage and received a 1 g test-meal of their usual diet at 09:00 in the morning. Blood (30 μ L) was collected from the tail 15 minutes before (indicated in the results as 0 minute), then 30, 120, 240 and 360 minutes after meal onset. Glucose was measured immediately from a drop of blood using automatic analyzer (Life-scan, One touch Vita). Blood samples were collected on EDTA, centrifuged (4°C, 3000 rpm, 10 min), and plasma was stored at -80°C until assayed for insulin.

Analytical procedure

The metabolite profile (Non-esterified fatty acid, urea, uric acid, albumin, cholesterol, glycerol, HDL cholesterol, β -hydroxybutyrate, triglycerides (TG) were measured using an automated chemistry analyzer, Olympus AU400. Hepatic TG concentrations were assayed on homogenized samples of liver using a TG assay kit (Randox Triglycerides). Glycogen was extracted from liver samples using KOH 30%, digested into glucose using amyloglucosidase (Sigma) and assayed using a glucose assay kit (Randox Gluc). Histological sections of liver were colored using periodic acid and Schiff's (PAS) reagent and oil-red-O to reveal, respectively, hepatic glycogen and triglyceride content as previously described (Foretz et al., 2005). Plasma insulin and FGF21 were assayed using an enzyme-linked immunoassay (Merckodia Mouse Insulin/.FGF21 ELISA kit, Symansis).

Western-Blot analysis

Frozen liver samples (100 mg) were homogenized in a lysis buffer containing 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM sodium fluoride, 25 mM sodium- β -glycerophosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5mM phenylmethanesulfonylfluoride, 10% glycerol (vol/vol), and 1% Triton X-100 (vol/vol) supplemented with a protease inhibitor cocktail (1 tablet/50ml, Complete, EDTA-Free, Roche). After homogenization, samples were then sonicated (2 W, 10 seconds, 0.5 second pulse) and centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4°C. Protein concentration was determined in the supernatant using the DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). An equivalent of 50 μ g of liver protein was resolved with Criterion XT gel Criterion TGX Gels, 4-15% (Bio-Rad Laboratories) and transferred to

a nitrocellulose membrane (0.2 μ m, Bio-Rad Laboratories). The quality of transfer was checked by Coomassie gel and Ponceau S membrane staining. After blocking, membranes were incubated with the primary antibodies (dilution 1/1,000), which were the anti-AMPK α 1 subunit, the anti-AMPK α 2 subunit, anti-phospho-AMPK (Thr172) α subunit, anti-AMPK α subunit, anti-phospho-ACC (Ser79), anti-ACC, anti-phospho-GS (Ser641), anti-GS (Cell Signaling) and anti-FGF21 (ab1719471, Abcam). The blots were thereafter incubated with a secondary antibody and anti-actine antibody conjugated to horseradish peroxidase (1/2,000; Santa Cruz Biotechnology) and were developed using Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories). To achieve further hybridization, the membrane was stripped in stripping buffer (pH 6.8) containing 62.5 mM Tris HCl, 2% (wt/vol) SDS, and 100 mM β -mercaptoethanol at 60°C for 15 min and incubated again with a primary antibody.

RNA preparation and gene expression measurement

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA concentration was assessed using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm and RNA integrity was confirmed by electrophoresis on agarose gel. To synthesize cDNA using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), retrotranscription was performed on 0.4 μ g of RNA for liver, skin, gastrocnemian muscle, epididymal adipose tissue, hypothalamus, nucleus accumbens, and 4 μ g of RNA for epithelial cells from respectively duodenum, jejunum and ileon tissues. Real Time PCR was performed to measure gene expression on Step One (Applied Biosystems) using Power SYBR GREEN PCR MIX (Applied Biosystems) on 5 ng (2.5 μ l) of cDNA for liver, muscle or adipose tissue and 50 ng (2.5 μ l) of cDNA for intestine. The primer sequences of genes were designed with Primer Express and are available under request. Gene expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{Gene} - CT_{18S}$. Data are expressed as a percentage of the values of the WT mice fed the NP-NC diet. Negative controls were used to detect potential contamination (control without RT or RNA).

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. The effect of the diets and genotype was tested by two-way ANOVA with interaction using R[©]. Pairwise comparisons were performed with Post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons. P-values were multiplied by the number of comparisons performed. Differences were considered significant at P < 0.05.

Author contributions:

T.C.D., P.C.E., D.A.M., C.C., J.P. conducted research. T.C.D., P.C.E., D.A.M., B.V, M.F interpreted the data. T.C.D., P.C.E., D.A.M., D.T. wrote the manuscript. T.C.D., D.A.M., C.G. designed the study. T.C.D. D.A.M., B.V., M. F.: had primary responsibility for final content. Mouse model was provided by B.V. and M.F. All authors have read and approved the manuscript submission.

Table 1: Macronutrient composition of the HCD. Diets were prepared by the “atelier de préparation des aliments”, UPAE, INRA, Jouy en Josas, France. Energy density is computed assuming a metabolizable energy of 16.7 kJ/g for carbohydrates and proteins and 37.7 kJ/g for fat.

| | P20 | NP-NC | LP-HC | HP-LC |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Weight content (g/kg) | | | | |
| Milk proteins | 200 | 140 | 50 | 530 |
| Starch | 570 | 622 | 700 | 287 |
| Sucrose | 93 | 100 | 113 | 46 |
| Soy Oil | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Minerals | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Vitamins | 10 | 10 | 10 | 10 |
| cellulose | 50 | 50 | 50 | 50 |
| choline | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Energy content (%) | | | | |
| Protein | 20.5 | 14.5 | 5.2 | 54.6 |
| Carbohydrate | 68.5 | 75.0 | 84.0 | 34.9 |
| Fat | 10.5 | 10.5 | 10.5 | 10.5 |
| Energy density (kJ/g) | 14.57 | 14.56 | 14.54 | 14.60 |

Table 2: Body composition and food intake of WT and KO mice fed NP-NC, LP-HC or HP-LC diets. *, P < 0.05 significant difference between WT and KO within the same diet.

| Diet | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Inter |
|----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|-----------|-------|
| | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| Cumulative food intake (g) | 71.8 ± 1.3 | 79.1 ± 1.9* | 93.4 ± 1.2 | 94.4 ± 2.1 | 54.1 ± 1.4 | 53.6 ± 1.6 | <0.05 | <0.001 | NS |
| Initial Weight (g) | 22.9 ± 0.2 | 22.5 ± 0.4 | 22.9 ± 0.2 | 22.1 ± 0.4 | 23.3 ± 0.4 | 22.2 ± 0.3 | <0.01 | NS | NS |
| Final Weight (g) | 24.5 ± 0.3 | 24.0 ± 0.4 | 23.2 ± 0.2 | 21.9 ± 0.4 | 23.6 ± 0.6 | 23.3 ± 0.4 | <0.05 | <0.001 | NS |
| Total fat mass (g) | 2.41 ± 0.14 | 2.13 ± 0.14 | 2.32 ± 0.06 | 2.16 ± 0.15 | 1.61 ± 0.1 | 1.67 ± 0.1 | NS | <0.001 | NS |
| Fat mass (%) | 9.75 ± 0.44 | 8.83 ± 0.49 | 10.01 ± 0.21 | 9.82 ± 0.58 | 6.81 ± 0.37 | 7.18 ± 0.42 | NS | <0.001 | NS |
| Lean body mass (g) | 22.09 ± 0.23 | 21.84 ± 0.33 | 20.89 ± 0.21 | 19.77 ± 0.33 | 22.04 ± 0.55 | 21.58 ± 0.41 | <0.05 | <0.001 | NS |
| Liver (g) | 0.98 ± 0.02 | 0.92 ± 0.04 | 0.91 ± 0.03 | 0.87 ± 0.04 | 1.07 ± 0.04 | 0.87 ± 0.1* | <0.01 | NS | NS |
| Kidneys (g) | 0.26 ± 0.01 | 0.26 ± 0.01 | 0.23 ± 0.01 | 0.22 ± 0.01 | 0.29 ± 0.01 | 0.25 ± 0.01* | <0.05 | <0.001 | <0.05 |

Table 3: mRNA abundance in liver of WT and KO mice fed NP-NC, LP-HC or HP-LC diets two and four hours after meal onset. *, P < 0.05 significant difference between WT and KO within the same diet.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Diet | Inter |
|-------|----|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------|--------|-------|
| | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| ACC | 2h | 1 ± 0.12 | 0.93 ± 0.09 | 1.25 ± 0.19 | 1.13 ± 0.25 | 0.88 ± 0.07 | 0.63 ± 0.05 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.06 | 0.77 ± 0.04 | 0.97 ± 0.12 | 1.10 ± 0.13 | 1.12 ± 0.21 | 0.82 ± 0.11 | NS | NS | NS |
| FAS | 2h | 1.00 ± 0.11 | 0.79 ± 0.10 | 0.87 ± 0.11 | 0.97 ± 0.09 | 0.77 ± 0.06 | 0.71 ± 0.06 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1.00 ± 0.12 | 0.67 ± 0.10 | 0.94 ± 0.14 | 0.74 ± 0.15 | 0.97 ± 0.19 | 0.69 ± 0.08 | <0.05 | NS | NS |
| MTTP | 2h | 1.00 ± 0.10 | 0.74 ± 0.05 | 0.78 ± 0.08 | 0.68 ± 0.10 | 0.98 ± 0.09 | 0.83 ± 0.07 | <0.05 | NS | NS |
| | 4h | 1.00 ± 0.04 | 1.03 ± 0.09 | 0.85 ± 0.09 | 1.01 ± 0.07 | 1.17 ± 0.17 | 1.14 ± 0.12 | NS | NS | NS |
| L-PK | 2h | 1.00 ± 0.32 | 0.52 ± 0.18* | 0.85 ± 0.28 | 0.59 ± 0.07 | 0.66 ± 0.24 | 0.43 ± 0.16 | <0.001 | NS | NS |
| | 4h | 1.00 ± 0.12 | 0.47 ± 0.04* | 0.79 ± 0.08 | 0.55 ± 0.09 | 0.74 ± 0.13 | 0.43 ± 0.03 | <0.001 | NS | NS |
| GS | 2h | 1.00 ± 0.08 | 1.90 ± 0.28* | 1.30 ± 0.14 | 1.34 ± 0.21 | 1.24 ± 0.11 | 1.38 ± 0.12 | <0.01 | NS | <0.05 |
| | 4h | 1.00 ± 0.11 | 1.04 ± 0.10 | 0.89 ± 0.09 | 1.23 ± 0.14 | 1.37 ± 0.21 | 1.13 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| PEPCK | 2h | 1.00 ± 0.21 | 1.52 ± 0.35* | 0.69 ± 0.14 | 0.82 ± 0.14 | 1.93 ± 0.37 | 2.75 ± 0.19 | <0.05 | <0.001 | NS |
| | 4h | 1.00 ± 0.11 | 0.97 ± 0.16 | 0.6 ± 0.10 | 0.80 ± 0.16 | 2.64 ± 0.43 | 3.25 ± 0.58 | NS | <0.001 | NS |
| G6PC1 | 2h | 1.00 ± 0.21 | 1.52 ± 0.35 | 0.54 ± 0.11 | 0.39 ± 0.07 | 1.93 ± 0.37 | 2.75 ± 0.19 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1.00 ± 0.24 | 0.60 ± 0.12 | 0.53 ± 0.072 | 0.91 ± 0.21 | 1.15 ± 0.19 | 1.13 ± 0.14 | NS | NS | NS |

Figure 1: Meal-induced changes in carbohydrate and lipid oxidation following the ingestion of a test-meal. **A:** Carbohydrate and lipid oxidation in WT and KO mice fed the NP-NC diet. Fasted mice were fed at 9:00 (T=0) with 1 g of NP-NC diet. Data are mean \pm SEM (n =6-8). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice. **B:** Carbohydrate and lipid oxidation in WT and KO mice fed the LP-HC diet. Fasted mice were fed at 9:00 (T=0) with 1 g of LP-HC diet. Data are mean \pm SEM (n =6-8). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice. **C:** Carbohydrate and lipid oxidation in WT and KO mice fed the HP-LC diet. Fasted mice were fed at 9:00 (T=0) with 1 g of HP-LC diet. Data are mean \pm SEM (n =6-8). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO.

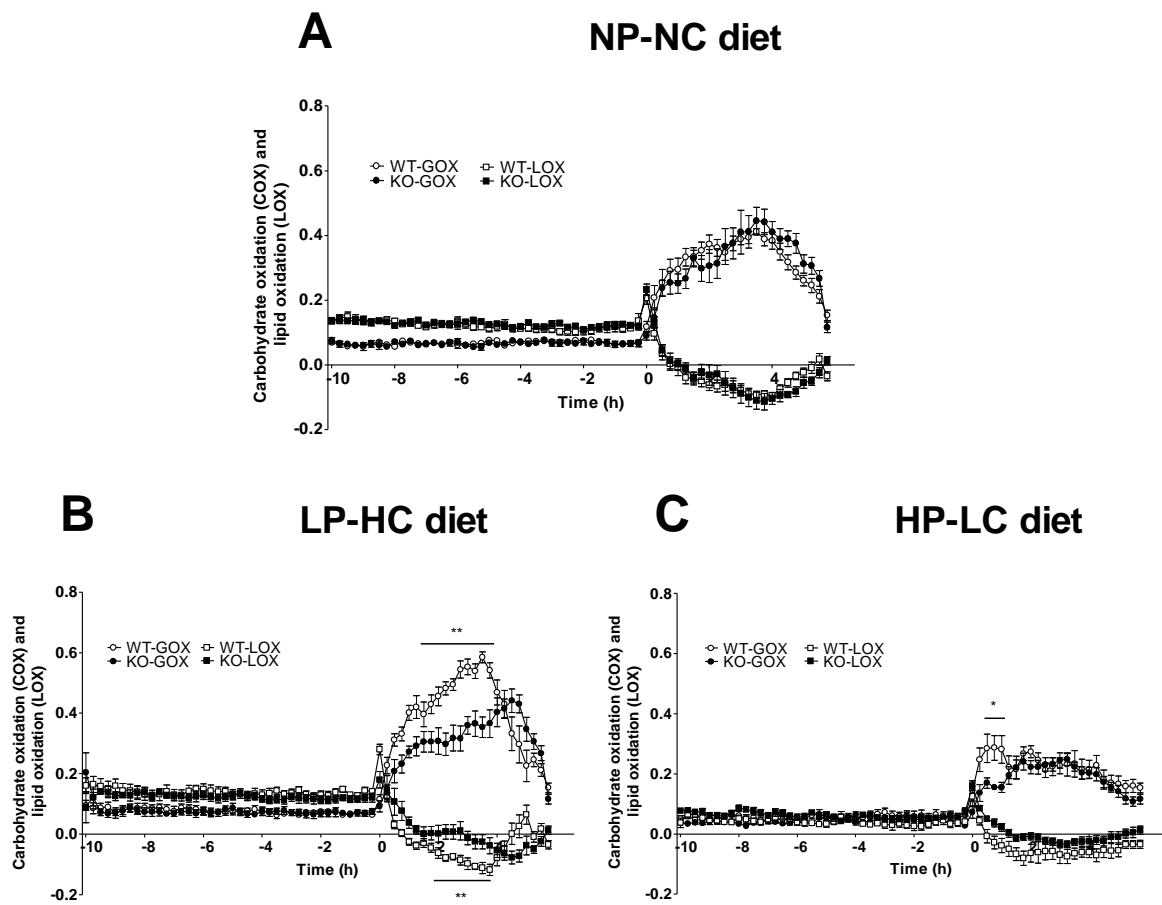


Figure 2: Modulation of hepatic and triglyceride content in the liver and mRNA abundance of CPT1- α , ACOX and KETO. A: Variation of plasmatic and hepatic triglycerides two and four hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet B: Histologic pictures of liver colored with Oil-red-O. Triglyceride droplets are colored in red. Picture 1 is representative of the liver of WT mice fed the NP-NC diet two hours after meal onset. Picture 2 is representative of the liver of KO mice two hours after meal onset. C: *CPT1a*, *ACOX* and *KETO* mRNA abundance in the liver of mice two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO within the same diet.

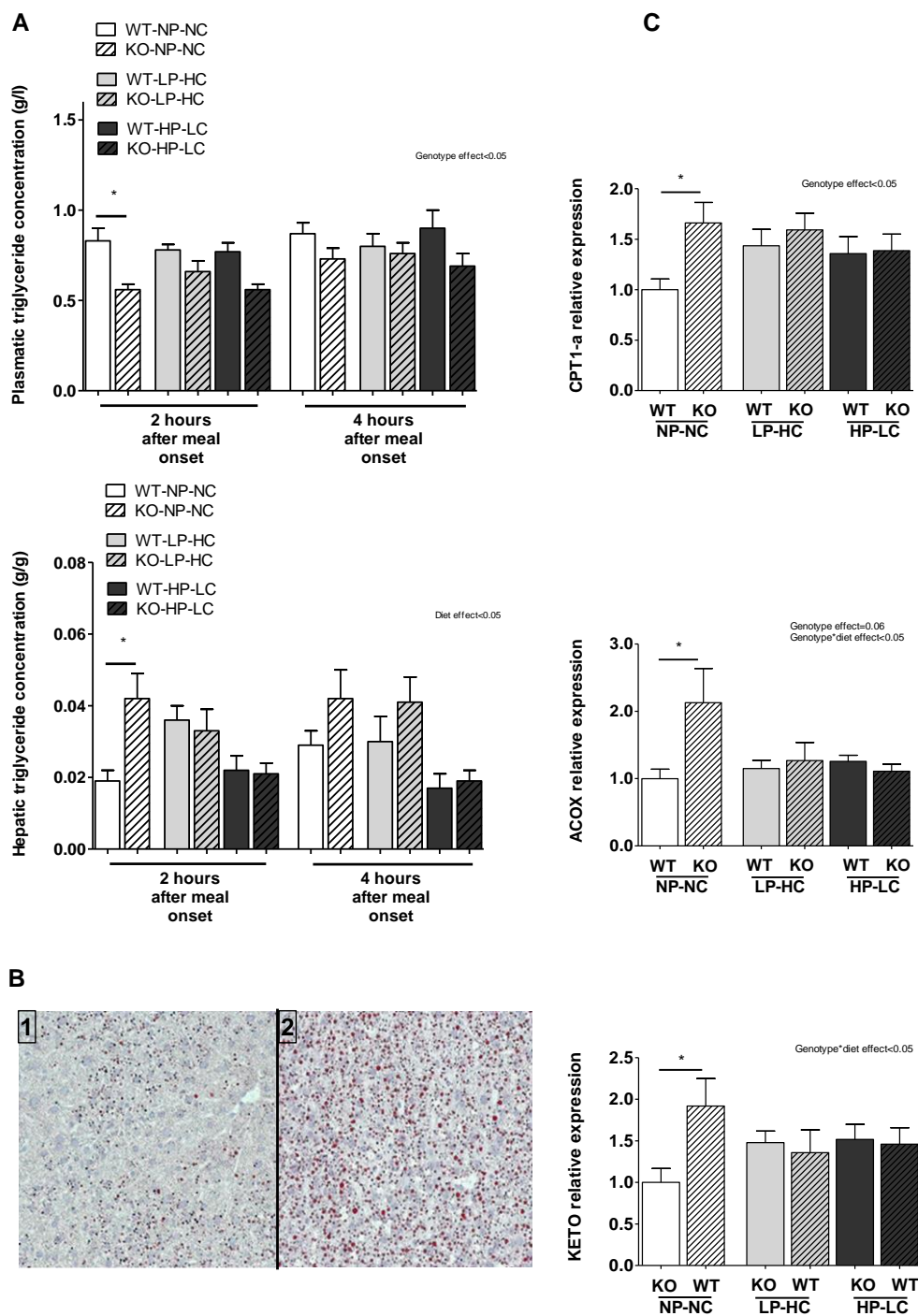


Figure 3: Modulation of GS phosphorylation and glycogen content A: Modulation of GS phosphorylation two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet. B: Modulation of glycogen concentration two and four hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet. C: Histologic pictures of liver colored with PAS. Glycogen is colored in pink. Picture 1 is representative of the liver of WT mice fed the NP-NC diet two hours after meal onset. Picture 2 is representative of the liver of KO mice fed the NP-NC diet two hours after meal onset.

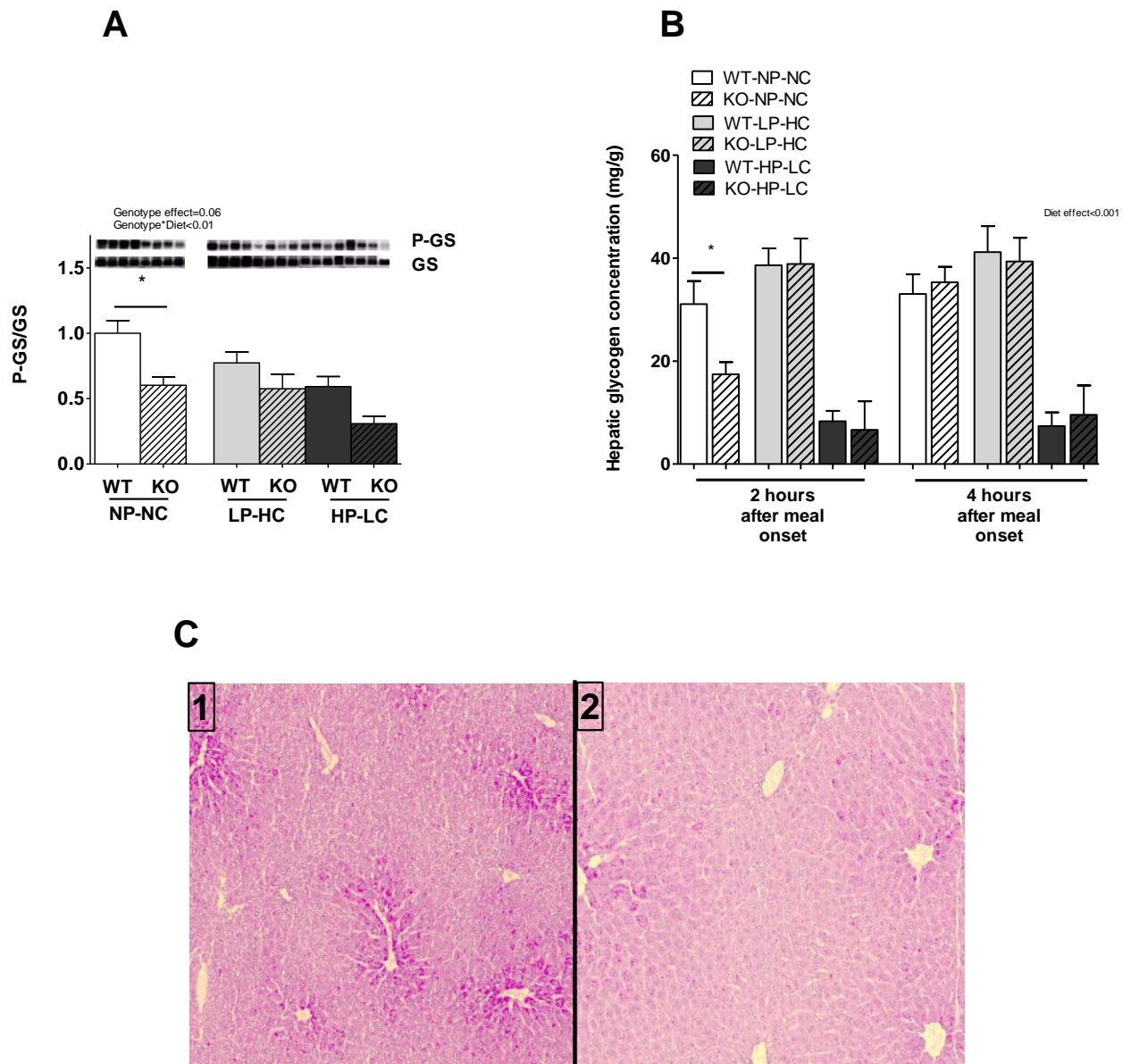
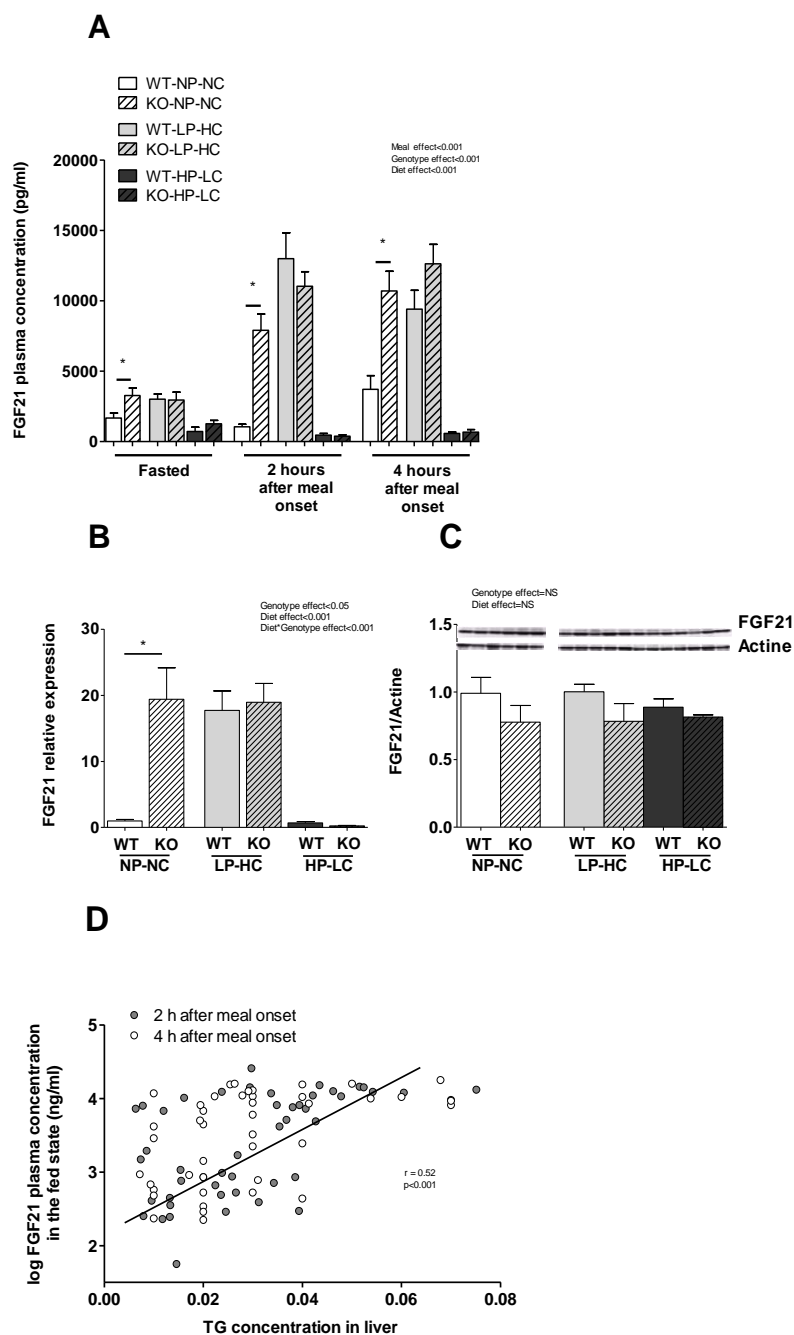
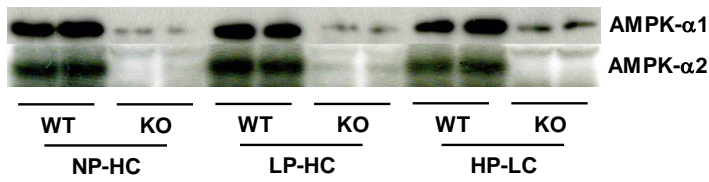


Figure 4: FGF21 synthesis and secretion, and relation with hepatic triglycerides. A: Modulation of FGF21 protein abundance in the plasma in the fasting state and two and four hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO within the same diet. B: Modulation of *FGF21* mRNA abundance in the liver of mice two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet. C: Modulation of FGF21 protein abundance in the liver of mice two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet. D: Correlation between hepatic triglycerides and the logarithm of FGF21 plasmatic concentration in the fed state two and four hours after meal onset.

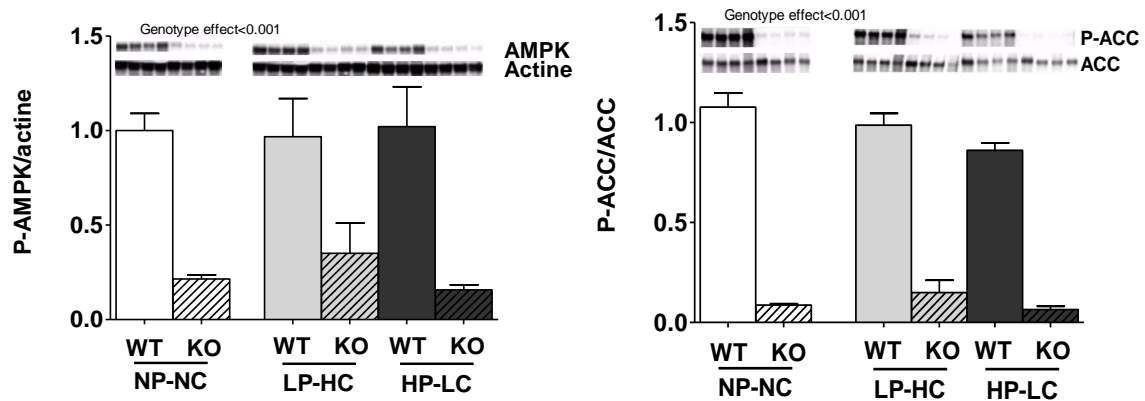


Supplemental data

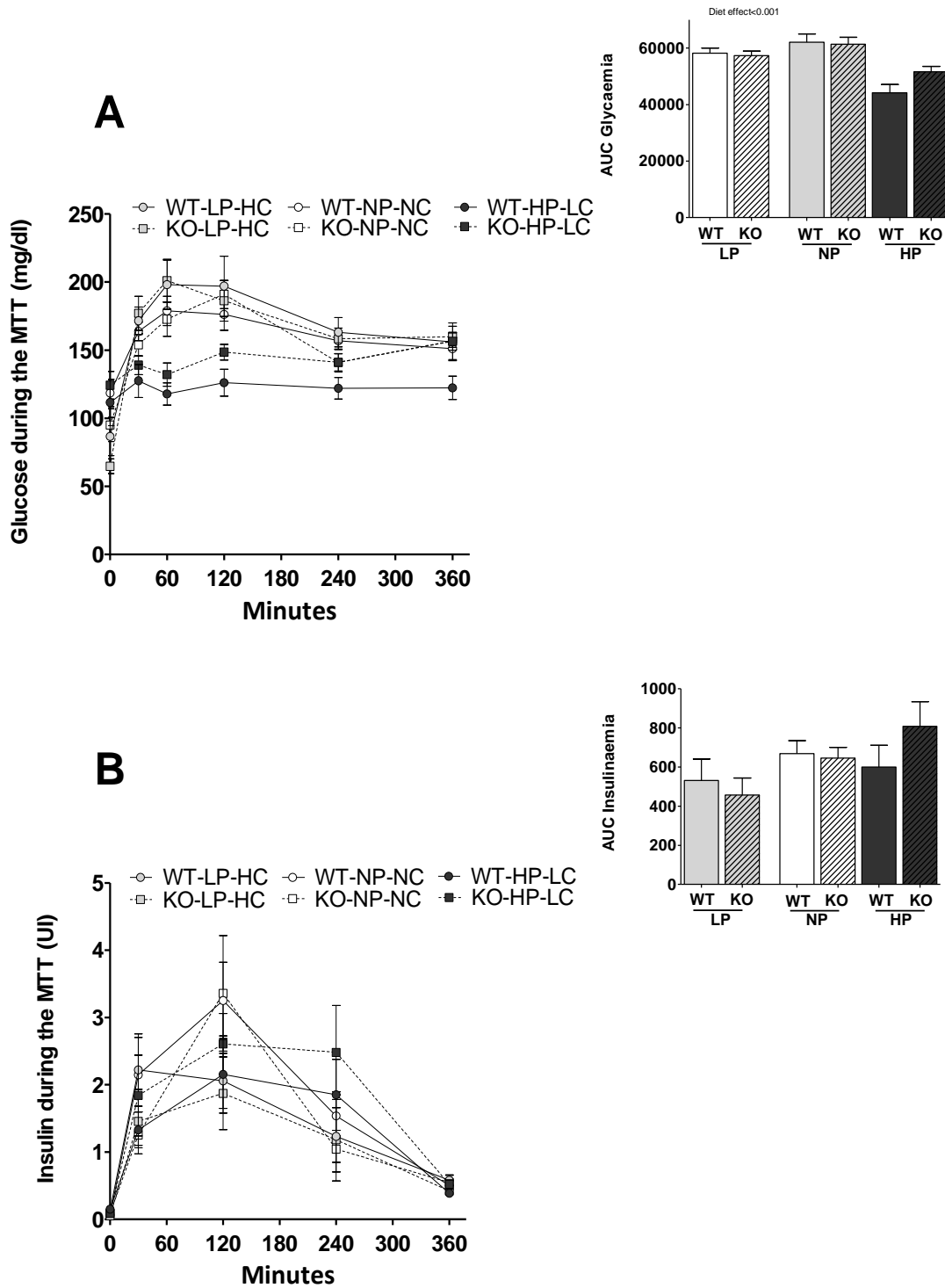
Supplemental Figure 1: Demonstration of the deletion of the two isoforms of AMPK, $\alpha 1$ and $\alpha 2$, in the liver of mice (n = 2)



Supplemental Figure 2: Modulation of AMPK abundance and ACC phosphorylation in the liver of mice two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-10).



Supplemental figure 3: Changes in glucose and insulin during the meal-tolerance test. A: Glycaemia and calculated area under curve. Fasted mice were fed at 9:00 with 1 g of their test diet. Data are mean \pm SEM (n =7-9). B: Insulinaemia and calculated area under curve. Fasted mice were fed at 9:00 with 1 g of their test diet. Data are mean \pm SEM (n =7-9).



Supplemental Table 1: mRNA abundance in hypothalamus of WT and *KO* mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|-------------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------|-------------|
| | | <i>WT</i> | <i>KO</i> | <i>WT</i> | <i>KO</i> | <i>WT</i> | <i>KO</i> | | | |
| <i>ACC</i> | 2h | 1 ± 0.09 | 1.21 ± 0.17 | 0.97 ± 0.18 | 1.18 ± 0.18 | 1.42 ± 0.20 | 1.33 ± 0.18 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.21 | 1.32 ± 0.12 | 1.34 ± 0.34 | 1.07 ± 0.05 | 1.47 ± 0.31 | 1.70 ± 0.58 | NS | NS | NS |
| <i>POMC</i> | 2h | 1 ± 0.18 | 0.78 ± 0.08 | 0.57 ± 0.08 | 0.64 ± 0.09 | 0.73 ± 0.17 | 0.62 ± 0.06 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.28 | 1.14 ± 0.24 | 0.76 ± 0.20 | 1.16 ± 0.57 | 0.62 ± 0.13 | 0.35 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| <i>AGRP</i> | 2h | 1 ± 0.12 | 1.00 ± 0.20 | 1.06 ± 0.18 | 1.10 ± 0.18 | 1.29 ± 0.20 | 1.35 ± 0.23 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.20 | 1.63 ± 0.14 | 1.49 ± 0.22 | 1.52 ± 0.22 | 1.16 ± 0.19 | 1.06 ± 0.16 | NS | NS | NS |
| <i>CART</i> | 2h | 1 ± 0.13 | 0.98 ± 0.12 | 0.91 ± 0.11 | 0.85 ± 0.05 | 1.02 ± 0.10 | 0.91 ± 0.09 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.41 | 4.84 ± 2.28 | 9.04 ± 4.66 | 2.23 ± 0.56 | 3.88 ± 1.33 | 2.87 ± 1.05 | NS | NS | NS |
| <i>MC4R</i> | 2h | 1 ± 0.19 | 0.90 ± 0.10 | 0.66 ± 0.09 | 0.72 ± 0.08 | 0.77 ± 0.08 | 0.88 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.23 | 1.53 ± 0.30 | 2.17 ± 0.97 | 1.08 ± 0.10 | 1.55 ± 0.31 | 1.62 ± 0.43 | NS | NS | NS |
| <i>CRH</i> | 2h | 1 ± 0.21 | 1.09 ± 0.11 | 0.95 ± 0.07 | 0.98 ± 0.18 | 0.55 ± 0.04 | 0.81 ± 0.13 | NS | <0.05 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.30 | 1.68 ± 0.27 | 1.95 ± 0.35 | 1.59 ± 0.11 | 0.88 ± 0.31 | 1.31 ± 0.41 | NS | NS | NS |
| <i>Y2R</i> | 2h | 1 ± 0.17 | 0.95 ± 0.11 | 0.82 ± 0.05 | 0.84 ± 0.06 | 0.87 ± 0.07 | 0.91 ± 0.10 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.18 | 1.18 ± 0.06 | 1.29 ± 0.24 | 1.07 ± 0.06 | 1.03 ± 0.12 | 0.99 ± 0.08 | NS | NS | NS |

Supplemental table 2: mRNA abundance in NACC of WT and *KO* mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|------------|----|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------|-------------|
| | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| <i>KOR</i> | 2h | 1 ± 0.11 | 1.48 ± 0.34 | 1.33 ± 0.23 | 1.37 ± 0.33 | 1.47 ± 0.26 | 1.16 ± 0.11 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.26 | 1.29 ± 0.18 | 1.71 ± 0.44 | 2.83 ± 1.26 | 0.95 ± 0.09 | 0.86 ± 0.16 | NS | NS | NS |
| <i>DOR</i> | 2h | 1 ± 0.08 | 1.39 ± 0.14 | 1.22 ± 0.14 | 1.41 ± 0.20 | 1.43 ± 0.26 | 1.25 ± 0.13 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.15 | 1.22 ± 0.12 | 1.42 ± 0.20 | 1.16 ± 0.16 | 0.95 ± 0.18 | 1.17 ± 0.24 | NS | NS | NS |
| <i>MOR</i> | 2h | 1 ± 0.06 | 1.27 ± 0.25 | 1.63 ± 0.54 | 1.31 ± 0.25 | 1.30 ± 0.40 | 1.12 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.21 | 1.72 ± 0.27 | 1.40 ± 0.23 | 2.04 ± 0.34 | 1.24 ± 0.23 | 1.07 ± 0.23 | NS | NS | NS |
| <i>DR1</i> | 2h | 1 ± 0.10 | 1.73 ± 0.43 | 1.16 ± 0.16 | 1.74 ± 0.36 | 1.34 ± 0.26 | 1.01 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.29 | 1.11 ± 0.44 | 1.20 ± 0.49 | 0.88 ± 0.30 | 0.86 ± 0.33 | 1.62 ± 0.45 | NS | NS | NS |
| <i>DR3</i> | 2h | 1 ± 0.16 | 1.89 ± 0.51 | 1.73 ± 0.38 | 2.02 ± 0.42 | 2.03 ± 0.49 | 0.94 ± 0.14 | NS | NS | <0.05 |
| | 4h | 1 ± 0.43 | 1.31 ± 0.63 | 1.46 ± 0.59 | 1.19 ± 0.50 | 1.03 ± 0.49 | 1.76 ± 0.60 | NS | NS | NS |
| <i>CBI</i> | 2h | 1 ± 0.07 | 1.26 ± 0.21 | 1.08 ± 0.14 | 1.27 ± 0.16 | 1.22 ± 0.14 | 1.11 ± 0.15 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.26 | 0.48 ± 0.17 | 0.79 ± 0.23 | 0.51 ± 0.14 | 0.43 ± 0.13 | 1.02 ± 0.19 | NS | NS | <0.05 |
| <i>NPY</i> | 2h | 1 ± 0.16 | 1.13 ± 0.18 | 1.34 ± 0.13 | 1.27 ± 0.16 | 1.71 ± 0.36 | 1.69 ± 0.3 | NS | <0.05 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.29 | 0.66 ± 0.25 | 0.99 ± 0.25 | 0.67 ± 0.21 | 0.5 ± 0.17 | 1.00 ± 0.20 | NS | NS | NS |

Supplemental table 3: mRNA abundance in ileum, jejunum and duodenum of WT and *KO* mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|------------------------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------|-------------|
| | | <i>WT</i> | <i>KO</i> | <i>WT</i> | <i>KO</i> | <i>WT</i> | <i>KO</i> | | | |
| GLP-1 (ileum) | 2h | 1 ± 0.45 | 0.19 ± 0.02 | 0.51 ± 0.13 | 0.40 ± 0.10 | 0.23 ± 0.03 | 0.58 ± 0.36 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.14 | 0.91 ± 0.21 | 1.03 ± 0.03 | 0.68 ± 0.07 | 0.99 ± 0.13 | 1.23 ± 0.13 | NS | NS | NS |
| PYY (ileum) | 2h | 1 ± 0.27 | 0.65 ± 0.07 | 1.84 ± 1.01 | 0.86 ± 0.12 | 0.53 ± 0.09 | 0.5 ± 0.13 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.20 | 0.83 ± 0.17 | 0.83 ± 0.07 | 0.64 ± 0.19 | 0.96 ± 0.18 | 1.1 ± 0.07 | NS | NS | NS |
| GLP-1 (jejunum) | 2h | 1 ± 0.23 | 0.82 ± 0.14 | 0.60 ± 0.07 | 0.79 ± 0.16 | 1.01 ± 0.23 | 0.75 ± 0.11 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.07 | 0.92 ± 0.18 | 0.92 ± 0.06 | 0.72 ± 0.06 | 1.09 ± 0.07 | 1.08 ± 0.08 | NS | NS | NS |
| PYY (jejunum) | 2h | 1 ± 0.26 | 0.72 ± 0.11 | 0.66 ± 0.11 | 0.42 ± 0.08 | 1.02 ± 0.27 | 0.68 ± 0.16 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.07 | 0.85 ± 0.19 | 0.83 ± 0.08 | 0.79 ± 0.07 | 0.99 ± 0.14 | 0.93 ± 0.09 | NS | NS | NS |
| GIP (Duodenum) | 2h | 1 ± 0.07 | 0.91 ± 0.13 | 0.90 ± 0.09 | 0.61 ± 0.06 | 1.32 ± 0.22 | 0.91 ± 0.19 | NS | <0.05 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.07 | 0.98 ± 0.11 | 1.30 ± 0.06 | 1.28 ± 0.08 | 1.23 ± 0.10 | 1.01 ± 0.21 | NS | <0.05 | NS |
| CCK (Duodenum) | 2h | 1 ± 0.15 | 0.91 ± 0.16 | 1.13 ± 0.20 | 0.75 ± 0.09 | 1.26 ± 0.21 | 0.86 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.07 | 1.12 ± 0.09 | 1.32 ± 0.18 | 1.27 ± 0.10 | 1.49 ± 0.11 | 1.03 ± 0.26 | NS | NS | NS |

Supplemental table 4: Metabolite profile of WT and *KO* mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|--------------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|-----------|-------------|
| | | <i>WT</i> | <i>KO</i> | <i>WT</i> | <i>KO</i> | <i>WT</i> | <i>KO</i> | | | |
| Pox_r (Watts) | Fasted | 0.037 ± 0.01 | 0.044 ± 0.01 | 0.021 ± 0.01 | 0.021 ± 0.00 | 0.101 ± 0.02 | 0.138 ± 0.02 | NS | <0.0001 | NS |
| Pox_r (Watts) | Fed | 0.167 ± 0.04 | 0.135 ± 0.04 | 0.089 ± 0.02 | 0.111 ± 0.03 | 0.279 ± 0.05 | 0.376 ± 0.10 | NS | <0.0001 | NS |
| Excreted urea (mg/min) | Fasted | 0.60 ± 0.15 | 0.70 ± 0.14 | 0.33 ± 0.13 | 0.32 ± 0.03 | 1.60 ± 0.28 | 2.21 ± 0.35 | NS | <0.0001 | NS |
| Excreted urea (mg/min) | Fed | 2.66 ± 0.61 | 2.16 ± 0.65 | 1.42 ± 0.27 | 1.78 ± 0.49 | 4.45 ± 0.73 | 6.00 ± 1.58 | NS | <0.0001 | NS |

Supplemental table 5: Urinary and plasma metabolite profile of WT and KO mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|----------------------------------|--------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|----------|-----------|-------------|
| | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| Plasma Urea (mmol/l) | Fasted | 9.92 ± 0.53 | 10.66 ± 0.53 | 8.77 ± 0.6 | 7.67 ± 0.54 | 11.87 ± 0.53 | 14.37 ± 0.54 | NS | <0.01 | NS |
| | 2h | 14.56 ± 0.8 | 12.92 ± 0.67 | 9.34 ± 0.63 | 9.51 ± 0.62 | 22.19 ± 0.91 | 25.16 ± 2.43 | NS | <0.0001 | NS |
| | 4h | 8.53 ± 1.04 | 7.27 ± 1.12 | 7.7 ± 1.05 | 8.67 ± 1.08 | 7.97 ± 1.11 | 7.58 ± 1.2 | NS | NS | NS |
| Plasma A. Uric (µmol/l) | Fasted | 70.24 ± 5.01 | 67.07 ± 5.23 | 59.91 ± 5.01 | 57.53 ± 5.05 | 67.74 ± 5.27 | 71.86 ± 5.4 | NS | NS | NS |
| | 2h | 65.65 ± 8.35 | 59.31 ± 25.73 | 55.37 ± 7.53 | 52.81 ± 7.37 | 93.17 ± 27.42 | 105.9 ± 27.47 | NS | <0.01 | NS |
| | 4h | 80.59 ± 3.67 | 63 ± 3.59 | 63.62 ± 5.47 | 68 ± 4.48 | 71 ± 2.65 | 61.71 ± 9.28 | NS | NS | NS |
| Plasma NEFA (mmol/l) | Fasted | 0.14 ± 0.08 | 0.14 ± 0.08 | 0.15 ± 0.02 | 0.22 ± 0.08 | 0.24 ± 0.08 | 0.24 ± 0.08 | NS | NS | NS |
| | 2h | 0.18 ± 0.03 | 0.09 ± 0.03 | 0.18 ± 0.03 | 0.13 ± 0.03 | 0.18 ± 0.02 | 0.14 ± 0.02 | NS | NS | NS |
| | 4h | 0.63 ± 0.05 | 0.59 ± 0.06 | 0.57 ± 0.06 | 0.57 ± 0.06 | 0.76 ± 0.06 | 0.52 ± 0.05 | NS | NS | NS |
| Plasma Alb (g/l) | Fasted | 30.32 ± 1.53 | 27.62 ± 1.54 | 28.16 ± 1.54 | 27.2 ± 1.53 | 29.49 ± 1.57 | 28.52 ± 1.52 | NS | NS | NS |
| | 2h | 27.54 ± 0.83 | 25.3 ± 1.37 | 25.42 ± 0.8 | 26.35 ± 0.79 | 26 ± 1.33 | 26.12 ± 1.35 | NS | NS | NS |
| | 4h | 31.5 ± 1.1 | 29.9 ± 1.08 | 30.06 ± 0.95 | 33.33 ± 0.94 | 30.9 ± 0.69 | 31.43 ± 0.92 | NS | NS | NS |
| Plasma Glyc (µmol/l) | Fasted | 318.9 ± 29.2 | 304.5 ± 27.91 | 342. ± 26.78 | 326.1 ± 29.1 | 273.6 ± 27.84 | 288.7 ± 27.37 | NS | NS | NS |
| | 2h | 279.8 ± 49.8 | 303.5 ± 49.29 | 395.6 ± 47.0 | 336.8 ± 48.8 | 282.2 ± 52.93 | 252.3 ± 53.48 | NS | <0.01 | NS |
| | 4h | 377.3 ± 25.8 | 351.1 ± 25.3 | 319.6 ± 26.1 | 354.8 ± 26.01 | 427.53 ± 24.2 | 310.67 ± 24.3 | NS | NS | NS |
| Plasma Chol (mmol/l) | Fasted | 2.54 ± 0.18 | 1.99 ± 0.17 | 2.19 ± 0.17 | 2.21 ± 0.17 | 2.09 ± 0.18 | 1.83 ± 0.18 | NS | NS | NS |
| | 2h | 2.04 ± 0.12 | 1.64 ± 0.14 | 1.82 ± 0.12 | 2 ± 0.12 | 1.43 ± 0.15 | 1.38 ± 0.16 | NS | NS | NS |
| | 4h | 3.08 ± 0.22 | 2.61 ± 0.23 | 2.78 ± 0.15 | 3.42 ± 0.16 | 2.86 ± 0.23 | 3.02 ± 0.29 | NS | NS | NS |
| Plasma HDL (mmol/l) | Fasted | 2.72 ± 0.32 | 2.12 ± 0.31 | 2.6 ± 0.31 | 2.3 ± 0.32 | 2.22 ± 0.32 | 1.86 ± 0.32 | NS | NS | NS |
| | 2h | 2.54 ± 0.16 | 2.04 ± 0.19 | 2.36 ± 0.17 | 2.5 ± 0.16 | 1.86 ± 0.21 | 1.7 ± 0.21 | NS | <0.01 | NS |
| | 4h | 2.03 ± 0.13 | 1.72 ± 0.12 | 1.84 ± 0.12 | 2.25 ± 0.11 | 1.79 ± 0.12 | 1.97 ± 0.24 | NS | NS | NS |
| Plasma β-hydroxybutrate (mmol/l) | Fasted | 0.18 ± 0.02 | 0.21 ± 0.04 | 0.17 ± 0.10 | 0.22 ± 0.07 | 0.25 ± 0.05 | 0.21 ± 0.04 | NS | NS | NS |
| | 2h | 0.15 ± 0.01 | 0.16 ± 0.02 | 0.14 ± 0.02 | 0.11 ± 0.02 | 0.24 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02 | NS | NS | NS |
| | 4h | 0.41 ± 0.10 | 0.42 ± 0.11 | 0.61 ± 0.22 | 0.69 ± 0.15 | 0.63 ± 0.15 | 0.39 ± 0.17 | NS | NS | NS |

Supplemental table 6: mRNA abundance in epididymal adipose tissue of WT and *KO* mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|---------------|----|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|----------|-----------|-------------|
| | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| <i>ACC</i> | 2h | 1 ± 0.12 | 1.18 ± 0.18 | 1.44 ± 0.17 | 1.3 ± 0.24 | 0.91 ± 0.21 | 0.61 ± 0.06 | NS | <0.01 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.10 | 1.14 ± 0.18 | 1.16 ± 0.1 | 1.95 ± 0.26 | 1.01 ± 0.48 | 0.97 ± 0.17 | NS | NS | <0.05 |
| <i>FAS</i> | 2h | 1 ± 0.14 | 1.31 ± 0.3 | 1.43 ± 0.36 | 1.43 ± 0.49 | 1.18 ± 0.42 | 0.65 ± 0.13 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.18 | 1.3 ± 0.32 | 1.56 ± 0.33 | 1.99 ± 0.61 | 1.22 ± 0.82 | 1.37 ± 0.39 | NS | NS | NS |
| <i>FGF21</i> | 2h | 1 ± 0.23 | 1.25 ± 0.16 | 2.55 ± 0.53 | 2.7 ± 0.54 | 1.12 ± 0.2 | 0.98 ± 0.15 | NS | <0.0001 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.18 | 1.88 ± 0.8 | 2.03 ± 0.45 | 3.76 ± 2.15 | 1.75 ± 0.51 | 1.66 ± 0.32 | NS | NS | NS |
| <i>GPAT</i> | 2h | 1 ± 0.07 | 1.23 ± 0.09 | 1.3 ± 0.15 | 0.92 ± 0.11 | 1.47 ± 0.18 | 1 ± 0.16 | NS | NS | <0.05 |
| | 4h | 1 ± 0.17 | 1.01 ± 0.24 | 1 ± 0.23 | 0.99 ± 0.12 | 1.22 ± 0.24 | 1.25 ± 0.25 | NS | NS | NS |
| <i>HSL</i> | 2h | 1 ± 0.13 | 1.14 ± 0.14 | 1.21 ± 0.05 | 1.06 ± 0.14 | 1.2 ± 0.14 | 0.9 ± 0.12 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.17 | 0.9 ± 0.23 | 1.33 ± 0.18 | 1.25 ± 0.29 | 1.47 ± 0.64 | 1.07 ± 0.28 | NS | NS | NS |
| <i>LEPTIN</i> | 2h | 1 ± 0.10 | 0.9 ± 0.09 | 1.52 ± 0.14 | 1.63 ± 0.26 | 0.93 ± 0.13 | 1.03 ± 0.19 | NS | <0.001 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.17 | 1.07 ± 0.18 | 1.49 ± 0.16 | 1.57 ± 0.23 | 0.77 ± 0.11 | 0.98 ± 0.21 | NS | <0.01 | NS |
| <i>SIRT1</i> | 2h | 1 ± 0.08 | 0.99 ± 0.09 | 1.22 ± 0.09 | 1.34 ± 0.08 | 1.07 ± 0.12 | 0.84 ± 0.1 | NS | <0.001 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.07 | 0.81 ± 0.07 | 1.18 ± 0.07 | 0.95 ± 0.08 | 0.99 ± 0.1 | 1.28 ± 0.03 | NS | <0.01 | <0.01 |
| <i>UCP2</i> | 2h | 1 ± 0.13 | 0.87 ± 0.09 | 1.08 ± 0.08 | 1.18 ± 0.15 | 0.85 ± 0.05 | 0.86 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.07 | 0.97 ± 0.13 | 1.51 ± 0.13 | 1.08 ± 0.13 | 1 ± 0.07 | 1.62 ± 0.23 * | NS | <0.05 | <0.01 |
| <i>UCP3</i> | 2h | 1 ± 0.10 | 1.12 ± 0.13 | 1.64 ± 0.33 | 1.44 ± 0.27 | 1.19 ± 0.33 | 0.6 ± 0.1 | NS | <0.05 | NS |
| | 4h | 1 ± 0.15 | 0.93 ± 0.19 | 1.34 ± 0.24 | 1.33 ± 0.27 | 1.17 ± 0.33 | 0.95 ± 0.2 | NS | NS | NS |
| <i>CD36</i> | 2h | 1 ± 0.09 | 1.06 ± 0.13 | 1.59 ± 0.39 | 1.08 ± 0.26 | 1.37 ± 0.23 | 0.91 ± 0.16 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.13 | 0.91 ± 0.15 | 1.16 ± 0.08 | 1.17 ± 0.09 | 0.94 ± 0.15 | 1 ± 0.17 | NS | NS | NS |

Supplemental table 7: mRNA abundance in muscle of WT and KO mice fed LP-HC, NP-NC or HP-LC diets two and four hours after meal onset.

| | | NP-NC | | LP-HC | | HP-LC | | Genotype | Test diet | Interaction |
|---------------|----|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------|-------------|
| | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| <i>ACC</i> | 2h | 1 ± 0.14 | 0.78 ± 0.05 | 0.85 ± 0.06 | 0.82 ± 0.06 | 0.79 ± 0.05 | 0.69 ± 0.03 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.12 | 0.91 ± 0.06 | 1.18 ± 0.24 | 0.91 ± 0.10 | 0.76 ± 0.14 | 0.85 ± 0.08 | NS | NS | NS |
| <i>FAS</i> | 2h | 1 ± 0.25 | 0.68 ± 0.08 | 0.72 ± 0.07 | 0.60 ± 0.05 | 0.68 ± 0.06 | 0.60 ± 0.05 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.29 | 0.64 ± 0.08 | 1.93 ± 1.30 | 0.82 ± 0.20 | 0.68 ± 0.41 | 0.76 ± 0.18 | NS | NS | NS |
| <i>CD36</i> | 2h | 1 ± 0.10 | 0.94 ± 0.07 | 1.07 ± 0.12 | 0.95 ± 0.01 | 0.95 ± 0.07 | 0.89 ± 0.08 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.08 | 1.05 ± 0.08 | 1.05 ± 0.10 | 0.79 ± 0.09 | 0.86 ± 0.09 | 0.98 ± 0.11 | NS | NS | NS |
| <i>CPT1-b</i> | 2h | 1 ± 0.07 | 0.89 ± 0.02 | 0.94 ± 0.09 | 0.85 ± 0.04 | 1.04 ± 0.07 | 0.92 ± 0.05 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.05 | 0.97 ± 0.07 | 0.88 ± 0.05 | 0.72 ± 0.05 | 0.92 ± 0.06 | 0.93 ± 0.06 | NS | NS | NS |
| <i>HK2</i> | 2h | 1 ± 0.06 | 0.84 ± 0.05 | 0.78 ± 0.05 | 1.00 ± 0.15 | 0.81 ± 0.03 | 0.87 ± 0.02 | NS | NS | <0.05 |
| | 4h | 1 ± 0.06 | 1.21 ± 0.23 | 1.13 ± 0.18 | 1.00 ± 0.12 | 1.00 ± 0.03 | 1.19 ± 0.24 | NS | NS | NS |
| <i>LDL</i> | 2h | 1 ± 0.18 | 0.73 ± 0.07 | 0.82 ± 0.08 | 0.63 ± 0.06 | 1.29 ± 0.54 | 0.66 ± 0.03 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.09 | 0.98 ± 0.08 | 1.05 ± 0.11 | 0.84 ± 0.08 | 0.87 ± 0.09 | 0.90 ± 0.08 | NS | NS | NS |
| <i>UCP2</i> | 2h | 1 ± 0.13 | 0.93 ± 0.09 | 0.98 ± 0.15 | 0.85 ± 0.12 | 0.95 ± 0.06 | 0.85 ± 0.11 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.10 | 0.88 ± 0.09 | 0.97 ± 0.10 | 0.84 ± 0.07 | 0.77 ± 0.08 | 0.90 ± 0.25 | NS | NS | NS |
| <i>UCP3</i> | 2h | 1 ± 0.15 | 0.96 ± 0.06 | 1.09 ± 0.10 | 1.00 ± 0.11 | 0.89 ± 0.11 | 0.76 ± 0.10 | NS | NS | NS |
| | 4h | 1 ± 0.09 | 0.93 ± 0.07 | 1.08 ± 0.12 | 1.07 ± 0.11 | 0.88 ± 0.10 | 1.10 ± 0.34 | NS | NS | NS |

3.3 Article III : La baisse du contenu en protéines du régime conduit à une modification du profil d'oxydation dans le foie de souris n'exprimant pas GCN2 dans le foie

(Decreasing dietary protein content leads to changes in postprandial oxidation profile in liver GCN2-liver deficient mice)

3.3.1 Contexte :

La protéine GCN2 est une sérine/thréonine kinase dont le rôle premier est de détecter la déficience en acides aminés et, en retour, de bloquer la traduction par l'intermédiaire de la phosphorylation du facteur d'initiation eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α). Des études ont montré que GCN2 était également impliquée dans le métabolisme énergétique, notamment dans le contrôle de la néoglucogénèse, de la lipogénèse, de l'oxydation des acides gras et de la synthèse de fibroblast growth factor 21 (FGF21). GCN2 est non seulement un senseur de la déficience en acides aminés mais également de leur disponibilité, en effet, sous régime hyperprotéique la phosphorylation de GCN2 dans le foie diminue. Toutefois, le rôle de GCN2, notamment au niveau du foie, dans les adaptations métaboliques au contenu en protéines du régime, ont été peu étudiés.

3.3.2 Objectif :

Notre étude cherche à définir le rôle de cette protéine dans l'adaptation du métabolisme énergétique en réponse à la variation du contenu en protéines du régime.

3.3.3 Méthodes :

Des souris sauvages (WT) et des souris KO GCN2-foie spécifique (KO) mâles ont été séparées en 3 groupes nourris pendant 3 semaines avec des régimes contenant une teneur en protéines faible (LP) normale (NP) ou haute (HP). La prise alimentaire et le poids ont été suivis. Les variations suite à l'ingestion d'un repas-test de 1 g (17 kJ) des taux d'oxydation du glucose et des acides gras (calorimétrie indirecte) ont été mesurées. A la fin de l'expérimentation, après 16h à jeun, les souris ont été à nouveau nourries avec un repas calibré de 1 g. Deux heures plus tard, ces dernières ont été euthanasiées, différents organes ainsi que le sang ont été prélevés pour des mesures d'expression de gènes, de concentration de protéines et de métabolites.

3.3.4 Résultats principaux :

L'augmentation des protéines dans le régime est accompagnée d'une baisse de la prise alimentaire et de l'adiposité. Toutefois, aucun effet de la délétion ne peut être observé sur ces deux paramètres. Les souris KO présentent globalement une glycémie plus faible que les souris sauvages. Chez les souris nourries en régime NP et HP, aucune différence n'est notable concernant les profils d'oxydation des glucides et des lipides, les taux plasmatiques de métabolites et l'expression des gènes entre souris

sauvages et souris n'exprimant GCN2 dans le foie. Au contraire, les souris KO nourries en régime LP présentent une augmentation de l'oxydation des glucides et une baisse de l'oxydation des lipides par rapport aux souris sauvages. Ceci s'accompagne par une non-induction de la sécrétion de FGF21 et de l'expression d'UCP3 dans le tissu adipeux brun en réponse au repas.

3.3.5 Conclusion :

Les conséquences de la délétion de GCN2 sur le métabolisme énergétique dépendent de la composition du régime. En effet, sous régime NP et HP, la quantité d'acides aminés est suffisante, par conséquent, chez les souris sauvages, GCN2 n'est pas activé par phosphorylation et le profil métabolique de ces souris est similaire à celui des souris KO. Au contraire, sous régime LP, il y a une déficience en acides aminés, GCN2 est donc activée et en retour entraîne la sécrétion de FGF21 qui va permettre de maintenir un niveau élevé d'oxydation lipidique et prévenir l'augmentation de l'oxydation des glucides et expliquer ainsi les différences d'oxydation entre souris sauvages et souris KO.

3.3.6 Manuscrit :

Le manuscrit a été rédigé. Le dosage en Luminex est encore à finaliser et à intégrer dans le manuscrit.

**Decreasing dietary protein content leads to changes in postprandial
oxidation profile in liver GCN2-liver deficient mice**

Tristan Chalvon-Demersay¹, Joanna Moro¹, Patrick C. Even¹, Daniel Tomé¹, Julien Piedcoq¹, Claire Gaudichon¹, Anne-Catherine Maurin², Pierre Fafournoux² and Dalila Azzout-Marniche¹

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

²UMR 1019 Nutrition Humaine, INRA, Université Clermont 1, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint Genès Champanelle, France

Abstract

GCN2 is a kinase which detects amino acid deficiency and in turn leads to the blockade of translation initiation. GCN2 is also involved in energy metabolism, especially in the control of gluconeogenesis, lipogenesis and fatty acid oxidation. However, to which extent GCN2, particularly in the liver, is involved in the metabolic adaptations in response to the modulation of dietary protein have been little studied.

Wild-type (WT) and liver GCN2-deficient (KO) mice were fed either a normo-protein diet (NP), a low-protein diet (LP) or a high-protein diet (HP) for 3 weeks. During this period, body weight and food intake were followed daily. Measurement of metabolic parameters and indirect calorimetry were performed during the first hours after refeeding a 1 g-calibrated meal following an overnight fast. In these conditions, the increase in protein in the diet goes together with a decline in food intake and adiposity. However, no effect of the deletion was observed on these two parameters. KO mice refed an NP or HP meal, normal amplitudes in meal-induced glucose and lipid oxidation changes. In contrast, KO mice refed LP meal displayed a higher glucose oxidation and a lower fatty acid oxidation than WT mice. These mice also exhibited a lower secretion of Fibroblast Growth Factor FGF21 as well as a decrease in UCP3 expression in the white adipose tissue two hours after refeeding. Taken together, these results show that the consequences of hepatic GCN2 deletion on energy metabolism depend on protein content of the diet. Under the NP and HP diet, the amount of amino acids is sufficient. Therefore, in wild-type mice, GCN2 is not activated and the metabolic profile of these mice is similar to the one of KO mice. On the contrary, under the LP diet, there is a deficiency in amino acids, GCN2 is activated and in turn causes the secretion FGF21. FGF21, which is involved in fatty acid oxidation, maintains a high level of lipid oxidation and prevent the increase in carbohydrate oxidation and explain the difference in oxidation profile between WT and KO mice.

Introduction

General control non-derepressible 2 (GCN2) is a serine/threonine kinase which was first identified to play a major role in sensing amino acid deficiency. When the availability of one or several amino acid decreases, GCN2 phosphorylates the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) which leads to the blockade of translation initiation and protein synthesis (Dever and Hinnebusch, 2005). GCN2 is also a sensor of amino acid availability, indeed, Chotechuan et al. have reported that GCN2 phosphorylation in the liver was repressed in rats fed a high-protein diet for fourteen days (Chotechuan et al., 2009).

GCN2 is also involved in the control of carbohydrates and lipid metabolism. GCN2-KO mice have a less efficient neoglucogenesis in the fasting state and are not able to repress phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) expression in the fed state (Xu et al., 2013). In response to a leucine-deficient diet GCN2-KO mice also have an increase in fatty acid synthase expression in the liver and develop steatosis (Guo and Cavener, 2007). Moreover, in response to a low protein diet (Laeger et al., 2014c), GCN2-KO mice are not able to induce Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) secretion which is involved in the regulation of β -oxidation, ketogenesis, neoglucogenesis and lipogenesis (Gimeno and Moller, 2014; Samms et al., 2015). Under a normo-protein diet, no difference in term of body composition, food intake and energy expenditure can be noticed between WT and GCN2-KO mice whereas under a low-protein diet, some of the features observed in WT mice such as the increase in food intake, in energy expenditure and the decrease in body weight and lean body mass are blunted in GCN2-KO mice during the first weeks after the introduction of the diet (Laeger et al., 2016).

However, to which extent GCN2, especially hepatic GCN2, is involved in the regulation of energy metabolism in response to changes in dietary protein intake and especially under high-protein diet is not well clarified. In order to assess the contribution of hepatic GCN2 on the adaptation to protein intake, wild-type mice and genetically modified mice where the expression of GCN2 in the liver is deleted were fed diets differing in their relative protein to carbohydrate content and several parameters related to energy metabolic pathways were examined.

Materials and methods

Animals

The study was approved by the French National Animal Care Committee (number 14-15) and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals.

GCN2 knock-out liver specific C57BL/6 mice were generated by crossing albumin-Cre transgenic mice with floxed GCN2 mice. The deletion was confirmed by PCR genotyping as previously described (Foretz et al., 2010).

Fifty-two males, 27 wild-type mice (WT) and 25 GCN2-KO (KO) liver specific mice were produced and housed in the light and temperature-controlled animal facility of AgroParisTech (12:12 h reversed light/dark cycle, lights on at 21:00, 24 °C). Spawners were fed a 20% protein (P20) diet throughout the test. Young mice were weaned after 25 days, and fed with a normo-protein (14%) diet (NP) during three weeks (run-in period) before being switched to their experimental diet (test period). Diet compositions are detailed in table 1.

Experimental Design

During an additional three-week period, corresponding to the test period, mice were either kept on the NP diet (N=18, 9 KO / 9 WT), switched on a low protein (LP) diet (N=18, 9 KO / 9 WT) or switched on a high protein (HP) diet (N=16, 7 KO / 9 WT). Food intake were measured daily except on weekends.

During the second week, each mouse was housed 23 hours (~17:00 to 16:00 the next day) in a calorimetric cage during which respiratory exchanges were continuously recorded at 2 s interval. After an overnight fast (~17:00 to 09:00 the next day), a 1-gram pellet (16kJ) of their test-diet was introduced in the calorimetry cage and it was controlled that the food was eaten within 15 min. At the termination of the study, the mice were fasted overnight. At 7:00, 50 µL of blood were collected from the tail vein to measure plasma parameters in the fasting state (see below). At 8:00 the mice were fed with 1-gram pellet of their test-diet and two hours after the meal they were killed with a pentobarbital injection (50 mg/kg). Blood was taken from the vena cava (~200µl), collected on EDTA, centrifuged (4°C, 3000rpm, 10min) and plasma was stored at -80°C until analysis.

Afterwards, body composition was analyzed by dissection and weighing of organs and tissues. Samples of liver, gastrocnemius muscle, epididymal adipose tissue, brown adipose tissue were placed in TRIzol (Invitrogen) and frozen at -80°C for further measurement of mRNA abundance. Additional liver samples were frozen to assay glycogen and triglyceride content.

Glucose and lipid oxidation in response to ingestion of the test-meal

Each mouse was housed individually at 17:00 in a calorimetric cage in which temperature was maintained at 30°C and motor activity assessed by piezoelectric cells.

At 9:00 the next morning, 1 g pellet (16 kJ) of their respective test-diet was provided and mice were kept in the cage an additional 7 hours. Measurements of respiratory exchanges, oxygen consumption (VO₂) and carbon dioxide production (CO₂) were recorded continuously during these 23 hours. Glucose (Gox) and lipid (Lox) and protein oxidation (Pox) were computed according to the Weir formula (Even and Nadkarni, 2012):

$$\text{Gox (Watts)} = ((4.57 \cdot \text{VCO}_2) - (3.23 \cdot \text{VO}_2) - (2.87 \cdot \text{N})) \cdot (0.279),$$

$$\text{Lox (Watts)} = ((1.69 \cdot \text{VO}_2) - (1.69 \cdot \text{VCO}_2) - (1.92 \cdot \text{N})) \cdot (0.628),$$

with VO₂, VCO₂ in mL/min and N in mg/min, 0.279 and 0.628 conversion of Gox and Lox from mg/min to W respectively (Even and Nadkarni, 2012). N was estimated assuming that Pox (Pox=N*6.25) usually contributes to resting metabolic rate in proportion to the protein content in each diet, i.e. 5%; 14 %, 55% respectively for LP, NP and HP diets. However, it was taken into account that in response to ingestion of a HP meal, only half of the deaminated amino acids are oxidized four hours after meal onset (Fromentin et al., 2010; Stepien et al., 2011) and therefore, protein oxidation was limited to 25% of resting metabolic after ingestion of the HP test-meal. To validate these calculations and to compare protein oxidation between WT and KO mice, the floor of the calorimetry cage was covered with blotting paper to collect excreted urea. The blotting paper was changed when the meal was given to separate collection during the pre- and post-meal periods. Urea was recovered by soaking the blotting paper into sterile water overnight. Urea was measured using a kit (Urea kit, Biomérieux) and real protein oxidation calculated assuming (Even and Nadkarni, 2012) :

$$\text{Pox}_r \text{ (Watts)} = 6.25 \cdot \text{Excreted urea (mg/min)} \cdot 2 \cdot (15.6/60)$$

Analytical procedure

Glucose was measured immediately from a drop of blood using automatic analyzer (Life-scan, One touch Vita). Metabolites profile (Non-esterified fatty acid, urea, cholesterol, HDL cholesterol, β -hydroxybutyrate, triglycerides (TG)) was measured using an automated chemistry analyzer, Olympus AU400. Hepatic TG concentration was assayed on homogenized samples of liver using a TG assay kit (Randox Triglycerides). Glycogen was extracted from liver samples using KOH 30%, digested into glucose using amyloglucosidase (Sigma) and assayed using a glucose assay kit (Randox Gluc). Plasma insulin and FGF21 were assayed using an enzyme linked immunoassay (Mercoxia Mouse Insulin/FGF21 ELISA kit, Symansis).

RNA preparation and gene expression measurement

We investigated lipid and carbohydrate metabolism and energy expenditure assessing mRNA abundance of key genes involved in lipogenesis, lipolysis, glycolysis, neoglucogenesis and glycogen synthesis in the liver, muscle and white adipose tissue

Total RNA from samples of liver, gastrocnemius muscle, epididymal adipose tissue, brown adipose tissue, hypothalamus, nucleus accumbens and epithelial cells from ileum, duodenum, ileum was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA concentration was estimated using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm and RNA integrity was confirmed by electrophoresis on agarose gel. To synthesize cDNA using High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, retrotranscription was accomplished on 0.4 μ g of RNA. Real Time PCR was performed to measure gene expression on the Step One (Applied Biosystems) using Power SYBR GREEN PCR MIX (Applied Biosystems) on 5 ng (2.5 μ l) of cDNA. Gene expression was calculated as $2^{-\Delta_{CT}}$, where $\Delta_{CT} = CT_{Gene} - CT_{18S}$. Data were expressed as a percentage of the values of the WT mice fed the NP diet. Negative controls were used to detect potential contamination (control without Retrotranscriptase or RNA). PCR primers were designed using Primer Express and are available under request.

Statistical analysis

Data are presented as means \pm SEM. The effect of the diets and genotype was tested by two-way ANOVA with interaction using R[®]. Pairwise comparisons were performed with Post hoc Bonferonni

tests for multiple comparisons, p-value were multiplied by the number of comparisons performed. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Food intake, body weight, body composition and hepatic triglycerides and glycogen concentrations

Results show that food intake was increased with the LP diet and decreased with the HP one (Table 2). Thus, mice fed the LP diet had a food intake almost 1.3-fold higher than mice fed the NP diet. No difference was observed between body weights but weights of total fat and in particular of mesenteric, epididymal, retroperitoneal and subcutaneous fat pads were reduced in HP fed mice compared to LP and NP fed mice, whereas there was no significant difference between NP et LP. Hepatic triglycerides and glycogen contents decreased with the increase in the protein content of the diet. No differences were observed between WT and KO mice.

Glucose and lipid oxidations in response to ingestion of the test-meal

The meal-induced changes in glucose and lipid oxidation were larger in response to the LP meal and lower in response to the HP one which fitted with the largest carbohydrate content in the LP meal and the lowest in the HP meal. No difference in glucose and lipid oxidations were observed between KO and WT mice fed the NP and HP meals whereas KO mice fed the LP meal exhibited a small but significantly larger increase in glucose oxidation and decrease in lipid oxidation from 0.25 h to 2.5 h after ingestion of the test-meal (Figure 1).

Plasma metabolites and hormonal concentration

Fasting (but not fed) blood glucose was lower in KO mice compared to WT mice and higher in HP fed mice compared to LP fed mice (NP-WT: 112.25 ± 14.9 , NP-KO: 91.78 ± 10.04 , LP-WT: 84 ± 13.2 , LP-KO: 62.78 ± 7.21 , HP-WT: 122.57 ± 17.86 , HP-KO: 96.83 ± 18.27 . Genotype effect: $p = 0.019$; Diet effect: $p = 0.014$).

Triglycerides, non-esterified fatty acids, total cholesterol and HDL cholesterol as well as insulin were not affected neither by the protein content of the diet nor by the deletion of hepatic GCN2 (Supplemental table 1).

Plasma urea was higher in HP fed mice both in the fasting and fed state in comparison with both NP and LP fed mice. Interestingly, fasting plasma β -hydroxybutyrate was higher in LP fed mice whereas in the fed state it was higher in HP fed ones. No effect of the deletion was observed on these two parameters (Supplemental table 1).

Fasting plasma FGF21 concentration was higher in LP fed mice than in NP and HP fed ones. Ingestion of the test-meal significantly increased plasma FGF21 only in WT mice fed the LP diet and not in KO mice (Figure 2A).

Gene expression measurement

In liver (Table 3), expressions of gene involved in lipid metabolism were affected only by the protein content of the diet. mRNA encoding fatty acid synthase (FAS), acetyl-CoA carboxylase a (ACCa) and Elongation of very long chain fatty acids protein 6 (Elovl6) were decreased in mice fed the HP diet compared to NP or LP diets and mRNA encoding diglyceride acyltransferase (DGAT) and glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) were higher in mice fed the LP diet compared to mice fed the NP diet. These changes suggest that the decrease in protein content and the parallel increase of carbohydrates in the diet could induce an increase in hepatic fatty acid synthesis. Moreover, the expression of lipoprotein lipase (LPL) and low density lipoprotein (LDL) was higher in mice fed the LP diet suggesting that these higher expressions could help coping with the higher triglyceride synthesis.

Concerning carbohydrate metabolism, mRNA encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) was increased in mice fed the HP diet whereas the expression of glucose-6-phosphatase (G6PC1) decreased in mice fed the LP-test meal. Taken together, these observations suggest that neoglucogenesis is increased when the diet is enriched in protein and decreased with the increase of dietary carbohydrates. No effect was observed on the expression of gene involved in ketogenesis (KETO, HMG lyase), in fatty acid oxidation (CPT1a) and glycolysis (L-PK) (Supplemental table 2).

Liver mRNA encoding FGF21 synthesis was affected by both diet and genotype as it was larger in WT but not in KO mice fed the LP test-meal (Figure 2B).

In brown adipose tissue (Table 3), mRNA expression was affected only by the protein content of the diet. mRNA coding for carnitine palmitoyltransferase a (CPT1a), CPT1b and uncoupling protein 2 (UCP2) were larger in LP fed mice and ACCa was decreased in HP fed mice. In line with these observations, in white adipose tissue, mRNA expression was also affected only by the protein content of the diet. LP diet intake was associated with an increase in mRNA encoding ACCa and FAS (Table 3). Taken together, these observations suggest a concomitant upregulation of lipogenesis, fatty acid

oxidation and energy expenditure in these two tissues. Interestingly, UCP3 was lower in KO mice fed the LP diet compared to WT mice (Figure 2C). In muscle, the LP diet also increases UCP2 mRNA (Table 3) but no effect of the diet or the genotype was observed on the expression of other genes (Supplemental table 2).

No effect of genotype or diet was observed on gene encoding protein involved in the control of food intake in the hypothalamus, nucleus accumbens, epithelial intestinal cells (Supplemental table 2).

1 **Discussion**

2 The purpose of this study was to better understand the role played by liver GCN2 in the adaptation of
3 energy metabolism to the protein content in the diet. To this end, wild-type mice and mice in which
4 GCN2 was deleted in the liver were fed during three weeks with low, normo- and high protein diets.
5 We observed that deletion of GCN2 did not lead to dramatic changes in energy metabolism and
6 feeding behavior whatever the protein content of the diet. Nevertheless, we observed that KO mice
7 exhibited globally lower fasting blood glucose levels and, when fed the LP test-meal, had a higher
8 increase in glucose oxidation and a higher decrease in lipid oxidation, and failed to induce FGF21
9 expression and secretion as did the WT mice. In addition, we observed that UCP3 expression in white
10 adipose tissue was also lower. The consumption of a low-protein diet was associated with huge
11 modifications in gene expression profile in muscle, liver and adipose tissue with an increase in gene
12 expression involved in lipogenesis, fatty acid oxidation and energy expenditure as reported previously
13 (Huang et al. 2013; Aparecida de França et al. 2009; Morrison et Laeger 2015). These processes
14 probably compensate each other and explain why despite a higher energy intake, mice fed the LP diet
15 did not exhibit strong difference in term of body composition with NP fed mice. On the contrary, we
16 observed that the increase in protein in the diet induced a decrease in food intake, which is consistent
17 with the literature (Morrison and Laeger, 2015). Moreover, HP diet intake was associated with a
18 decrease in adiposity consistent with the decrease in energy intake, an increase in ketogenesis in the
19 fed state and potentially an increase in neoglucogenesis as suggested by the upregulation of PEPCK
20 expression in the liver.

21 Laeger et al. have reported that general deletion of GCN2 in mice resulted in an inability to induce
22 FGF21 secretion in response to the intake of an amino-acid deficient diet (Laeger et al., 2014b). Our
23 results confirm this observation and go further by demonstrating the central role of hepatic GCN2 in
24 amino acid deficiency sensing. In addition, a previous study reported that FGF21 treatment in
25 cardiomyocytes in culture induced the expression of genes encoding UCP3 (Planavila et al., 2015). In
26 our study, we observed that UCP3 expression was downregulated in white adipose tissue of KO mice
27 fed the LP diet compared to WT mice, suggesting that the expression of UCP3 could be directly under
28 the control of FGF21.

29 Laeger et al. also reported that the higher food intake observed under low-protein diet was suppressed
30 in GCN2-KO and FGF21-KO mice (Laeger et al., 2014b). These results suggest that secreted FGF21
31 is responsible for the higher intake under low-protein diet. In our study, we observed that WT and KO
32 mice had exactly the same food intake under low-protein diet even if FGF21 secretion failed to be
33 induced in KO mice. Moreover, no change in gene expression encoding neuropeptides in
34 hypothalamus was observed. This brings us to hypothesize that this phenomenon may not be mediated
35 only by the GCN2 signaling pathway in liver but may involve another amino-acid deficiency sensing
36 pathway and/or other organs.

37 Our results surprisingly showed that the rates of glucose and lipid oxidation after ingestion of a NP or
38 HP test-meal were the same between wild-type and KO mice but, under LP diet, KO mice exhibited an
39 increase in glucose oxidation and a decrease in lipid oxidation.

40 We can hypothesize that, under NP and HP diets, amino acid content is sufficient and GCN2 is not
41 highly phosphorylated in wild-type mice. Therefore, KO mice exhibit a similar metabolic profile as
42 wild type mice and no difference can be observed in glucose and lipid oxidation rates between the two
43 types of mice. On the contrary, under LP diet, amino acid deficiency would induce GCN2
44 phosphorylation and activation in wild-type mice whereas in KO mice, there is logically no activity of
45 GCN2 and therefore a defective post-prandial metabolic fate of dietary carbohydrates and lipids.
46 These results suggest that GCN2 is involved in the post-meal shift from lipid to carbohydrate
47 oxidations under LP diet. This increase in glucose oxidation and decrease in lipid oxidation could be
48 mediated by FGF21. Indeed, WT but not KO mice exhibited a huge increase in FGF21 secretion after
49 refeeding. FGF21 is known to stimulate lipid oxidation (Samms et al., 2015) and could therefore
50 explain why lipid oxidation was maintained at a higher level in WT mice compared to KO mice during
51 the first hours following refeeding and according to the Randle's cycle why glucose oxidation was
52 lower (Randle et al. 1963).

53 In addition, Xu et al. have reported that in GCN2-KO mice the expression of phosphoenolpyruvate
54 carboxykinase (PEPCK), the rate-limiting enzyme involved in neoglucogenesis, is not repressed in the
55 postprandial state compared to wild type mice (Xu et al., 2013). Hepatic neo-synthesized glucose
56 could therefore be oxidized in peripheral tissues which could partially explain the increase in glucose

57 oxidation. Nevertheless, our experiments failed to show any difference in liver PEPCK expression
58 between wild-type and GCN2-KO liver specific mice. In this same study, Xu and al. reported that in
59 the fasting state, GCN2-KO mice showed lower blood glucose at 24 and 48 h after fasting and that
60 neoglucogenesis from exogenous pyruvate was less efficient in GCN2-KO mice was less efficient than
61 in WT mice. In line with these results we observed that fasting blood glucose was globally lower in
62 KO mice compared to WT mice.

63 In conclusion, the consequences of GCN2 deletion depend on the protein content of the diet.

64 Under low-protein diet, because of an amino acid deficiency, GCN2 is activated in wild-mice and, in
65 turn, induces FGF21 secretion which leads to changes in postprandial oxidation profile. On the
66 contrary, under normo or high protein diet, where amino acid is sufficient, no difference can be
67 noticed between wild-type and KO mice.

68

69 **Table 1:** Macronutrient composition of the HCD. Diets were prepared by the “atelier de préparation
70 des aliments”, UPAE, INRA, Jouy en Josas, France. Energy density is computed assuming a
71 metabolizable energy of 16.7 kJ/g for carbohydrates and proteins and 37.7 kJ/g for fat.

72

| | P20 | NP | LP | HP |
|------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Weight content (g/kg) | | | | |
| Milk proteins | 200 | 140 | 50 | 530 |
| Starch | 570 | 622 | 700 | 287 |
| Sucrose | 93 | 100 | 113 | 46 |
| Soy Oil | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Minerals | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Vitamins | 10 | 10 | 10 | 10 |
| cellulose | 50 | 50 | 50 | 50 |
| choline | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Energy content (%) | | | | |
| Protein | 20.5 | 14.5 | 5.2 | 54.6 |
| Carbohydrate | 68.5 | 75.0 | 84.0 | 34.9 |
| Fat | 10.5 | 10.5 | 10.5 | 10.5 |
| Energy density (kJ/g) | 14.57 | 14.56 | 14.54 | 14.60 |

Table 2: Body composition and food intake of WT and KO mice fed NP, LP or HP diets.

| Diet | NP | | LP | | HP | | Genotype | Test diet | Inter |
|------------------------------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|----------|-----------|-------|
| Genotype | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| Cumulative food intake (g) | 68.26 ± 3.16 | 70.93 ± 2.83 ^A | 93.64 ± 2.74 | 88.45 ± 3.16 ^B | 54.26 ± 2.58 | 52.37 ± 3.80 ^C | NS | <0.001 | NS |
| Initial Weight (g) | 21.83 ± 0.28 | 21.76 ± 0.58 | 21.87 ± 0.43 | 21.36 ± 0.54 | 22.21 ± 0.48 | 21.44 ± 0.49 | NS | NS | NS |
| Final Weight (g) | 23.17 ± 0.48 | 23.54 ± 0.55 | 22.07 ± 0.44 | 21.6 ± 0.61 | 22.51 ± 0.89 | 22.56 ± 0.79 | NS | NS | NS |
| Fat mass (g) | 1.91 ± 0.11 | 1.98 ± 0.16 ^A | 2.16 ± 0.16 | 1.97 ± 0.18 ^A | 1.1 ± 0.13 | 1.2 ± 0.14 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Epididymal adipose tissue (g) | 0.45 ± 0.03 | 0.47 ± 0.05 ^A | 0.47 ± 0.04 | 0.44 ± 0.05 ^A | 0.27 ± 0.04 | 0.29 ± 0.03 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Retroperitoneal adipose tissue (g) | 0.14 ± 0.02 | 0.15 ± 0.02 ^A | 0.2 ± 0.02 | 0.15 ± 0.02 ^A | 0.07 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Mesenteric adipose tissue (g) | 0.19 ± 0.01 | 0.21 ± 0.02 ^A | 0.2 ± 0.02 | 0.18 ± 0.03 ^A | 0.12 ± 0.01 | 0.12 ± 0.01 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Subcutaneous adipose tissue (g) | 1.04 ± 0.06 | 1.05 ± 0.08 ^A | 1.18 ± 0.1 | 1.1 ± 0.09 ^A | 0.58 ± 0.08 | 0.62 ± 0.09 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Hepatic triglycerides | 44.3 ± 6.94 | 43.42 ± 7.86 ^A | 52.57 ± 7 | 56.98 ± 7.21 ^A | 18.58 ± 2.68 | 26.25 ± 8.15 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Hepatic glycogen | 29.44 ± 2.5 | 34.3 ± 2.61 ^A | 38.96 ± 3.47 | 40.93 ± 3.55 ^B | 25.12 ± 4.34 | 20.97 ± 2.99 ^C | NS | <0.001 | NS |

^{A,B,C} Different letters within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, P<0.05).

Table 3. mRNA abundance in liver, brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue (WAT), muscle of WT and KO mice fed LP, NP or HP diets two hours after meal onset.

| Diet | | NP | | LP | | HP | | Genotype | Test diet | Interaction | |
|----------|--------|----------|-------------|---------------------------|-------------|---------------------------|-------------|---------------|-----------|-------------|-------|
| Genotype | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | | |
| Liver | FAS | 1 ± 0.27 | 1 ± 0.27 | ^A 0.61 ± 0.05 | 0.65 ± 0.14 | ^{AB} 0.48 ± 0.11 | 0.48 ± 0.08 | ^B | NS | <0.05 | NS |
| | ACCa | 1 ± 0.15 | 0.82 ± 0.13 | ^{AB} 0.96 ± 0.11 | 0.97 ± 0.07 | ^A 0.66 ± 0.12 | 0.71 ± 0.08 | ^B | NS | <0.05 | NS |
| | Elov16 | 1 ± 0.2 | 0.86 ± 0.12 | ^{AB} 1.01 ± 0.15 | 1.2 ± 0.17 | ^A 0.66 ± 0.16 | 0.5 ± 0.08 | ^B | NS | <0.01 | NS |
| | DGAT | 1 ± 0.12 | 1.11 ± 0.18 | ^A 1.4 ± 0.31 | 1.78 ± 0.19 | ^B 1.26 ± 0.25 | 1.31 ± 0.16 | ^{AB} | NS | <0.05 | NS |
| | GPAT | 1 ± 0.12 | 0.65 ± 0.04 | ^A 1.35 ± 0.21 | 1.62 ± 0.21 | ^B 0.64 ± 0.07 | 0.97 ± 0.17 | ^A | NS | <0.0001 | <0.05 |
| | LPL | 1 ± 0.15 | 2.12 ± 0.9 | ^A 5 ± 1.87 | 4.8 ± 1.62 | ^B 1.21 ± 0.22 | 1.52 ± 0.21 | ^A | NS | <0.05 | NS |
| | LDL | 1 ± 0.18 | 0.75 ± 0.11 | ^A 1.31 ± 0.17 | 1.55 ± 0.21 | ^B 0.69 ± 0.1 | 0.83 ± 0.18 | ^A | NS | <0.001 | NS |
| | PEPCK | 1 ± 0.44 | 0.86 ± 0.21 | ^A 1.07 ± 0.36 | 1.1 ± 0.31 | ^{AB} 1.88 ± 0.54 | 1.77 ± 0.31 | ^B | NS | <0.05 | NS |
| | G6PC1 | 1 ± 0.18 | 1.05 ± 0.28 | ^A 0.28 ± 0.06 | 0.62 ± 0.12 | ^B 0.91 ± 0.21 | 0.92 ± 0.15 | ^B | NS | <0.01 | NS |
| BAT | ACCa | 1 ± 0.14 | 0.94 ± 0.21 | ^A 1.25 ± 0.17 | 1.02 ± 0.16 | ^A 0.52 ± 0.07 | 0.49 ± 0.09 | ^B | NS | <0.001 | NS |
| | CPT1a | 1 ± 0.35 | 0.8 ± 0.09 | ^A 1.86 ± 0.35 | 1.55 ± 0.3 | ^B 0.82 ± 0.15 | 1.06 ± 0.26 | ^A | NS | <0.01 | NS |
| | CPT1b | 1 ± 0.13 | 1.4 ± 0.25 | ^A 2.09 ± 0.31 | 1.44 ± 0.11 | ^B 1.45 ± 0.18 | 1.62 ± 0.19 | ^{AB} | NS | <0.05 | NS |
| | UCP2 | 1 ± 0.14 | 0.59 ± 0.11 | ^A 1.57 ± 0.26 | 1.63 ± 0.17 | ^B 0.68 ± 0.09 | 0.92 ± 0.23 | ^A | NS | <0.0001 | NS |
| WAT | ACC | 1 ± 0.12 | 1.13 ± 0.19 | ^A 1.94 ± 0.21 | 1.67 ± 0.19 | ^B 0.78 ± 0.15 | 1.49 ± 0.61 | ^A | NS | <0.0001 | NS |
| | FAS | 1 ± 0.21 | 1.24 ± 0.17 | ^A 3.05 ± 0.69 | 2 ± 0.41 | ^B 0.85 ± 0.33 | 2.7 ± 1.87 | ^A | NS | <0.01 | NS |
| Muscle | UCP2 | 1 ± 0.2 | 1.68 ± 0.5 | ^A 1.86 ± 0.38 | 2.01 ± 0.22 | ^B 1.14 ± 0.08 | 1.84 ± 0.54 | ^{AB} | NS | <0.001 | NS |

^{A,B,C} Different letters within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, P<0.05).

Figure 1: Meal-induced changes in glucose and lipid oxidation following the ingestion of a test-meal. A: Glucose and lipid oxidation in WT and KO mice fed the NP diet. Fasted mice were fed at 9:00 (T=0) with 1 g of NP diet. Data are mean \pm SEM (n =6-8). B: Glucose and lipid oxidation in WT and KO mice fed the LP diet. Fasted mice were fed at 9:00 (T=0) with 1 g of LP diet. Data are mean \pm SEM (n =6-8). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice. C: Glucose and lipid oxidation in WT and KO mice fed the HP diet. Fasted mice were fed at 9:00 (T=0) with 1 g of HP diet. Data are mean \pm SEM (n =6-8).

Figure 2: FGF21 concentration and FGF21 and UCP3 gene expressions A: Modulation of FGF21 protein abundance in the plasma in the fasting state and two hours after meal onset Data are mean \pm SEM (n =7-9). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO within the same diet. B: Modulation of FGF21 mRNA abundance in the liver of mice two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-9). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet. C Modulation of UCP3 mRNA abundance in the white adipose tissue (WAT) of mice two hours after meal onset. Data are mean \pm SEM (n =7-9). *, P < 0.05 significant difference between WT and KO mice within the same diet..

Figure 1

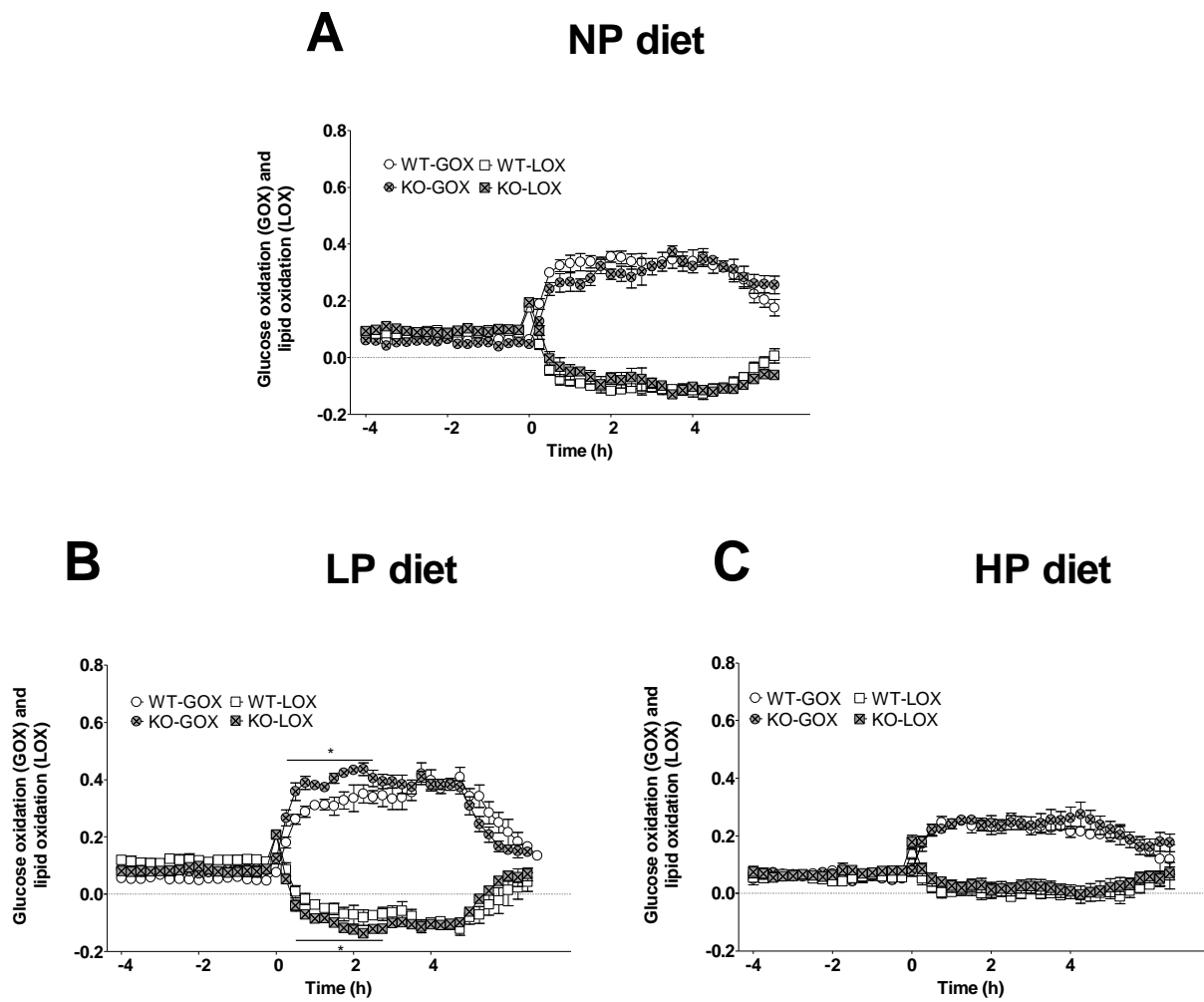
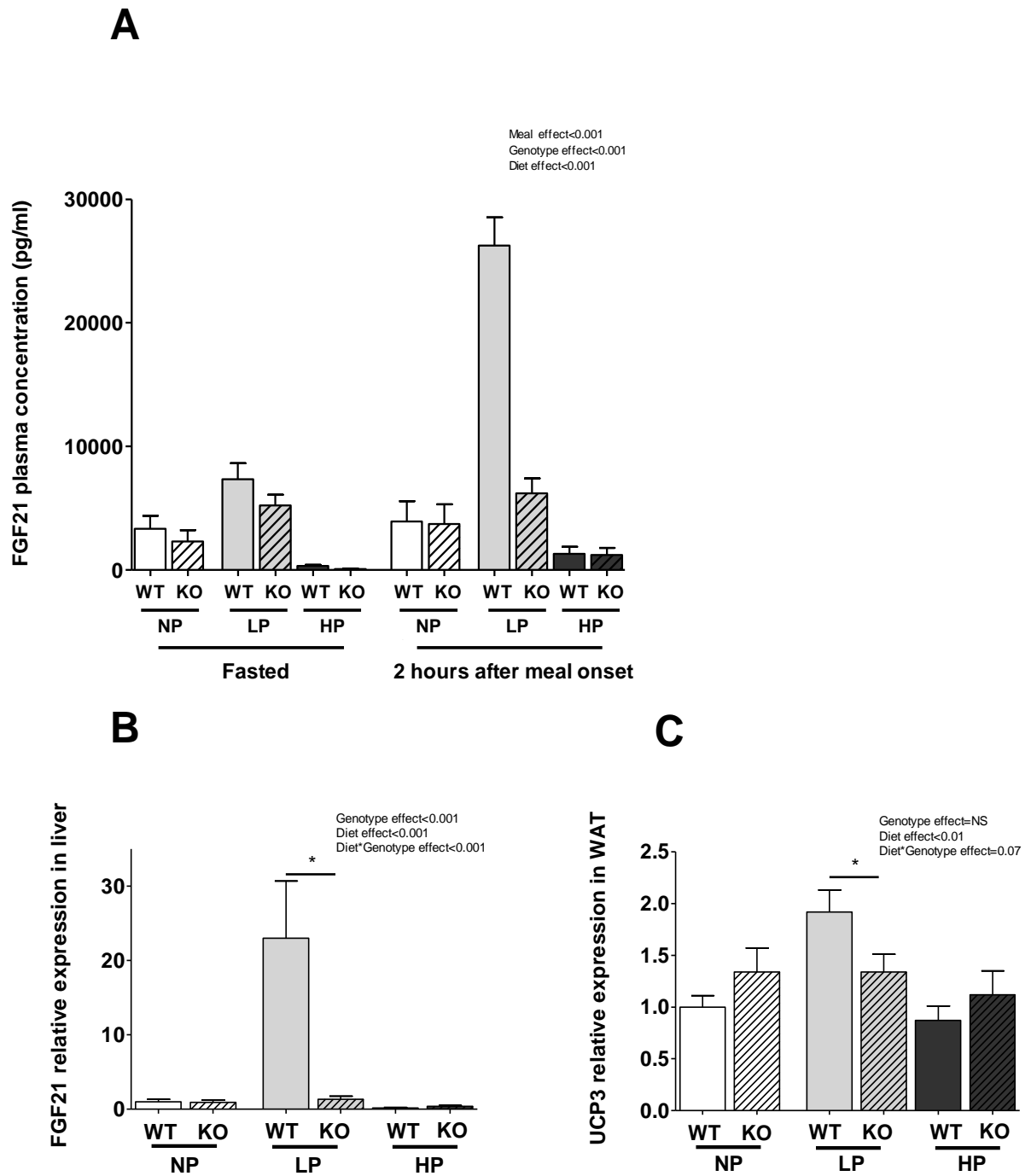


Figure 2



Supplemental table 1: Urinary and plasma Metabolite profile of WT and KO mice fed LP, NP or HP diets two and four hours after meal onset

| Diet | | NP | | LP | | HP | | Genotype | Test diet | Interaction |
|----------------------------------|--------|-------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|---------------------------|----------|-----------|-------------|
| Genotype | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| Plasma Urea (mmol/l) | Fasted | 17 ± 2.21 | 15.21 ± 2.6 ^A | 19.78 ± 2.62 | 13.89 ± 1.74 ^A | 30.06 ± 4.62 | 27.71 ± 4.18 ^B | NS | <0.0001 | NS |
| | 2h | 30 ± 3.76 | 34.18 ± 3.88 ^A | 31.31 ± 3.52 | 22.08 ± 3.53 ^A | 54.91 ± 6.13 | 58.79 ± 9.53 ^B | NS | <0.0001 | NS |
| Plasma NEFA (mmol/l) | Fasted | 1.77 ± 0.27 | 1.92 ± 0.54 | 2.31 ± 0.44 | 3.29 ± 0.59 | 1.73 ± 0.23 | 1.95 ± 0.32 | NS | NS | NS |
| | 2h | 0.77 ± 0.18 | 0.75 ± 0.29 | 0.6 ± 0.12 | 0.6 ± 0.19 | 0.48 ± 0.1 | 0.44 ± 0.16 | NS | NS | NS |
| Plasma Chol (mmol/l) | Fasted | 5.49 ± 0.84 | 4.84 ± 1.06 | 5.46 ± 1.13 | 4.5 ± 0.72 | 6.16 ± 0.75 | 5.47 ± 1.21 | NS | NS | NS |
| | 2h | 4.98 ± 1.02 | 5.28 ± 0.87 | 4.38 ± 0.63 | 4.18 ± 0.83 | 4.06 ± 0.58 | 3.88 ± 0.77 | NS | NS | NS |
| Plasma Trig (mmol/l) | Fasted | 2.43 ± 0.37 | 1.91 ± 0.48 | 2.6 ± 0.42 | 2.52 ± 0.35 | 1.9 ± 0.2 | 2 ± 0.43 | NS | NS | NS |
| | 2h | 1.74 ± 0.29 | 2.02 ± 0.32 | 2.11 ± 0.2 | 2.12 ± 0.33 | 1.63 ± 0.23 | 1.89 ± 0.38 | NS | NS | NS |
| Plasma HDL (mmol/l) | Fasted | 4.13 ± 0.6 | 3.54 ± 0.76 | 3.82 ± 0.65 | 3.17 ± 0.53 | 4.6 ± 0.55 | 4.08 ± 0.87 | NS | NS | NS |
| | 2h | 3.76 ± 0.77 | 4.3 ± 0.69 | 3.28 ± 0.46 | 3.1 ± 0.58 | 3.19 ± 0.41 | 3.04 ± 0.66 | NS | NS | NS |
| Plasma β-hydroxybutrate (mmol/l) | Fasted | 1.1 ± 0.14 | 1.07 ± 0.3 ^{AB} | 1.94 ± 0.54 | 1.89 ± 0.46 ^A | 0.89 ± 0.16 | 0.83 ± 0.17 ^B | NS | <0.01 | NS |
| | 2h | 0.22 ± 0.05 | 0.33 ± 0.05 ^A | 0.33 ± 0.05 | 0.30 ± 0.08 ^A | 0.51 ± 0.07 | 0.52 ± 0.09 ^B | NS | <0.01 | NS |
| Plasma insulin | Fasted | 0.19 ± 0.05 | 0.22 ± 0.07 | 0.39 ± 0.23 | 0.33 ± 0.05 | 0.19 ± 0.04 | 0.23 ± 0.07 | NS | NS | NS |
| | 2h | 1.51 ± 0.36 | 1.9 ± 0.52 | 0.94 ± 0.23 | 1.44 ± 0.45 | 2.58 ± 0.88 | 2.64 ± 0.8 | NS | NS | NS |

^{A,B,C} Different letters within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, P<0.05).

Supplemental table 2: mRNA abundance in liver, muscle, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), hypothalamus, nucleus accumbens (NACC), ileum, duodenum, jejunum of WT and KO mice fed LP, NP or HP diets two hours after meal onset

| Diet | | NP | | LP | | HP | | Genotype | Test diet | Interaction |
|--------------|-----------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|-----------|-------------|
| Genotype | | WT | KO | WT | KO | WT | KO | | | |
| Liver | Cpt1a | 1 ± 0.28 | 2.42 ± 1.55 | 1.06 ± 0.24 | 1.06 ± 0.21 | 1.25 ± 0.34 | 0.69 ± 0.22 | NS | NS | NS |
| | KETO | 1 ± 0.18 | 0.93 ± 0.16 | 0.95 ± 0.19 | 1.1 ± 0.11 | 0.64 ± 0.16 | 0.9 ± 0.09 | NS | NS | NS |
| | HMG lyase | 1 ± 0.2 | 0.97 ± 0.13 | 1.34 ± 0.13 | 1.34 ± 0.22 | 0.7 ± 0.13 | 1.13 ± 0.2 | NS | NS | NS |
| | LPK | 1 ± 0.17 | 0.95 ± 0.2 | 0.6 ± 0.08 | 0.63 ± 0.12 | 0.74 ± 0.27 | 0.47 ± 0.05 | NS | <0.05 | NS |
| Muscle | ACC | 1 ± 0.2 | 1.17 ± 0.26 | 0.95 ± 0.17 | 1.11 ± 0.11 | 1.04 ± 0.13 | 1.28 ± 0.3 | NS | NS | NS |
| | CD36 | 1 ± 0.39 | 1.19 ± 0.24 | 1.06 ± 0.23 | 1.06 ± 0.09 | 1.07 ± 0.14 | 1.24 ± 0.27 | NS | NS | NS |
| | CPT1b | 1 ± 0.16 | 1.57 ± 0.34 | 1.12 ± 0.28 | 1.04 ± 0.1 | 1.28 ± 0.17 | 1.32 ± 0.36 | NS | NS | NS |
| | FAS | 1 ± 0.31 | 0.72 ± 0.17 | 0.81 ± 0.23 | 0.95 ± 0.2 | 0.61 ± 0.07 | 0.94 ± 0.18 | NS | NS | NS |
| | HK2 | 1 ± 0.22 | 1.22 ± 0.27 | 0.92 ± 0.19 | 0.91 ± 0.1 | 0.99 ± 0.14 | 0.94 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| | LDL | 1 ± 0.28 | 1.2 ± 0.28 | 1.11 ± 0.32 | 0.93 ± 0.15 | 1.1 ± 0.23 | 1.02 ± 0.18 | NS | NS | NS |
| | UCP3 | 1 ± 0.21 | 1.61 ± 0.27 | 1.34 ± 0.33 | 1.64 ± 0.13 | 1.2 ± 0.17 | 1.5 ± 0.54 | NS | NS | NS |
| WAT | GPAT | 1 ± 0.23 | 0.88 ± 0.19 | 1.14 ± 0.21 | 1.22 ± 0.29 | 1.21 ± 0.24 | 1.27 ± 0.27 | NS | NS | NS |
| | CD36 | 1 ± 0.27 | 0.83 ± 0.1 | 1.09 ± 0.09 | 0.9 ± 0.13 | 0.71 ± 0.12 | 0.7 ± 0.12 | NS | NS | NS |
| | HSL | 1 ± 0.24 | 1.02 ± 0.26 | 1.88 ± 0.43 | 1.31 ± 0.44 | 0.98 ± 0.32 | 0.99 ± 0.4 | NS | NS | NS |
| | Sirt1 | 1 ± 0.18 | 0.97 ± 0.08 | 1.24 ± 0.17 | 0.89 ± 0.1 | 1.11 ± 0.17 | 0.92 ± 0.2 | NS | NS | NS |
| | UCP2 | 1 ± 0.23 | 1.11 ± 0.23 | 1.36 ± 0.23 | 1.26 ± 0.29 | 0.96 ± 0.18 | 1 ± 0.29 | NS | NS | NS |
| | GPAT | 1 ± 0.23 | 0.88 ± 0.19 | 1.14 ± 0.21 | 1.22 ± 0.29 | 1.21 ± 0.24 | 1.27 ± 0.27 | NS | NS | NS |
| BAT | ACCb | 1 ± 0.15 | 1 ± 0.14 | 1.29 ± 0.2 | 1.1 ± 0.23 | 0.81 ± 0.19 | 0.89 ± 0.15 | NS | NS | NS |
| | GLUT1 | 1 ± 0.09 | 1.64 ± 0.28 | 1.8 ± 0.27 | 1.45 ± 0.19 | 1.64 ± 0.2 | 1.64 ± 0.2 | NS | NS | NS |
| | HSL | 1 ± 0.16 | 1.01 ± 0.19 | 1.25 ± 0.24 | 1.35 ± 0.14 | 1.35 ± 0.15 | 0.83 ± 0.12 | NS | NS | NS |
| | UCP1 | 1 ± 0.44 | 1 ± 0.19 | 1.35 ± 0.27 | 0.79 ± 0.13 | 1.08 ± 0.21 | 1.38 ± 0.46 | NS | NS | NS |
| | UCP3 | 1 ± 0.38 | 1.13 ± 0.16 | 1.77 ± 0.35 | 1.63 ± 0.32 | 1.46 ± 0.19 | 1.26 ± 0.19 | NS | NS | NS |
| | ACCb | 1 ± 0.15 | 1 ± 0.14 | 1.29 ± 0.2 | 1.1 ± 0.23 | 0.81 ± 0.19 | 0.89 ± 0.15 | NS | NS | NS |
| Hypothalamus | CRH | 1 ± 0.26 | 0.84 ± 0.07 | 1.24 ± 0.4 | 1.31 ± 0.17 | 1.14 ± 0.23 | 1.55 ± 0.15 | NS | NS | NS |

| | | | | | | | | | | |
|---------|------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----|----|----|
| | MC4R | 1 ± 0.21 | 0.87 ± 0.1 | 1.36 ± 0.33 | 1.11 ± 0.17 | 1.11 ± 0.1 | 1.06 ± 0.2 | NS | NS | NS |
| | NPY | 1 ± 0.16 | 1.01 ± 0.13 | 0.97 ± 0.11 | 0.92 ± 0.11 | 1.14 ± 0.16 | 1.07 ± 0.26 | NS | NS | NS |
| | POMC | 1 ± 0.23 | 1.07 ± 0.17 | 0.88 ± 0.11 | 1.09 ± 0.15 | 1.16 ± 0.31 | 1.38 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| | AGRP | 1 ± 0.15 | 1.31 ± 0.3 | 1.06 ± 0.14 | 1.1 ± 0.36 | 1.3 ± 0.15 | 1.4 ± 0.3 | NS | NS | NS |
| | CART | 1 ± 0.43 | 0.77 ± 0.1 | 1.51 ± 0.53 | 0.85 ± 0.14 | 0.96 ± 0.15 | 0.96 ± 0.12 | NS | NS | NS |
| | Y5R | 1 ± 0.06 | 0.9 ± 0.11 | 0.94 ± 0.15 | 0.77 ± 0.09 | 0.86 ± 0.11 | 0.79 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| | MOR | 1 ± 0.12 | 0.98 ± 0.11 | 1.04 ± 0.27 | 0.88 ± 0.29 | 1.70 ± 0.16 | 1.14 ± 0.23 | NS | NS | NS |
| | Y2R | 1 ± 0.13 | 0.66 ± 0.15 | 0.87 ± 0.14 | 0.87 ± 0.16 | 0.71 ± 0.12 | 1.03 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| NACC | DOR | 1 ± 0.12 | 1.25 ± 0.26 | 1.2 ± 0.19 | 0.84 ± 0.1 | 0.92 ± 0.08 | 0.85 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| | KOR | 1 ± 0.18 | 1.49 ± 0.33 | 1.16 ± 0.17 | 0.75 ± 0.12 | 1.1 ± 0.13 | 1.01 ± 0.15 | NS | NS | NS |
| | MOR | 1 ± 0.19 | 1.29 ± 0.26 | 1.33 ± 0.25 | 0.98 ± 0.19 | 1.19 ± 0.15 | 1.22 ± 0.1 | NS | NS | NS |
| | DR1 | 1 ± 0.17 | 0.96 ± 0.15 | 1.21 ± 0.18 | 0.83 ± 0.18 | 1.02 ± 0.08 | 0.88 ± 0.21 | NS | NS | NS |
| | DR2 | 1 ± 0.18 | 0.97 ± 0.17 | 1.15 ± 0.18 | 0.76 ± 0.17 | 1.13 ± 0.13 | 0.83 ± 0.18 | NS | NS | NS |
| | CB1 | 1 ± 0.09 | 1.05 ± 0.14 | 1.08 ± 0.14 | 0.82 ± 0.09 | 1.07 ± 0.12 | 0.87 ± 0.13 | NS | NS | NS |
| | DOR | 1 ± 0.12 | 1.25 ± 0.26 | 1.2 ± 0.19 | 0.84 ± 0.1 | 0.92 ± 0.08 | 0.85 ± 0.14 | NS | NS | NS |
| | MOR | 1 ± 0.19 | 1.29 ± 0.26 | 1.33 ± 0.25 | 0.98 ± 0.19 | 1.19 ± 0.15 | 1.22 ± 0.1 | NS | NS | NS |
| Ileum | PYY | 1 ± 0.13 | 0.71 ± 0.05 | 0.93 ± 0.14 | 0.75 ± 0.07 | 1.09 ± 0.19 | 1.43 ± 0.34 | NS | NS | NS |
| | GLP1 | 1 ± 0.13 | 0.93 ± 0.06 | 1.14 ± 0.29 | 0.81 ± 0.13 | 0.95 ± 0.14 | 1.16 ± 0.15 | NS | NS | NS |
| Jejunum | PYY | 1 ± 0.15 | 1.44 ± 0.19 | 1.38 ± 0.3 | 1.36 ± 0.22 | 1.3 ± 0.18 | 1.42 ± 0.3 | NS | NS | NS |
| | GLP1 | 1 ± 0.14 | 0.78 ± 0.11 | 0.95 ± 0.15 | 0.89 ± 0.11 | 0.81 ± 0.1 | 0.74 ± 0.13 | NS | NS | NS |

3.4 Article IV : L'intensité de la synthèse protéique en période postprandiale est modulée par le niveau d'apport en protéines mais n'implique pas les kinases GCN2 et AMPK

(Protein synthesis rate in the postprandial period is modulated by dietary protein intake but does not involve the kinases AMPK and GCN2)

3.4.1 Contexte :

La protéolyse et la synthèse protéique sont deux processus finement contrôlés permettant le turnover des protéines dans l'organisme. Des paramètres nutritionnels comme la quantité de protéines ont un impact sur l'intensité de ces mécanismes. Ainsi, il a été montré qu'un régime faible en protéines décroît la synthèse protéique dans le muscle et dans le foie. L'effet des régimes hyperprotéiques est plus contrasté et dépend de la dose et de l'organe considéré. La protéolyse, quant à elle, semble diminuer sous les deux types de régime. L'AMPK et GCN2 sont des protéines kinases impliquées dans le contrôle de la synthèse protéique et de la protéolyse et dont les activités sont modulées par la quantité de protéines dans le régime. Le rôle de ces protéines kinases, notamment au niveau du foie, dans le contrôle de ces deux processus en réponse aux modulations de la teneur en protéines du régime reste à déterminer.

3.4.2 Objectif :

Notre étude cherche à définir le rôle de ces protéines kinases dans l'adaptation du métabolisme protéique en réponse à la variation de la teneur en protéines du régime.

3.4.3 Méthodes :

Des souris sauvages (WT-GCN2 et WT-AMPK), des souris KO GCN2-foie spécifique (KO-GCN2) et des souris AMPK-foie spécifique (KO-AMPK) mâles ont été séparées en 3 groupes nourris pendant 3 semaines avec des régimes contenant une teneur en protéines faible (LP) normale (NP) ou haute (HP). Le poids et la prise alimentaire ont été suivis. A la fin de l'expérimentation, après 16h de jeûne, les souris ont été nourries avec un repas calibré de 1 g. 1h40 après le début de leur repas, de la ¹³C-valine (150 µmol/100 g poids corporel) a été injecté en intrapéritonéal. Vingt minutes plus tard, les souris ont été euthanasiées, le foie et les quadriceps ont été prélevés afin d'étudier leur poids et leur composition, les taux de synthèse protéique fractionnaire et absolu et l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse. Des lobes de foie ont également été congelés immédiatement afin de mesurer la concentration et la phosphorylation de protéines impliquées dans le contrôle de la traduction protéique.

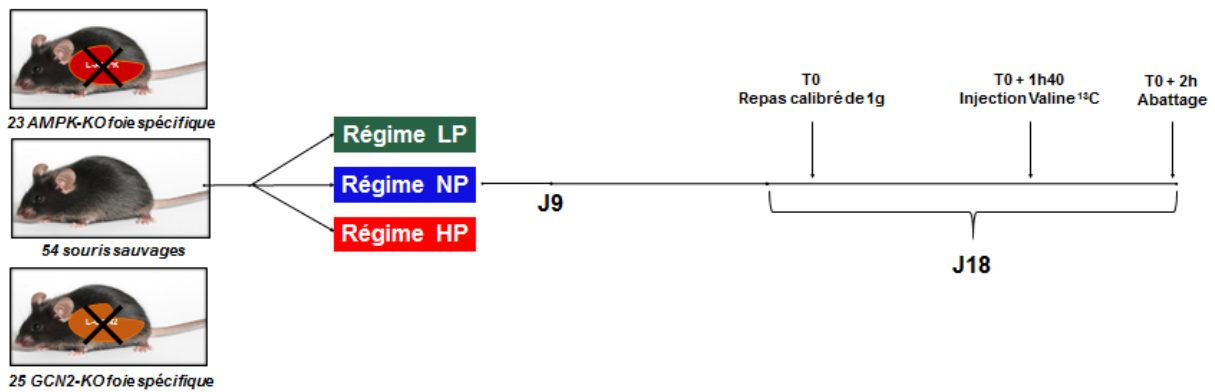


Figure 21: Schéma expérimental utilisé dans l'article IV

Les souris ont été nourries pendant 18 jours sous régime sous régime faible (LP), normal (NP) ou fort (HP) en protéines. A la fin de l'expérimentation, après 16h de jeûne, les souris ont été nourries avec un repas calibré de 1 g. 1h40 après le début de leur repas, de la ¹³C-valine (150 μ mol/100 g poids corporel) a été injecté en intrapéritonéal. Vingt minutes plus tard, les souris ont été euthanasiées, le foie et les quadriceps ont été prélevés afin d'effectuer des mesures de synthèse protéique et d'expression des gènes impliqués dans la protéolyse.

3.4.4 Résultats principaux :

L'augmentation des protéines dans le régime est accompagnée d'une baisse de la prise alimentaire. Les souris nourries en régime NP ont un poids légèrement plus important que les souris nourries en régime LP ou HP. Tandis que le poids et la concentration en protéines du muscle ne sont pas affectés par le régime ou le génotype, nous avons observé que ceux du foie augmentaient en parallèle de la hausse en protéines alimentaires. Les résultats ont également montré que le taux de synthèse protéique fractionnaire était diminué de l'ordre de 30% chez les souris nourries en régime HP par rapport à celle nourries en régime contrôle. Tandis que rien n'est observé dans l'expérimentation ayant recours aux souris AMPK, celle avec les souris GCN2, montre que le foie de ces souris est sensible à la baisse en protéines du régime. En effet ces dernières présentent une baisse des taux de synthèse protéique hépatique sous régime LP. Aucun impact du génotype n'est observé sur les taux de synthèse dans le foie. De même, le taux de synthèse protéique dans le muscle reste insensible au génotype mais également au contenu en protéines du régime. L'expression des gènes impliqués dans la protéolyse ne sont pas affectées dans le muscle ou le foie par la délétion de l'AMPK ou de GCN2 ou le contenu en protéines en protéines du régime à l'exception des souris de l'expérimentation GCN2 qui présente une augmentation de l'expression de la Cathepsine D sous régime LP.

3.4.5 Conclusion :

Notre étude montre que la modulation du contenu en protéines du régime a peu d'effet sur l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse mais affectent les taux de synthèse protéique dans le foie. Par ailleurs, en période postprandiale, l'AMPK et GCN2, du fait de l'abondance en nutriments qui inhibe probablement leur activité, ne semblent pas jouer un rôle sur l'intensité de la synthèse protéique dans le foie et en périphérie dans le muscle.

3.4.6 Manuscrit :

Le manuscrit a été rédigé. Les western-blots sont encore à finaliser et à intégrer dans le manuscrit.

Protein synthesis rate in the postprandial period is modulated by dietary protein intake but does not involve the kinases AMPK and GCN2

Tristan Chalvon-Demersay¹, Claire Gaudichon¹, Patrick C. Even¹, Nadezda Khodorova¹, Julien Piedcoq¹, Benoit Viollet^{2,3,4}, Anne-Catherine Maurin⁵, Daniel Tomé¹, Marc Foretz^{2,3,4}, Pierre Fafournoux⁵ and Dalila Azzout-Marniche¹

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

²Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

³Cnrs, UMR8104, Paris, France

⁴Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

⁵UMR 1019 Nutrition Humaine, INRA, Université Clermont 1, Centre de Clermont-Ferrand-Theix, 63122 Saint Gene sur Champanelle, France

Introduction

Protein synthesis and proteolysis are two highly controlled processes that guarantee protein turnover in the body. Amino acid availability is one of the main parameters which influences the intensity of these two processes. Indeed, studies have reported that feeding a low-protein diet decreases protein synthesis in the muscle (Batistela et al., 2014; dos Santos et al., 2016), in the liver, in intestine and in the skin (Wykes et al., 1996). Increasing protein to a certain extent can stimulate protein synthesis, Yoshizawa et al. have shown that the presence of 20% protein in the diet can stimulate the protein by 40% in the muscle and in the liver in comparison with a protein-free diet (Yoshizawa et al., 1998). Similarly, it has been shown that increasing the amount of protein in the diet 12.7 to 20.7% increases protein synthesis in the liver, kidney, pancreas and muscle in piglets (Deng et al., 2009). However, the effects of high-protein diets on protein synthesis are more controversial. Some studies have shown that high protein diets had no effect on muscle protein synthesis (Chevalier et al., 2009; Frank et al., 2005; Harber et al., 2005; Laurent et al., 1984) or could decrease protein synthesis in the muscle (Masanes et al., 1999; Taillandier et al., 1996). Additionally, paradoxical effects were reported in the kidney, in the liver (Chevalier et al., 2009, 2010). Concerning proteolysis, both low (Batistela et al., 2014; dos Santos et al., 2016) and high protein diets (Chevalier et al., 2009; Chotechuang et al., 2011) decrease the activity of ubiquitin-proteasome, cathepsin and caspase systems in rodents. However, low-protein diet is also associated with an increase in autophagy process in the liver (Henagan et al., 2016).

The two kinases AMPK (AMP-activated kinase) and GCN2 (general control non-derepressible 2) are involved in the control of protein synthesis and proteolysis. General control nonderepressible 2 (GCN2) is a serine/threonine kinase which was first identified to play a major role in sensing amino acid deficiency. When the availability of one or several amino acid decreases, GCN2, in turn, phosphorylates the eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) which leads to the blockade of translation initiation and protein synthesis. (Dever and Hinnebusch, 2005). Recent work has also reported that GCN2 plays an essential role in autophagy during amino acid deficiency (B'chir et al., 2013).

AMP-activated kinase is an enzyme that plays a role of energy sensor within the cell, when energy availability decreases, it activates catabolic processes that produces ATP such as glycolysis, fatty acid

oxidation and deactivates anabolic processes consuming ATP among which protein synthesis (Foretz et al., 2006).

The action of AMPK on protein synthesis could act through the inhibition of mTOR activity. Indeed, AMPK can phosphorylate and activate the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), a protein that forms a complex with TSC1 and stimulates the GTPase activity of Rheb. This results in the conversion of Rheb-GTP to its inactive form Rheb-GDP which is no longer able to activate mTOR (Luo et al., 2005). Furthermore, proteomic approaches showed that AMPK is able to phosphorylate directly Raptor, a protein associated with mTOR on two serine residues and in turns inhibit its activity (Gwinn et al., 2008). Meley et al. have reported that inhibition of AMPK almost completely inhibited autophagy suggesting that AMPK is indispensable in autophagic proteolysis (Meley et al., 2006).

However, the role of these two kinases, especially in the liver, in the control of protein synthesis and proteolysis in response to the variation of the protein content of the diet remain to be determined.

In order to evaluate the contribution of liver AMPK and GCN2 on the adaptation of protein synthesis to protein intake modulation, wild-type mice and genetically modified mice where the expression of AMPK or GCN2 in the liver is deleted, were fed diet differing in their relative protein to carbohydrate content and different parameters related to protein synthesis and metabolism were examined in the liver and in the muscle.

Experimental procedure

The study was approved by the French National Animal Care Committee (number 14-15) and conformed to the European legislation on the use of laboratory animals.

Animals

Generation of knock-out liver specific C57BL/6 mice was performed by crossing albumin-Cre mice with mice containing floxed AMPK $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits for AMPK-KO liver specific mice and floxed GCN2 for GCN2 liver specific mice. Specific deletions were confirmed using genotyping and Western blots techniques.

102 males, 27 wild-type AMPK mice (WT-AMPK) and 23 AMPK-KO liver specific mice (KO-AMPK) and 27 wild-type GCN2 mice (WT-GCN2) and 25 GCN2-KO liver specific mice (KO-GCN2), were generated in the light and temperature-controlled animal facility of AgroParisTech (12:12 h reversed light/dark cycle, lights on at 21:00, 24°C). Spawners were fed the P20 diet throughout the test. Young mice were separated from their mother at the age of 25 days and placed in single cage. Then, they were fed for three weeks on a normo-protein diet (NP) as a run-in prior to the test. Mice were then either kept on the same diet or switched on low-protein (LP) or high-protein (HP) diet during another three week period constituting the test-period. Diet compositions are detailed in Supplemental Table 1.

Study Design

At the end of the test-period, after one night fasting, mice were fed 1g of their test-diet at in the morning and returned to their home cage. One hour and forty minutes later, mice were injected i.p. with ^{13}C -valine (150 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ body weight). Twenty minutes later, they were killed with an overdose of pentobarbital (50mg/kg).

Samples of liver, quadriceps muscle were frozen directly at -80°C for further protein synthesis rate measurement. Samples of liver and quadriceps muscle were placed in TRIzol (Invitrogen) and frozen at -80°C for PCR. Additional liver samples were freeze-clamped for Western-blot analysis.

Measurements of *in vivo* protein synthesis

Protein content (P_{content}) was estimated from total nitrogen content on lyophilized samples of liver, quadriceps muscle using an elemental analyzer (Vario Micro Cube, Elementar, Lyon, France) and

atropine as standard. The ^{13}C -valine enrichments in free and protein-bound amino acids in liver and quadriceps muscle were determined as previously described (Chevalier et al., 2009). Briefly, after homogenization in liquid nitrogen, the tissue was deproteinised with 10 % 5-sulfosalicylic acid solution. The supernatant was collected for the determination of the ^{13}C -valine enrichment in free amino acids and the protein pellet was hydrolyzed (6M HCl at 110 °C for 48h) to obtain individual amino acids from protein. Free and protein-bound amino acids were purified through cation-exchange resin (AG 50X8, 100-200 mesh, BioRad) using 4M NH_4OH as elution solution. Free amino acids were analyzed as tert-butyldimethylsilyl derivatives by GC/MS using a GC 6890N gas chromatograph coupled to a MS 5973N (Agilent Technologies) operated in selective ion monitoring mode (ions at m/z 288 and 289) after electron impact ionization at 70 eV, as previously described in Matthews (Matthews et al., 1982). Protein-bound amino acids were analyzed after N-acetylpropyl derivatization (Corr et al., 2007) by gas chromatography–combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) using a GC 7890B (Agilent Technologies) coupled *via* GC5 interface with an IRMS (Isoprime, Manchester, UK) The fractional protein synthesis rate (FSR, %/d) in tissues was calculated according to the following formula:

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

where $E_{\text{protein-bound valine}}$ and $E_{\text{free valine}}$ are the protein-bound and free ^{13}C valine enrichments in the tissues and t_{inc} is the incorporation time of ^{13}C -valine.

The absolute synthesis rate (ASR, g/d) was determined as $\text{ASR} = \text{FSR} \times P$, where P is tissue total protein content.

RNA preparation and gene expression measurement

RNA preparation and gene expression measurement in the liver and in muscle followed the same protocol described previously in (Chalvon-Demersay et al., 2016)

We measured the expression of genes involved in proteolysis: cathepsin D and ubiquitin. Primers for

cathepsin D are Forward : 5'-CGGAGGAGAACTATTGCTTGGT-3'

and Reverse : 5'-TGCACAGGGTCAGCTCATTG-3'

and for ubiquitin Forward : 5'-AACGCAGTTATATTTGGACCAGAAG-3'

and Reverse : 5'ACGGTTGGTGGTTTATTTGGAT-3'

Data are expressed as a relatively to the values of the WT mice fed the NP diet.

Western-Blot analysis

Briefly, frozen liver samples (100 mg) were homogenized in a lysis buffer. After homogenization, samples were then sonicated and protein concentration was determined in the supernatant using the DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories). An equivalent of 50 µg of protein from liver was deposited and resolved. After electrophoresis, the proteins were transferred two hours at 4°C to a nitrocellulose membrane (0.2 µm, Bio-Rad Laboratories). The membrane was then blocked and incubated with the primary antibody was performed overnight at 4°C. The primary antibodies (dilution 1/1,000) used were the anti-phospho-AMPK (Thr172) catalytic subunit, the anti-AMPK catalytic subunit, At the end of incubation, the blots were washed extensively at room temperature and incubated with a secondary antibody and anti-actine antibody conjugated to horseradish peroxidase (1/2,000; Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours at room temperature. After further washing, the blots were developed using Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories). For more details, please refer to (Chalvon-Demersay et al., 2016).

Statistical analysis

Data are presented as means ± SEM. The effect of the diets and genotype was tested by two-way ANOVA with interaction using R. Pairwise comparisons were performed with Post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, p-values were multiplied by the number of comparisons performed. Differences were considered significant at P <0.05.

Results

Strong differences in the tissue weights, protein synthesis rates between WT-AMPK and WT-GCN2 prevented us from pooling these two control groups. The experiments using KO-AMPK mice and GCN2 mice were then treated separately.

Food intake, body weight, tissue mass and composition

Cumulative food intake was decreased with the increase in protein content of the diet in the two experiments so that food intake of LP fed mice was 1.8 fold the one of HP fed mice (Table 1).

Cumulative food intake was higher in KO-AMPK compared to WT mice under NP diet while GCN2 deletion had no effect on food intake no matter the protein content of the diet.

Final body weight was affected by the protein content of the diet but was not related to food intake. Indeed, mice fed the NP diet weighed more than HP and LP fed mice even though this was statistically significant only in the AMPK experiment (Table 1). Interestingly, final body weight and liver mass were decreased in KO-AMPK mice compared to WT-AMPK mice.

In the two experiments, weight and protein concentration in liver were increased in parallel with the increase in protein content of the diet whereas weight and protein in muscle was not affected nor by the protein content nor by genotype (Table 1).

Tissue protein synthesis rates

It is important to recall that before euthanasia, mice were all fed a calibrated meal of 1g, in order to overcome the differences on food intake that could have impacted protein synthesis rates. It is important to recall that before euthanasia, mice were all fed a calibrated meal of 1g. We also made sure that the pellet was ingested within 30 minutes after meal onset. Fractional synthesis rate are more than ten times higher in the liver than in the muscle which is consistent with what was previously reported in the literature (Chevalier et al., 2009) (Figure 1).

Liver FSR was decreased by 29% in HP fed mice compared to NP fed mice (Figure 1A). In the GCN2 experiment, liver FSR tends also to be lower in LP fed mice compared to NP fed mice. When multiplying FSR by tissue total protein content to get ASR, we noticed that liver ASR was still lower in HP fed mice but not significantly (Figure 1C). On the contrary, LP fed mice, because of their

smaller liver weight and protein concentration, exhibited a decrease in ASR compared to NP fed mice. However, this was significant only in the second study.

Protein synthesis rate in the muscle was insensitive to dietary protein level (Figure 1B-1D). No effect of GCN2 or AMPK deletion was noticed on both FSR and ASR in the liver or in the muscle (Figure 1).

Gene expression involved in proteolysis

Cathepsin D and ubiquitin are two proteins involved in proteolysis. Gene expression in the liver was only affected by LP diet intake in the GCN2 experiment as we observed an increase in Cathepsin D mRNA abundance in LP-fed mice. Gene expression in the muscle was neither affected by the deletion of hepatic AMPK or GCN2 nor by the protein content of the diet (Table 2).

Western-Blot

Discussion

The purpose of this study was to better understand the role played by liver AMPK and GCN2 in the adaptation of protein kinetics in response to the modulation of the protein content in the diet. To this end, wild-type mice and mice in which AMPK or GCN2 was deleted in the liver were fed during three weeks with low, normo- and high protein diets. We observed that the protein content of the diet acutely affected tissue mass and composition as well as protein synthesis rate in the liver. Indeed, the consumption of a high protein diet was associated with a strong inhibition of fractional synthesis rate (FSR) by 29%. Furthermore, deletion of AMPK or GCN2 in the liver did not affect protein synthesis rates and proteolysis in the liver or in periphery, in the muscle.

The results on the effect of a high-protein diet are in line with the work of Chevalier et al. that previously reported in rats that increasing dietary protein decreases protein synthesis rates in the liver but does not affect muscle protein turnover (Chevalier et al., 2009). Intriguingly, in our study as in this previous one, we observed an increase in protein content in the liver despite the decrease in protein synthesis rates and the absence of effect on proteolysis. Previous studies have reported that high protein consumption was associated with an increase in branched-chain amino acids and a decrease in plasma dispensable amino acids during the fasting and the postprandial periods (Morens et al., 2003; Peters and Harper, 1985). We can imagine that the decrease in the availability of dispensable amino acids, substrates for protein synthesis, could negatively affect the rates of protein synthesis. Moreover, we focused on protein synthesis rates two hours after meal onset but it is possible that mice fed on a high-protein diet maintain a high level of protein synthesis on a longer period than mice fed on a normo-protein diet. Indeed, we know from previous studies performed in the lab, that animals fed on a high-protein diet have important reserves of labile proteins that allow them to maintain high level of protein oxidation even after an overnight fast and therefore could also serve as substrate for protein synthesis (Stepien et al., 2010, 2011). Low-protein intake is known to decrease tissue protein synthesis (Batistela et al., 2014; dos Santos et al., 2016; Wykes et al., 1996). Our results show that in the experiment on GCN2 +/- animals, low-protein intake tended to decrease fractional synthesis rate and has a negative effect on absolute synthesis rate in the liver without any effect on muscle protein synthesis rate. Low-protein intake is known to decrease plasma protein content (Wykes et al., 1996)

and free amino acids except histidine and lysine (Batistela et al., 2014), this decrease in the amino acid pool could explain the lower protein synthesis rate observed under low-protein diet. It therefore would be interesting to look at the plasma acid aminogram.

AMPK and GCN2 when activated by phosphorylation, lead to the blockade of translation initiation (Hinnebusch, 2005; Luo et al., 2005). Therefore, we were expecting that their deletion could lead to an increase in the rate of protein synthesis. However, we observed no effect of the deletion. We can hypothesize that in the postprandial state, because of the energy and the amino acids provided by the meal, both kinases are not highly phosphorylated and activated. Therefore, there is not a big difference with KO mice where AMPK or GCN2 is not expressed and it is therefore not possible to observe difference in protein synthesis rate between wild-type and genetically modified mice.

GCN2 mediates the different effects of a low-protein diet. Indeed, KO-GCN2 mice does not exhibit increase in food intake, energy expenditure and FGF21 secretion the first days after the introduction of a low-protein diet (Laeger et al., 2014b). However, the same team recently reported, in KO-GCN2 mice, that after two weeks on a low-protein diet, there is establishment of a mechanism that replaces GCN2 to restore the effects of a low protein diet (Laeger et al., 2016). In our study, KO-GCN2 mice were fed during three weeks on a low-protein diet and may exhibit this adaptation. This might also be an explanation for the absence of difference on protein synthesis rates and proteolysis between WT-GCN2 and KO-GCN2 mice.

Chotechuan et al. observed that rats fed a high-protein diet exhibited a decrease in cathepsin D and ubiquitin expression whereas a low-protein diet is associated with a decrease in caspase and proteasome systems in the muscle (Batistela et al., 2014; dos Santos et al., 2016) and an increase in autophagy in the liver (Henagan et al., 2016). Moreover, GCN2 and AMPK seem to be essentially involved in autophagy process (B'chir et al., 2013; Meley et al., 2006). In our study, the gene involved in proteolysis that we studied remained insensitive to dietary protein content and genotype with the exception that we observed an increase in Cathepsin D expression in LP-fed mice in the GCN2 experiment. This observation together with the downward trend of protein synthesis could explain why these mice also exhibit an important decrease in their liver protein content.

It is interesting to note that the liver of mice from the GCN2 experiment are responsive to the LP diet (decrease in protein synthesis and in protein content, increase in Cathepsin D) whereas the one from the AMPK experiment is not even if all mice are coming from the same background: C57BL/6J. The mechanism underlying these different responses has to be clarified.

In conclusion, our study shows that modulation of protein content in diet has no effect on the expression of genes involved in proteolysis but affect the rate of fractional protein synthesis in the liver. In addition, during the postprandial period, AMPK and GCN2, due to the abundance of nutrients and energy which probably inhibits their activity do not appear to play a role on the rate of protein synthesis in the liver and peripherally in the muscle.

Table 1: Body weight, tissue mass and composition of WT-AMPK, WT-GCN2, KO-AMPK and *KO-GCN2* mice fed LP, NP or HP diets.

| Diet | LP | | NP | | HP | | Genotype | Test diet | Interaction | |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|-------------|----|
| Genotype | <i>WT-AMPK</i> | <i>KO-AMPK</i> | <i>WT-AMPK</i> | <i>KO-AMPK</i> | <i>WT-AMPK</i> | <i>KO-AMPK</i> | | | | |
| Total food intake (g) | 93.4 ± 1.20 | 94.4 ± 2.1 ^A | 71.8 ± 1.3 | 79.1 ± 1.9* ^B | 54.1 ± 1.4 | 53.6 ± 1.6 ^C | <0.05 | <0.0001 | NS | |
| Final body weight (g) | 22.93 ± 0.32 | 22.29 ± 0.34 ^A | 24.74 ± 0.41 | 23.7 ± 0.66 ^B | 23.79 ± 0.71 | 23.14 ± 0.73 ^{AB} | <0.05 | <0.05 | NS | |
| Liver | Weight (g) | 0.92 ± 0.02 | 0.86 ± 0.02 ^A | 1 ± 0.02 | 0.88 ± 0.07 ^{AB} | 1.07 ± 0.05 | 0.97 ± 0.04 ^B | <0.05 | <0.05 | NS |
| | mg of protein/100 mg of tissue | 16.29 ± 0.58 | 15.99 ± 0.65 ^A | 17.58 ± 0.76 | 17.39 ± 0.45 ^A | 19.67 ± 0.68 | 18.48 ± 0.6 ^B | NS | <0.001 | NS |
| Muscle | Weight (g) | 0.34 ± 0.01 | 0.32 ± 0.01 | 0.36 ± 0.01 | 0.36 ± 0.01 | 0.34 ± 0.01 | 0.34 ± 0.01 | NS | NS | NS |
| | mg of protein/100 mg of tissue | 19.66 ± 0.4 | 20.75 ± 0.53 | 19.74 ± 0.59 | 20.71 ± 0.41 | 20.17 ± 0.52 | 19.83 ± 0.72 | NS | NS | NS |
| Genotype | <i>WT-GCN2</i> | <i>KO-GCN2</i> | <i>WT-GCN2</i> | <i>KO-GCN2</i> | <i>WT-GCN2</i> | <i>KO-GCN2</i> | | | | |
| Total food intake (g) | 93.64 ± 2.74 | 88.45 ± 3.16 ^A | 68.26 ± 3.16 | 70.93 ± 2.83 ^B | 54.26 ± 2.58 | 52.37 ± 3.80 ^C | NS | <0.0001 | NS | |
| Final body weight (g) | 22.07 ± 0.44 | 21.60 ± 0.58 | 23.17 ± 0.48 | 23.54 ± 0.55 | 22.67 ± 0.78 | 22.56 ± 0.79 | NS | NS | NS | |
| Liver | Weight (g) | 0.75 ± 0.05 | 0.72 ± 0.06 ^A | 0.87 ± 0.04 | 0.87 ± 0.04 ^B | 1.00 ± 0.06 | 1.00 ± 0.06 ^B | NS | <0.0001 | NS |
| | mg of protein/100 mg of tissue | 16.58 ± 0.69 | 16.46 ± 0.53 ^A | 20.3 ± 0.88 | 18.8 ± 0.64 ^B | 19.85 ± 0.45 | 19.31 ± 0.94 ^B | NS | <0.0001 | NS |
| Muscle | Weight (g) | 0.37 ± 0.01 | 0.38 ± 0.01 | 0.39 ± 0.01 | 0.4 ± 0.01 | 0.38 ± 0.01 | 0.39 ± 0.01 | NS | NS | NS |
| | mg of protein/100 mg of tissue | 20.52 ± 0.84 | 20.46 ± 0.65 | 22.35 ± 0.72 | 22.25 ± 0.45 | 22.17 ± 0.84 | 20.22 ± 0.03 | NS | NS | NS |

Data are mean ± SEM (n =7-9).

^{A,B,C} Different letters within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, P<0.05).

* Significant difference between WT and KO within the same diet (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, P<0.05).

Table 2: mRNA abundance of Cathepsin D and Ubiquitin in liver and muscle of WT-AMPK, WT-GCN2, KO-AMPK and *KO-GCN2* mice fed LP, NP or HP diets.

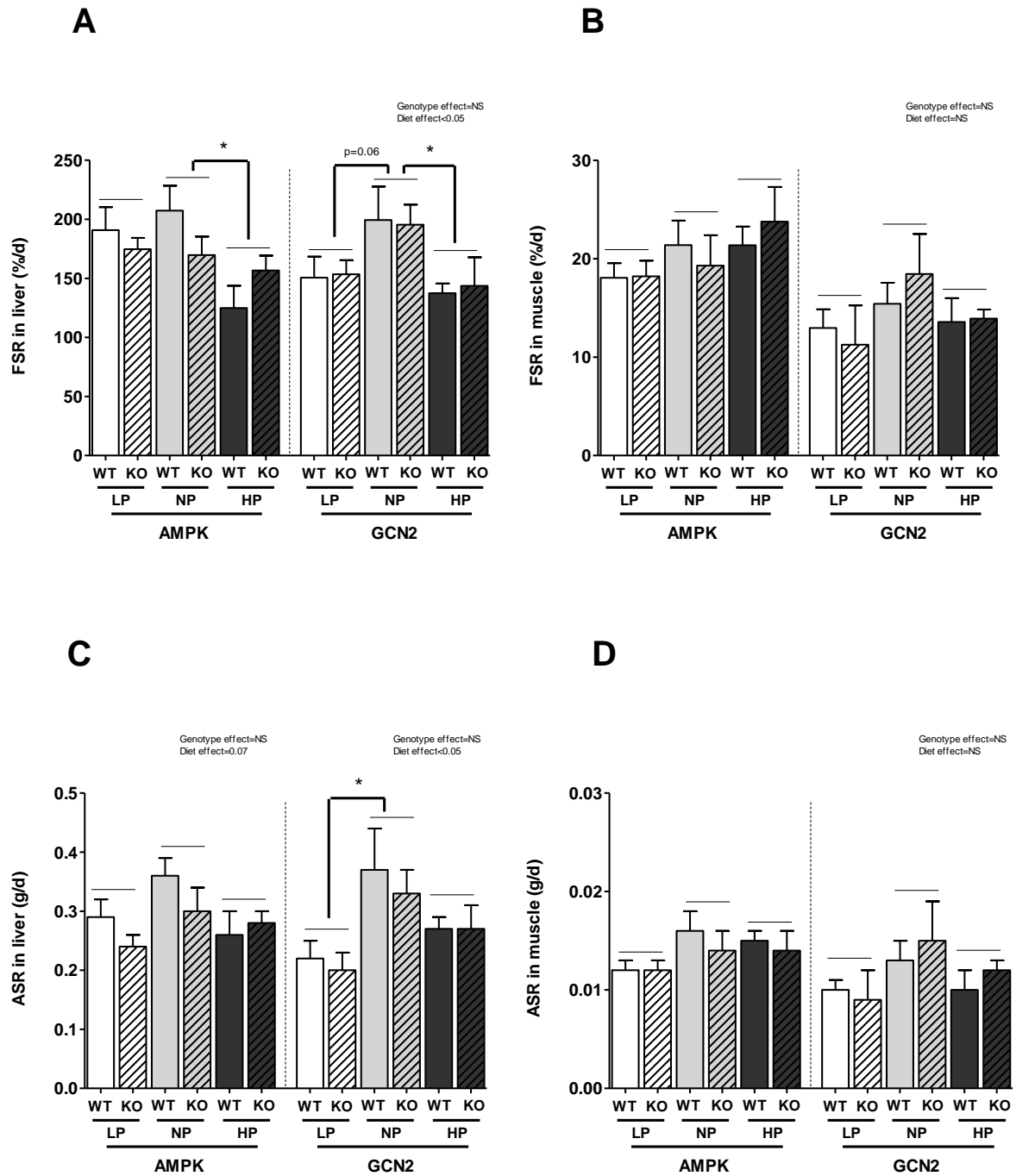
| Diet | | LP | | NP | | HP | | Genotype | Test diet | Interaction |
|----------|-------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|----------|-----------|-------------|
| Genotype | | <i>WT-AMPK</i> | <i>KO-AMPK</i> | <i>WT-AMPK</i> | <i>KO-AMPK</i> | <i>WT-AMPK</i> | <i>KO-AMPK</i> | | | |
| Liver | Cathepsin D | 0.98 ± 0.06 | 0.96 ± 0.08 | 1 ± 0.08 | 1.14 ± 0.08 | 1.15 ± 0.11 | 1.04 ± 0.04 | NS | NS | NS |
| | Ubiquitin | 1.06 ± 0.09 | 0.94 ± 0.13 | 1 ± 0.09 | 1.22 ± 0.10 | 1.04 ± 0.09 | 0.99 ± 0.07 | NS | NS | NS |
| Muscle | Cathepsin D | 0.85 ± 0.04 | 0.91 ± 0.07 | 1 ± 0.05 | 0.8 ± 0.06 | 0.98 ± 0.06 | 0.95 ± 0.05 | NS | NS | NS |
| | Ubiquitin | 1.14 ± 0.04 | 1.27 ± 0.08 | 1 ± 0.17 | 1.05 ± 0.08 | 1.17 ± 0.10 | 1.28 ± 0.07 | NS | NS | NS |
| Genotype | | <i>WT-GCN2</i> | <i>KO-GCN2</i> | <i>WT-GCN2</i> | <i>KO-GCN2</i> | <i>WT-GCN2</i> | <i>KO-GCN2</i> | | | |
| Liver | Cathepsin D | 1.54 ± 0.28 | 2.08 ± 0.31 ^A | 1 ± 0.10 | 0.97 ± 0.07 ^B | 0.86 ± 0.13 | 1.22 ± 0.21 ^B | NS | <0.001 | NS |
| | Ubiquitin | 0.93 ± 0.14 | 1.17 ± 0.14 | 1 ± 0.34 | 0.79 ± 0.06 | 0.97 ± 0.22 | 1.29 ± 0.19 | NS | NS | NS |
| Muscle | Cathepsin D | 0.73 ± 0.04 | 1.20 ± 0.24 | 1 ± 0.12 | 0.81 ± 0.02 | 1.10 ± 0.37 | 0.90 ± 0.06 | NS | NS | NS |
| | Ubiquitin | 0.81 ± 0.03 | 0.91 ± 0.06 | 1 ± 0.11 | 0.83 ± 0.05 | 0.96 ± 0.15 | 0.73 ± 0.05 | NS | NS | NS |

Data are mean ± SEM (n =7-9).

^{A,B,C} Different letters within a line mean statistically different values between diets (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, P<0.05).

Figure 1: FSRs and ASRs in liver, muscle in WT-AMPK, WT-GCN2, KO-AMPK and KO-GCN2 mice fed LP, NP or HP diets. * A star means statistically different values between diets (post hoc Bonferonni tests for multiple comparisons, $P < 0.05$). Data are mean \pm SEM ($n = 7-9$).

Figure 1:



Supplemental table 1: Macronutrient composition of the HCD. Diets were prepared by the “atelier de préparation des aliments”, UPAE, INRA, Jouy en Josas, France. Energy density is computed assuming a metabolizable energy of 16.7 kJ/g for carbohydrates and proteins and 37.7 kJ/g for fat.

| | P20 | NP | LP | HP |
|------------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| Weight content (g/kg) | | | | |
| Milk proteins | 200 | 140 | 50 | 530 |
| Starch | 570 | 622 | 700 | 287 |
| Sucrose | 93 | 100 | 113 | 46 |
| Soy Oil | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Minerals | 35 | 35 | 35 | 35 |
| Vitamins | 10 | 10 | 10 | 10 |
| cellulose | 50 | 50 | 50 | 50 |
| choline | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Energy content (%) | | | | |
| Protein | 20.5 | 14.5 | 5.2 | 54.6 |
| Carbohydrate | 68.5 | 75.0 | 84.0 | 34.9 |
| Fat | 10.5 | 10.5 | 10.5 | 10.5 |
| Energy density (kJ/g) | 14.57 | 14.56 | 14.54 | 14.60 |

Chapitre III : Discussion générale et conclusions

Ce travail de thèse avait pour objectif de définir précisément les rôles de l'AMPK et de GCN2 hépatiques dans le contrôle du métabolisme énergétique et protéique en réponse aux modulations de la teneur en protéines du régime. Il a également cherché à préciser le contrôle nutritionnel de la sécrétion de FGF21 et de comprendre l'implication de cette hépatokine dans les conséquences physiologiques associées à la consommation de régimes faibles ou forts en protéines. Les principaux résultats que nous avons obtenus montrent que :

- Un régime faible en protéines augmente tandis qu'un régime fort en protéines diminue la production hépatique de FGF21 mais le glucose et non les acides aminés, stimule l'expression de FGF21 dans des hépatocytes en culture.
- Les conséquences de la délétion de l'AMPK et de GCN2 sur le métabolisme énergétique, notamment l'oxydation postprandiale des glucides et des lipides dépendent du rapport protéines/glucides du régime.
- L'intensité de la synthèse protéique en période postprandiale est modulée par le niveau d'apport en protéines mais n'implique pas les kinases GCN2 et AMPK

Certains de ces résultats sont surprenants, notamment l'absence d'effet de la délétion de GCN2 et de l'AMPK sur la synthèse protéique. Nous discuterons dans un premier temps les effets de la modulation de la quantité de protéines dans le régime sur la composition corporelle, le métabolisme énergétique et le métabolisme protéique et l'implication de FGF21. Dans un deuxième temps, nous discuterons du rôle des voies AMPK et GCN2 dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la synthèse protéique. Enfin nous discuterons de la place du foie dans ces phénomènes adaptatifs.

1 Les effets de la modulation de la quantité de protéines dans le régime sur la composition corporelle, le métabolisme énergétique et protéique et rôle de FGF21 dans les orientations métaboliques

1.1 Quantité de protéines dans le régime et composition corporelle et métabolisme énergétique

Les modulations des protéines ou du rapport protéines/glucides dans le régime ont des conséquences importantes sur la prise alimentaire et le métabolisme énergétique. Il a été montré que l'augmentation des protéines dans le régime aux dépens des sucres permet de diminuer la prise alimentaire, la prise de masse grasse, la lipogénèse hépatique, la cholestérolémie et la tension artérielle et d'augmenter la dépense énergétique, la néoglucogénèse, la cétogénèse et la synthèse de glycogène tout en améliorant l'homéostasie glucidique et la composition corporelle (Altorf – van der Kuil et al., 2010; Azzout-Marniche et al., 2006; Blouet et al., 2006; Jean et al., 2001; Obeid et al., 2006; Pichon et al., 2006; Veldhorst et al., 2012; Westerterp, 2004). La consommation d'un régime faible en protéines, au contraire, tend à augmenter la prise alimentaire, l'adiposité, la lipogénèse hépatique ainsi que la dépense énergétique (Huang et al. 2013; Aparecida de França et al. 2009; C. Morrison et Laeger 2015). Conformément aux résultats de la littérature, nous avons observé dans nos deux études qu'un régime hyperprotéique (HP) diminuait la prise alimentaire, l'adiposité et augmentait la thermogénèse postprandiale et la cétogénèse tandis qu'un régime faible en protéines augmentait la prise alimentaire, la sécrétion de FGF21, l'insuline à jeun et la thermogénèse sans affecter particulièrement la composition corporelle.

Il est intéressant d'observer que malgré l'augmentation de l'ordre de 30% de la prise alimentaire sous régime faible en protéines, nous n'avons pas observé de gains significatifs de poids ni de masse grasse ce qui suggère une augmentation parallèle de la dépense énergétique totale de ces souris. Toutefois, les mesures de dépenses énergétiques par calorimétrie indirecte n'ont pas mis en évidence d'augmentation du métabolisme de repos mais il faut tenir compte du fait que ces mesures ont été effectuées lors d'un protocole spécifique de mise à jeun puis réalimentation qui ne correspond pas au rythme alimentaire des souris. De plus, les mesures de calorimétrie ont été effectuées à une température de 30°C pour permettre une mesure précise de la réponse thermogénique au repas car dans ces conditions le coût de la thermorégulation est réduit à ~0. En conditions habituelles, les souris sont hébergées dans les conditions qui prévalent en animalerie, soit 22°C. Cette température peut induire un quasi doublement de la dépense énergétique, en particulier lorsque les souris sont logées en cages individuelles, comme c'était le cas au cours de nos études (Overton, 2010; Cannon and Nedergaard, 2011). Des études en

cours au laboratoire suggèrent que l'augmentation de la dépense énergétique induite par une baisse de la température ambiante de 30°C à 22°C induit une augmentation plus importante de la dépense énergétique totale chez les souris sous régime faible en protéine (6% et 3%). Bien que le détail des mécanismes mis en jeu soit encore en cours d'étude, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la dépense énergétique sous régime faible en protéine pourrait être, au moins en partie, dépendante de la dépense énergétique liée au coût de la thermorégulation.

1.2 Quantité de protéines dans le régime et métabolisme protéique

Concernant le métabolisme des protéines, notre quatrième étude rapporte que, deux heures après l'ingestion d'un repas calibré, un régime hyperprotéique diminue la synthèse protéique dans le foie et n'a pas d'effet sur le muscle ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Chevalier et al. (Chevalier et al., 2009). Comme le rapporte les deux études, la consommation d'un régime hyperprotéique est souvent associé à une augmentation des taux circulants en acides aminés ramifiés et à une baisse de ceux des acides aminés non-indispensables (Morens et al., 2003; Peters and Harper, 1985). On peut imaginer que cette baisse des acides aminés non-indispensables qui sont des substrats pour la synthèse protéique ralentisse le flux de synthèse mesuré deux heures après le repas. Il aurait été intéressant d'étudier les taux plasmatiques d'acides aminés dans cette fenêtre de temps afin de vérifier cette hypothèse, mais cette mesure était difficile à combiner à l'ensemble des autres mesures effectuées, dans un modèle de souris.

Malgré la diminution de la synthèse protéique et l'absence de différence dans l'expression de gènes impliqués dans la protéolyse en régime HP: Ubiquitine E2B et Cathepsine D, nous avons aussi observé une augmentation du poids et de la concentration en protéines du foie sous régime hyperprotéique ce qui suggère que le catabolisme protéique aurait pu diminuer. Nous avons étudié les deux principales voies protéolytiques décrites dans la littérature, impliquées dans catabolisme des protéines au niveau du foie. Cependant, comme nous l'avons vu en introduction, il existe d'autres systèmes protéolytiques qui n'ont pas été étudiés au cours de ce travail, par exemple, les systèmes protéolytique calpaïne-calpastatine et caspase. Très peu de variations de la voie calpaïne-calpastatine ont été rapportées dans la littérature sous l'effet des variations des conditions nutritionnelles, notamment au niveau du foie. Quant à la voie caspase, elle est principalement impliquée dans l'apoptose et elle est depuis peu incluse dans les voies protéolytiques. De ce fait, la régulation nutritionnelle de cette voie au niveau hépatique est peu connue. Il est toutefois possible que ces systèmes puissent être inhibés sous régime riche en protéines. Par ailleurs, nous avons mesuré la synthèse protéique deux heures après le repas, c'est-à-dire au cœur de la période postprandiale, mais pas en période post-absorptive. Nous savons, en particulier grâce aux mesures réalisées à l'unité PNCA, que les rats sous régimes HP disposent de réserves importantes de protéines labiles qui leur permettent de maintenir un taux élevé d'oxydation protéique même après une nuit de jeûne (Stepien et al., 2010, 2011). Une forte disponibilité en acides

aminés en périodes interprandiales pourrait servir pour la synthèse de protéines corporelles (Swick and Benevenga, 1977).

La consommation d'un régime faible en protéines est associée dans l'expérimentation ayant recours aux souris GCN2 à une diminution de la synthèse protéique dans le foie et à une augmentation de l'expression de la Cathepsine D. Ceci est en accord avec le fait que ces souris présentent une concentration particulièrement faible en protéines dans le foie. Cette observation est en accord avec des travaux ultérieurs démontrant une baisse de la synthèse protéique (Wykes et al., 1996) et une augmentation des processus protéolytiques dans le foie (Henagan et al., 2016) en réponse à l'ingestion d'un régime faible en protéines.

1.3 Implication de FGF21 dans les effets des régimes faibles et forts en protéines

Notre premier article a montré que la consommation d'un régime faible en protéines et fort en glucides était associée à une augmentation de la sécrétion de FGF21 tandis qu'un régime fort en protéines et faibles en glucides était associé à des taux circulants en FGF21 faibles. Par ailleurs, des cultures d'hépatocytes ont montré que le signal glucose, plutôt que celui des acides aminés était responsable de l'induction de la sécrétion de FGF21. L'observation concomitante sous régime LP de l'augmentation de la thermogénèse due à une forte oxydation des glucides, de la sécrétion de FGF21 et de l'existence d'une corrélation forte entre les taux circulants de FGF21 et le niveau d'oxydation des glucides suggère que FGF21 est impliqué dans la réponse thermogénique des régimes faibles en protéines. Ceci est d'ailleurs en accord avec les travaux de Laeger et al. montrant que l'induction de la dépense énergétique sous régime LP est supprimée chez des souris n'exprimant pas FGF21 (Laeger et al., 2016). Sous régime HP au contraire, l'augmentation de la thermogénèse et de la cétogénèse associée à des taux circulants faibles de FGF21 suggère que ces effets sont médiés par une autre voie de signalisation.

En outre, il ne semble exister aucun lien entre les taux circulants de FGF21 et les flux de synthèse protéique, ce qui suggère que FGF21 n'est pas impliqué dans le contrôle de la synthèse protéique.

2 Rôle des voies GCN2 et AMPK hépatiques dans le contrôle du métabolisme énergétique et la prise alimentaire

Le but principal de ce travail de thèse a été d'avancer dans la compréhension du rôle joué par les protéines kinases hépatiques GCN2 et AMPK ainsi que par l'hépatokine FGF21 dans les adaptations du métabolisme énergétique en réponse aux variations du niveau d'apport protéique. Les délétions de GCN2 ou de l'AMPK dans le foie n'ont aucune conséquence sur la viabilité ni sur la fécondité des animaux.

2.1 Rôle de l'AMPK hépatique dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire

La délétion de l'AMPK est associée à une légère baisse du poids sans effet sur la composition corporelle. La prise alimentaire est affectée mais uniquement sous régime NP avec une légère augmentation de la prise alimentaire cumulée chez les souris KO. On observe aussi chez ces souris une adaptation du métabolisme hépatique qui leur permet de maintenir des taux d'oxydation des glucides et des lipides comparables à ceux observés chez les souris témoins. Cette adaptation semble passer principalement par une augmentation de la synthèse hépatique de FGF21. Sous régime hyperprotéique comme sous régime faible en protéines, nous n'avons par contre observé aucune modification du métabolisme hépatique et des perturbations de l'évolution postprandiale des taux d'oxydation des glucides et des lipides. L'absence d'adaptation des souris AMPK-KO semble avoir été due à l'absence de réponse FGF21 sous régime HP et au contraire, à une stimulation déjà très élevée et maximale de la synthèse de FGF21 sous régime LP observée chez les souris sauvages. Dans les deux cas de figure, les souris AMPK-KO semblent ne pas avoir pu mettre en jeu de voies alternatives pour compenser l'absence d'AMPK.

Plusieurs études ont rapporté que la consommation d'un régime faible en protéines induit une forte augmentation de la synthèse de FGF21 qui en retour contrôle l'augmentation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Laeger et al., 2014b, 2016). Dans nos études, nous avons pu constater que les souris AMPK-KO nourries en régime NP présentent une forte augmentation de la sécrétion de FGF21, de la prise alimentaire cumulée et de l'accumulation transitoire de triglycérides hépatiques. En somme, elles présentent un profil métabolique se rapprochant de souris témoins nourries en régime faible en protéines. Nous avons attribué l'augmentation de la sécrétion de FGF21 chez ces souris à une réaction défensive en réponse à l'accumulation de TG hépatiques (Morris-Stiff and Feldstein, 2010) mais il est également possible que chez ces souris l'absence de signalisation AMPK au niveau du foie ait eu pour conséquence de mimer une déficience en acides aminés, ce qui expliquerait ainsi pourquoi

ces souris mangent plus et présentent un grand nombre de paramètres métaboliques comparables à ceux des souris nourries en régime faible en protéines.

Par ailleurs, une autre explication pourrait venir d'une étude récente qui a montré qu'un défaut d'oxydation des lipides au niveau du muscle stimule la sécrétion de FGF21 (Vandanmagsar et al., 2016). L'absence d'AMPK au niveau du foie pourrait générer ce défaut d'oxydation lipidique et expliquer pourquoi les souris NP présentent de manière transitoire une augmentation des triglycérides hépatiques et de la sécrétion de FGF21.

La flexibilité métabolique est la capacité de l'organisme à adapter les taux d'oxydation des substrats énergétique au niveau de leur disponibilité. En réponse à l'ingestion d'un repas riche en glucides, elle mesure l'efficacité de l'individu de passer d'une oxydation essentiellement lipidique avant le repas à une oxydation glucidique après l'ingestion du repas. Cette capacité est souvent réduite par un phénomène de résistance à l'insuline et est souvent associée à des différences en termes de composition corporelle (Kelley and Mandarino, 2000; Nadkarni et al., 2013). Dans nos études, nous avons observé que les souris KO-AMPK nourries en régime LP ou HP présentent une altération de la flexibilité métabolique sans différence de sensibilité à l'insuline. Ceci prouve que la délétion de l'AMPK affecte directement les cinétiques d'oxydation des glucides et des lipides et que cette kinase dans le foie est impliquée dans le shift de l'oxydation des lipides vers celle des glucides à la suite du repas.

2.2 Rôle de GCN2 hépatique dans le contrôle du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire

Les résultats obtenus sur les souris GCN2-KO indiquent que l'absence de GCN2 n'a pas d'effet sur le poids des souris, la prise alimentaire et la composition corporelle. De plus, ce n'est que sous régime faible en protéines que nous avons pu observer de petites augmentations des taux d'oxydation des glucides dans les deux premières heures après ingestion d'un repas test. Dans ce contexte aussi, il semble que FGF21 soit impliquée puisque ce défaut d'oxydation était associé à un défaut de sécrétion de FGF21. La perte de la voie de signalisation GCN2 et de la sécrétion de FGF21 chez les souris KO sous régime LP aurait pu avoir pour conséquence de mimer une suffisance en acides aminés mais ce n'est vraisemblablement pas le cas. En effet, les souris KO-GCN2 foie spécifique sont hyperphagiques mais mangent autant que les souris sauvages sous régime LP. De plus, elles ont des taux d'oxydation des glucides supérieurs à ceux observés chez les souris nourries sous régime NP et HP, et également supérieurs à ceux observés chez les des souris sauvages sous régime LP. Ces adaptations métaboliques se traduisent par l'absence d'effets majeurs de la délétion de GCN2. Il aurait été intéressant, dans cette étude, d'observer si l'injection de FGF21 chez les souris KO-GCN2 nourries en LP aurait permis de reproduire un profil d'oxydation similaire à celui des souris sauvages.

Il ne semble pas surprenant d'observer des différences essentiellement sous régime NP lors de l'expérimentation AMPK et essentiellement sous régime LP lors de l'expérimentation GCN2. En effet, l'AMPK est un senseur de l'énergie intracellulaire et il semble que les fortes concentrations en glucose (cas du régime LP) ou en protéines (cas du régime HP) miment une disponibilité énergétique qui a pour conséquence une baisse de la phosphorylation de l'AMPK comme le rapporte la littérature (Chotechuang et al., 2009; Minokoshi et al., 2004). Dans ce cas, le niveau d'activation de l'AMPK est bas et le profil métabolique des souris sauvages nourries sous ces deux régimes est proche de celui des souris n'exprimant pas l'AMPK. On observe alors peu de différence entre les souris sauvages et génétiquement modifiées sous ces deux régimes au contraire de ce qui se passe sous régime NP. La protéine kinase GCN2, quant à elle, est un senseur de la déficience en acides aminés, les concentrations normales ou fortes en protéines (cas des régimes NP et HP) inhibent sa phosphorylation et son activité. Les souris sauvages nourries en régime NP ou HP présentent donc une faible phosphorylation de GCN2 ce qui les rapproche d'un point de vue métabolique des souris n'exprimant pas GCN2 dans le foie. En accord avec cette hypothèse, Laeger et al. n'a observé de différences entre des souris KO-GCN2 total et sauvages que lorsque ces dernières sont nourries avec un faible niveau en protéines (Laeger et al., 2016). Cette hypothèse reste encore à confirmer en mesurant précisément l'évolution des niveaux de phosphorylation des voies AMPK et GCN2 en période postprandiale.

3 Rôle des voies GCN2 et AMPK dans le contrôle de la synthèse protéique

Les kinases GCN2 et AMPK, lorsqu'elles sont activées par phosphorylation en cas d'une baisse de la disponibilité en acides aminés ou en énergie respectivement ont un effet inhibiteur sur l'initiation de la traduction protéique (Chotechuang et al., 2009). Notre quatrième étude ne rapporte, toutefois, aucune différence concernant les flux de synthèse protéique et l'expression des gènes impliqués dans la protéolyse entre les souris n'exprimant pas l'AMPK ou GCN2 dans le foie et les souris sauvages dans le foie et en périphérie dans le muscle. A la suite d'un repas, les nutriments en abondance entraînent une diminution de la phosphorylation des kinases AMPK et GCN2 dans le foie des souris sauvages. Chez ces dernières, la synthèse protéique n'est donc plus ou peu bloquée par les deux kinases et on retrouve dans ce cas des niveaux de flux de synthèse protéique équivalents à celles des souris n'exprimant pas ces voies. Il aurait été intéressant d'étudier la synthèse protéique en situation de jeûne, lors duquel les voies GCN2 et AMPK présentent un haut niveau d'activation. L'absence de différence entre les souris sauvages et génétiquement modifiées peut également provenir du fait que les délétions n'impactent pas directement la voie mTOR, qui reste l'acteur principal de la régulation de la synthèse protéique. Par ailleurs, la mesure du taux fractionnaire synthétique estime la synthèse protéique que sur une courte fenêtre de temps, vingt minutes dans notre étude. Il aurait été judicieux d'observer les polysomes afin d'avoir une autre méthode d'estimation du flux de synthèse protéique.

L'absence de différence sous régime LP entre souris sauvages et souris KO-GCN2 reste toutefois surprenante sachant que GCN2 est impliqué dans le blocage de la traduction protéique en réponse à un faible apport en protéines. Une étude de Laeger a montré que des souris KO-GCN2 ne présentaient pas une partie des effets induits normalement par un régime faible en protéines : augmentation de l'apport alimentaire, de la dépense énergétique et de la sécrétion de FGF21 les premiers jours après l'introduction du régime (Laeger et al., 2014b). La même équipe a récemment rapporté qu'au bout de deux semaines sous un régime pauvre en protéines, il y a mise en place chez ces souris d'un mécanisme qui contourne GCN2 et restaure les effets d'un régime faible en protéines (Laeger et al., 2016). Dans notre étude, les souris KO-GCN2 ont été nourries pendant trois semaines avec un régime pauvre en protéines et pourraient présenter cette adaptation. Cela serait une explication à l'absence de différence sur les taux de synthèse de protéines et la protéolyse entre les souris WT et KO-GCN2 sous régime faible en protéines.

4 Place du foie dans les phénomènes adaptatifs

Il est intéressant de noter que les conséquences de la modification du contenu en protéines du régime sur les paramètres suivants : cétogénèse, contenu en triglycérides et en glycogène, taux de synthèse protéique, sécrétion de FGF21 sont essentiellement observées au niveau du foie. Par ailleurs, nos deux études montrent aussi que l'ajustement rapide et précis des taux d'oxydation des glucides et lipides en fonction du contenu en protéines du régime est sous la double dépendance d'une voie de signalisation passant par l'AMPK et d'une voie passant par GCN2 au niveau du foie. Ces observations confirment bien le rôle central du foie dans les adaptations métaboliques en réponse aux modifications de la composition du régime.

La comparaison des conséquences entre la délétion totale et la délétion spécifiquement au niveau du foie des kinases permet également de préciser si le foie ou les autres organes en sont responsables. Ainsi l'absence d'induction de FGF21 sous régime LP chez des souris KO-GCN2 total observée par Laeger et al. a également été mise en évidence dans notre modèle de souris (Laeger et al., 2014d). Ceci nous permet de conclure qu'il s'agit bien de GCN2 au niveau du foie qui gère essentiellement la sécrétion de FGF21 en réponse au régime LP et non un autre organe. Au contraire, l'observation d'une absence d'augmentation de la prise alimentaire sous régime LP chez des souris KO-GCN2 total et non dans notre modèle suggère que le contrôle de la prise alimentaire sous régime LP implique GCN2 mais dans un autre organe que le foie (probablement l'hypothalamus). Par ailleurs, dans le cas de l'étude sur l'AMPK, nous avons observé que le métabolisme hépatique était modulé de façon transitoire chez les souris KO sous régime NP afin de normaliser les concentrations en triglycérides et glycogène hépatique. Ces résultats suggèrent une capacité d'adaptation très importante du foie.

L'augmentation de la prise alimentaire observée chez les souris KO nourries en régime NP pourrait également directement impliquer le foie. En effet, Friedman a émis l'hypothèse que la prise alimentaire d'un individu répondait directement à la quantité d'ATP hépatique par l'intermédiaire d'un dialogue entre le cerveau et le foie utilisant le nerf vague. Une augmentation de l'ATP hépatique est associée à une diminution de la prise alimentaire et inversement (Friedman, 1995). L'augmentation de la prise alimentaire chez les souris KO-AMPK nourries en régime NP pourrait être due à une légère déplétion de l'ATP hépatique du fait de l'absence d'AMPK et d'une diminution consécutive de l'activation de certaines voies catalytiques. Il aurait donc été intéressant de doser les concentrations en ATP, ADP et AMP afin de voir si les délétions de l'AMPK dans le foie modulaient la disponibilité énergétique dans la cellule.

5 Conclusions et perspectives

Ces travaux ont permis de mieux caractériser les rôles de l'AMPK et de GCN2 hépatiques et leurs interactions possibles dans le métabolisme énergétique et de la synthèse protéique en réponse aux modulations en protéines du régime. Ils ont montré que la délétion de ces voies n'avait pas d'effets majeurs sur le phénotype des souris mais que les adaptations au niveau hépatique dépendaient directement du contenu en protéines du régime. Il semble que ces voies ne sont pas impliquées dans certains traits phénotypiques observés sous régime hyperprotéique : diminution de l'adiposité, augmentation de la prise alimentaire et sous régime faible en protéines : augmentation de la prise alimentaire, de la dépense énergétique, de l'adiposité. Il apparaît donc que chez les modèles de souris KO, il y ait mise en place d'adaptations qui compensent en partie l'absence des voies. A ce titre, nous avons réfléchi à utiliser des ARN interférents (SiRNA), mais les protéines cibles AMPK et GCN2 ayant une demi-vie trop longue, la technique n'aurait pas permis de réduire de manière très importante le contenu en protéines. Il faut aussi tenir compte du fait que les muscles et le tissu adipeux blanc en particulier participent à la mise en réserve et à l'oxydation des substrats énergétiques et que des adaptations au niveau de ces organes interviennent probablement, d'autant plus que ces organes ne sont pas affectés par la délétion des voies.

Un autre point important à soulever est que sous régime à forte teneur en protéines, les protéines sont augmentées aux dépens des sucres tandis que sous régime faible en protéines elles sont diminuées au profit des sucres. Par conséquent, il est impossible de déterminer si les effets des régimes forts en protéines sont médiés par une augmentation des protéines ou une baisse des sucres et inversement pour les régimes faibles en protéines. Pour déterminer les effets isolés des nutriments, il aurait été intéressant de réaliser des cultures d'hépatocytes isolés à partir des souris KO-AMPK et KO-GCN2 foie spécifique afin de comprendre si les adaptations métaboliques sont le fait des glucides, des acides aminés ou d'une interaction des deux nutriments.

Notre travail a également montré que FGF21 jouait un rôle majeur dans l'ajustement des profils d'oxydation des lipides et des glucides. Dans le cas de l'étude sur l'AMPK, FGF21 permet de compenser un défaut métabolique tandis que dans l'étude sur GCN2, le défaut de sa sécrétion modifie les profils postprandiaux en réponse à l'ingestion d'un régime faible en protéines. Dans le premier cas, c'est la sécrétion de FGF21 qui stimule l'oxydation des glucides tandis que dans le second cas c'est son absence qui autorise l'augmentation de cette oxydation. Ceci rappelle que les rôles de FGF21 sont multiples et dépendent de l'organe cible. Les deux figures suivantes tentent de récapituler les effets de FGF21 dans les adaptations en réponse aux délétions de l'AMPK ou de GCN2.

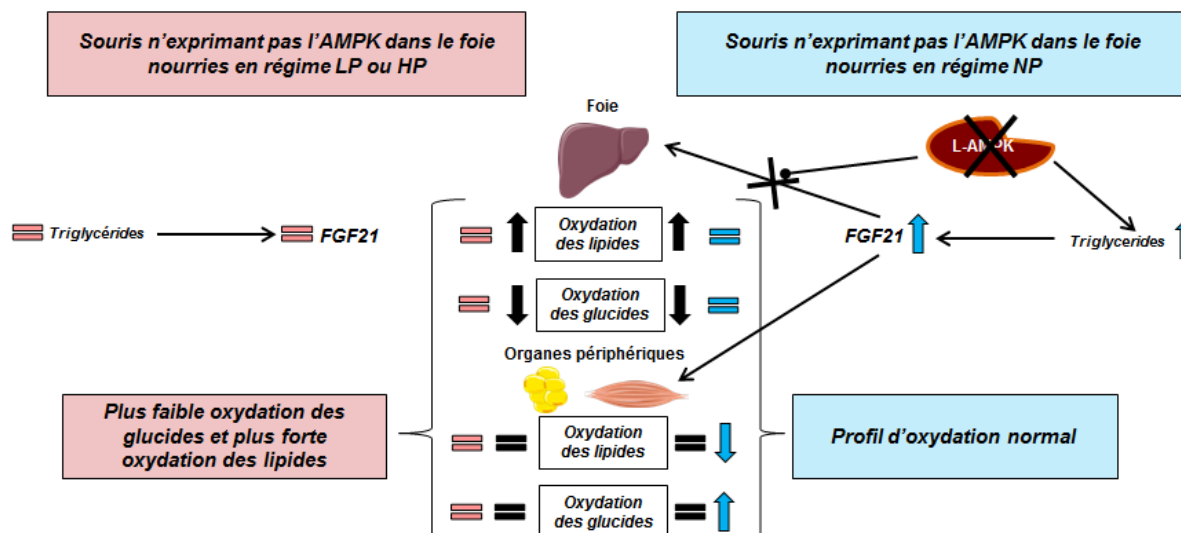


Figure 22: Conséquences de la délétion de l'AMPK dans le foie et rôle de FGF21

La délétion de l'AMPK dans le foie réduit la capacité des souris à passer d'une oxydation des glucides à une oxydation des lipides dans le foie à la suite d'un repas (flèches noires). Ceci n'est pas compensé chez les souris n'exprimant pas l'AMPK dans le foie et nourries sous régime LP et HP, par conséquent on observe chez ces dernières une altération des profils postprandiaux d'oxydation. Au contraire, chez les souris n'exprimant pas l'AMPK dans le foie et nourries sous régime NP, on observe une accumulation de triglycérides qui pourrait induire la sécrétion de FGF21. FGF21 va alors stimuler le captage du glucose et son oxydation au niveau des organes périphériques mais ne peut exercer son action stimulatrice sur l'oxydation des acides gras au niveau du foie car celle-ci nécessite la présence de l'AMPK (Zhu et al., 2014). Ainsi le défaut d'oxydation au niveau du foie est compensé par la stimulation de l'oxydation au niveau des organes périphériques et ces souris présentent un profil d'oxydation normal.

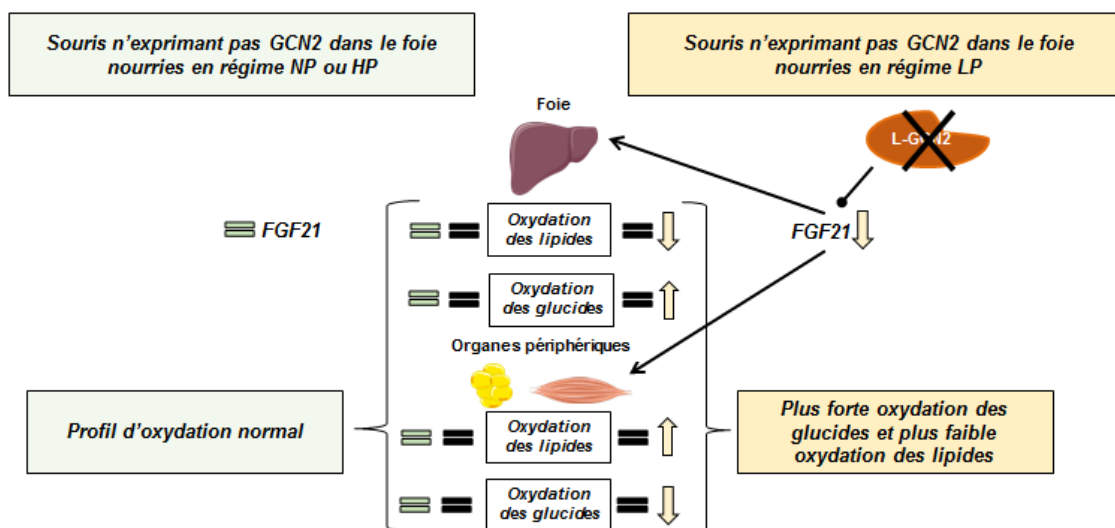


Figure 23: Conséquences de la délétion de GCN2 dans le foie et rôle de FGF21

La délétion de GCN2 dans le foie ne réduit la capacité des souris à passer d'une oxydation des glucides à une oxydation des lipides dans le foie à la suite d'un repas (signes noirs). Chez les souris nourries en régime NP et HP, les niveaux de sécrétion de FGF21 sont équivalents entre souris sauvages et souris KO, ces souris présentent ainsi des profils d'oxydation normaux. Au contraire, sous régime LP, la faible quantité de protéines induit la sécrétion de FGF21 chez les souris sauvages mais pas chez les souris KO car celle-ci nécessite GCN2. Cette absence de sécrétion de FGF21 va prévenir l'augmentation de l'oxydation des lipides et permettre une oxydation forte des glucides au niveau du foie, phénomène qui n'est pas compensé par le captage et l'oxydation plus faible du glucose au niveau des organes périphériques. Par conséquent, ces souris présentent une plus forte oxydation des glucides et une plus faible oxydation des lipides.

En conclusion, nos travaux ont permis de progresser dans la compréhension de l'implication de GCN2, de l'AMPK hépatiques ainsi que du facteur fibroblastique FGF21 dans les ajustements du métabolisme énergétique en réponse aux variations du contenu en protéines du régime. La vérification du niveau de phosphorylation des voies en période postprandiale permettra de vérifier certaines de nos hypothèses et de mettre en évidence les interactions qui peuvent exister entre les voies AMPK et GCN2.

Bibliographie

- Abdul-Rahman, O., Kristóf, E., Doan-Xuan, Q.-M., Vida, A., Nagy, L., Horváth, A., Simon, J., Maros, T., Szentkirályi, I., Palotás, L., et al. (2016). AMP-Activated Kinase (AMPK) Activation by AICAR in Human White Adipocytes Derived from Pericardial White Adipose Tissue Stem Cells Induces a Partial Beige-Like Phenotype. *PLOS ONE* *11*, e0157644.
- Ables, G.P., Ouattara, A., Hampton, T.G., Cooke, D., Perodin, F., Augie, I., and Orentreich, D.S. (2015). Dietary Methionine Restriction in Mice Elicits an Adaptive Cardiovascular Response to Hyperhomocysteinemia. *Sci. Rep.* *5*, 8886.
- Acheson, K. (1993). Influence of autonomic nervous system on nutrient-induced thermogenesis in humans. *Nutrition* *9*, 373–380.
- Adibi, S.A. (1997). The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* *113*, 332–340.
- Adibi, S.A., and Mercer, D.W. (1973). Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals. *J. Clin. Invest.* *52*, 1586.
- Altorf-van der Kuil, W., Engberink, M.F., Brink, E.J., van Baak, M.A., Bakker, S.J.L., Navis, G., van 't Veer, P., and Geleijnse, J.M. (2010). Dietary Protein and Blood Pressure: A Systematic Review. *PLoS ONE* *5*, e12102.
- Anderson, G.H., Tecimer, S.N., Shah, D., and Zafar, T.A. (2004). Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *J. Nutr.* *134*, 3011–3015.
- Anderson, K.A., Ribar, T.J., Lin, F., Noeldner, P.K., Green, M.F., Muehlbauer, M.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., and Means, A.R. (2008). Hypothalamic CaMKK2 Contributes to the Regulation of Energy Balance. *Cell Metab.* *7*, 377–388.
- Anthony, T.G. (2015). Homeostatic responses to amino acid insufficiency. *Anim. Nutr.* *1*, 135–137.
- Anthony, T.G., Anthony, J.C., Yoshizawa, F., Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2001). Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J. Nutr.* *131*, 1171–1176.
- Anthony, T.G., McDaniel, B.J., Byerley, R.L., McGrath, B.C., Cavener, D.R., McNurlan, M.A., and Wek, R.C. (2004). Preservation of Liver Protein Synthesis during Dietary Leucine Deprivation Occurs at the Expense of Skeletal Muscle Mass in Mice Deleted for eIF2 Kinase GCN2. *J. Biol. Chem.* *279*, 36553–36561.
- Aoyagi, Y., Tasaki, I., Okumura, J., and Muramatsu, T. (1988). Energy cost of whole-body protein synthesis measured in vivo in chicks. *Comp. Biochem. Physiol.* *91A*, 765–768.

Aparecida de França, S., dos Santos, M.P., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C., Kettelhut, I. do C., Lopes, C.F., and Kawashita, N.H. (2009). Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. *Nutrition* 25, 1186–1192.

Aparecida de França, S., Pavani dos Santos, M., Nunes Queiroz da Costa, R.V., Froelich, M., Buzelle, S.L., Chaves, V.E., Giordani, M.A., Pereira, M.P., Colodel, E.M., Marlise Balbinotti Andrade, C., et al. (2014). Low-protein, high-carbohydrate diet increases glucose uptake and fatty acid synthesis in brown adipose tissue of rats. *Nutrition* 30, 473–480.

Araujo, T.R., Freitas, I.N., Vettorazzi, J.F., Batista, T.M., Santos-Silva, J.C., Bonfleur, M.L., Balbo, S.L., Boschero, A.C., Carneiro, E.M., and Ribeiro, R.A. (2016). Benefits of l-alanine or l-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity. *Eur. J. Nutr.*

Arnal, M., Beaufrère, B., Benamouzig, R., Boirie, Y., Cynober, L., Dardevet, D., Darmaun, D., Dupin, H., Fromentin, G., Gaudichon, C., et al. (1997). DOSSIER SCIENTIFIQUE DE L'IFN. In DOSSIER SCIENTIFIQUE DE L'IFN-LES PROTEINES-TOME 1, p.

Arrieta-Cruz, I., and Gutierrez-Juarez, R. (2016). The Role of Circulating Amino Acids in the Hypothalamic Regulation of Liver Glucose Metabolism. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 7, 790S–797S.

Assifi, M.M. (2005). AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *AJP Endocrinol. Metab.* 289, E794–E800.

Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., and Fafournoux, P. (2004). Induction of CHOP Expression by Amino Acid Limitation Requires Both ATF4 Expression and ATF2 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 5288–5297.

Azzout-Marniche, D., Gaudichon, C., Blouet, C., Bos, C., Mathe, V., Huneau, J.-F., and Tome, D. (2006). Liver glyconeogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats? *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1400–R1407.

Baird, T.D., and Wek, R.C. (2012). Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation and Translational Control in Metabolism. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 3, 307–321.

Bando, H. (2005). Phosphorylation of the 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 Family of Glycolytic Regulators in Human Cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 5784–5792.

Baquet, A., Lavoinne, A., and Hue, L. (1991). Comparison of the effects of various amino acids on glycogen synthesis, lipogenesis and ketogenesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 273, 57–62.

Barzel, U.S., and Massey, L.K. (1998). Excess dietary protein can adversely affect bone. *J. Nutr.* 128, 1051–1053.

- Batistela, E., Pereira, M.P., Siqueira, J.T., Paula-Gomes, S., Zanon, N.M., Oliveira, E.B., Navegantes, L.C.C., Kettelhut, I.C., Andrade, C.M.B., Kawashita, N.H., et al. (2014). Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin–proteasome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *92*, 445–454.
- Batterham, R.L., Heffron, H., Kapoor, S., Chivers, J.E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C.W., Thomas, E.L., Bell, J.D., and Withers, D.J. (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab.* *4*, 223–233.
- Baum, J.I., Layman, D.K., Freund, G.G., Rahn, K.A., Nakamura, M.T., and Yudell, B.E. (2006). A reduced carbohydrate, increased protein diet stabilizes glycemic control and minimizes adipose tissue glucose disposal in rats. *J. Nutr.* *136*, 1855–1861.
- B’chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., and Bruhat, A. (2013). The eIF2 /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* *41*, 7683–7699.
- Bellissimo, N., and Akhavan, T. (2015). Effect of Macronutrient Composition on Short-Term Food Intake and Weight Loss. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* *6*, 302S–308S.
- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., and Fromentin, G. (2002). Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiol. Behav.* *75*, 577–582.
- Bensaid, A., Tomé, D., L’Heureux-Bourdon, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., Gaudichon, C., Larue-Achagiotis, C., and Fromentin, G. (2003). A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol. Behav.* *78*, 311–320.
- Bergen, W.G. (2015). Small-intestinal or colonic microbiota as a potential amino acid source in animals. *Amino Acids* *47*, 251–258.
- Bergeron, R., Previs, S.F., Cline, G.W., Perret, P., Russell III, R.R., Young, L.H., and Shulman, G.I. (2001). Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes* *50*, 1076–1082.
- Bernier, J., Adrain, J., and Vidon, N. (1988). *Les aliments dans le tube digestif* (Paris, France: Doin éditeurs).
- Bilsborough, S., and Mann, N. (2006). A review of issues of dietary protein intake in humans. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* *16*, 129.
- Block, K., and Harper, A. (1991). High Levels of Dietary Amino and Branched-Chain α -Keto Acids Alter Plasma and Brain Amino Acid Concentrations in Rats. *J. Nutr.* *121*, 663–671.
- Blom, W.A., Lluch, A., Stafleu, A., Vinoy, S., Holst, J.J., Schaafsma, G., and Hendriks, H.F. (2006). Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am. J. Clin. Nutr.* *83*, 211–220.

- Blouet, C., Mariotti, F., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Mathé, V., Tomé, D., and Huneau, J.-F. (2006). The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glyceemic control. *J. Nutr.* *136*, 1849–1854.
- Blouet, C., Ono, H., and Schwartz, G.J. (2008). Mediobasal Hypothalamic p70 S6 Kinase 1 Modulates the Control of Energy Homeostasis. *Cell Metab.* *8*, 459–467.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.-P., Maubois, J.-L., and Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 14930–14935.
- Broer, S. (2008). Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev.* *88*, 249–286.
- Brosnan, J.T. (2003). Interorgan amino acid transport and its regulation. *J. Nutr.* *133*, 2068S–2072S.
- Brown, N.F., Stefanovic-Racic, M., Sipula, I.J., and Perdomo, G. (2007). The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism.* *56*, 1500–1507.
- Browne, G.J., Finn, S.G., and Proud, C.G. (2004). Stimulation of the AMP-activated Protein Kinase Leads to Activation of Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase and to Its Phosphorylation at a Novel Site, Serine 398. *J. Biol. Chem.* *279*, 12220–12231.
- Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., and Lee, W.M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 223–227.
- Buse, M.G., and Reid, S.S. (1975). Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J. Clin. Invest.* *56*, 1250.
- Buzelle, S.L., Santos, M.P., Baviera, A.M., Lopes, C.F., Garófalo, M.A.R., Navegantes, L.C.C., Kettelhut, I.C., Chaves, V.E., and Kawashita, N.H. (2010). A low-protein, high-carbohydrate diet increases the adipose lipid content without increasing the glycerol-3-phosphate or fatty acid content in growing rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *88*, 1157–1165.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2011). Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J. Exp. Biol.* *214*, 242–253.
- Cao, J.J., and Nielsen, F.H. (2010). Acid diet (high-meat protein) effects on calcium metabolism and bone health: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 698–702.
- Carling, D., and Hardie, D. (1989). The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim. Biophys. Acta* *1012*, 81–86.

Cayot, P., Finot, P., Fouques, D., Gueguen, J., Lorient, D., Meunier, J., Quillien, L., Rerat, A., Tome, D., and Uzzan, A. (1997). Caractéristiques des différentes sources de protéines alimentaires. In DOSSIER SCIENTIFIQUE DE L'IFN-LES PROTEINES, p.

Chalvon-Demersay, T., Even, P.C., Tomé, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., and Azzout-Marniche, D. (2016). Low-protein diet induces, whereas high-protein diet reduces hepatic FGF21 production in mice, but glucose and not amino acids up-regulate FGF21 in cultured hepatocytes. *J. Nutr. Biochem.* 36, 60–67.

Chaveroux, C., Lambert-Langlais, S., Cherasse, Y., Averous, J., Parry, L., Carraro, V., Jousse, C., Maurin, A.-C., Bruhat, A., and Fafournoux, P. (2010). Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie* 92, 736–745.

Chevalier, L., Bos, C., Gryson, C., Luengo, C., Walrand, S., Tomé, D., Boirie, Y., and Gaudichon, C. (2009). High-protein diets differentially modulate protein content and protein synthesis in visceral and peripheral tissues in rats. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 25, 932–939.

Chevalier, L., Bos, C., Azzout-Marniche, D., Dardevet, D., Tome, D., and Gaudichon, C. (2010). Dietary protein regulates hepatic constitutive protein anabolism in rats in a dose-dependent manner and independently of energy nutrient composition. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R1720–R1730.

Chotechuang, N. (2010). Le rôle des acides aminés dans le métabolisme protéique du foie sous régime hyper protéique: identification du signal des acides aminés et des voies de transduction associées. AgroParisTech.

Chotechuang, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gausseres, N., Steiler, T., Gaudichon, C., and Tome, D. (2009). mTOR, AMPK, and GCN2 coordinate the adaptation of hepatic energy metabolic pathways in response to protein intake in the rat. *AJP Endocrinol. Metab.* 297, E1313–E1323.

Chotechuang, N., Azzout-Marniche, D., Bos, C., Chaumontet, C., Gaudichon, C., and Tomé, D. (2011). Down-regulation of the ubiquitin–proteasome proteolysis system by amino acids and insulin involves the adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin pathways in rat hepatocytes. *Amino Acids* 41, 457–468.

Clark, H., Carling, D., and Saggerson, D. (2004). Covalent activation of heart AMP-activated protein kinase in response to physiological concentrations of long-chain fatty acids: Activation of AMPK by fatty acids. *Eur. J. Biochem.* 271, 2215–2224.

Clifton, P.M., Bastiaans, K., and Keogh, J.B. (2009). High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 19, 548–554.

Coëffier, M., Claeysens, S., Hecketsweiler, B., Lavoine, A., Ducrotté, P., and Déchelotte, P. (2003). Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G266–G273.

- Combris, P., and Martin, P. (2013). L'évolution de la consommation des protéines dans le monde. La croissance de la consommation des protéines animales peut-elle se généraliser ? (Parc des expositions de Paris • Porte de Versailles), p.
- Corr, L., Berstan, R., and Evershed, R. (2007). Optimisation of derivatisation procedures for the determination of delta13C values of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *21*, 3759–3771.
- Cota, D. (2006). Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake. *Science* *312*, 927–930.
- Cota, D., Matter, E.K., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2008). The Role of Hypothalamic Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling in Diet-Induced Obesity. *J. Neurosci.* *28*, 7202–7208.
- Coux, O., and Piechaczyk, M. (2000). Le système ubiquitine/protéasome: un ensemble (de) complexe (s) pour dégrader les protéines.
- Cuervo, A. (2004). Autophagy: Many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* *263*, 55–72.
- Curhan, G., Willett, W., Rimm, E., and Stampfer, M. (1993). A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N. Engl. J. Med.* *328*, 833–838.
- Darmaun, D. (1993). Intestin et métabolisme de la glutamine.
- Darragh, A.J., and Hodgkinson, S.M. (2000). Quantifying the digestibility of dietary protein. *J. Nutr.* *130*, 1850S–1856S.
- De Sousa-Coelho, A.L., Marrero, P.F., and Haro, D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem. J.* *443*, 165–171.
- Deng, D., Yao, K., Chu, W., Li, T., Huang, R., Yin, Y., Liu, Z., Zhang, J., and Wu, G. (2009). Impaired translation initiation activation and reduced protein synthesis in weaned piglets fed a low-protein diet. *J. Nutr. Biochem.* *20*, 544–552.
- Derave, W., Ai, H., Ihlemann, J., Witters, L.A., Kristiansen, S., Richter, E.A., and Ploug, T. (2000). Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes* *49*, 1281–1287.
- Dériaz, O., Fournier, G., Tremblay, A., Després, J.-P., and Bouchard, C. (1992). Lean-body-mass composition and resting energy expenditure before and after long-term overfeeding. *Am. J. Clin. Nutr.* *56*, 840–847.
- Dever, T.E., and Hinnebusch, A.G. (2005). GCN2 Whets the Appetite for Amino Acids. *Mol. Cell* *18*, 141–142.
- Dice, J. (1990). Peptide sequences that target cytosolic protein for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 305–309.

- Du, F., Higginbotham, D.A., and White, B.D. (2000). Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* *130*, 514–521.
- Du, M., Shen, Q.W., Zhu, M.J., and Ford, S.P. (2006). Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *J. Anim. Sci.* *85*, 919–927.
- Dubbelhuis, P.F., and Meijer, A.J. (2002). Hepatic amino acid-dependent signaling is under the control of AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* *521*, 39–42.
- Dunn, W.A. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* *4*, 139–143.
- Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Meléndez-Rodríguez, F., Rodríguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Cárcer, G., Acosta-Iborra, B., Albacete-Albacete, L., Ordóñez, A., Serrano-Oviedo, L., et al. (2012). HIF2 α Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5. *Mol. Cell* *48*, 681–691.
- Endo, M., Kasaoka, S., Takizawa, M., Goto, K., Nakajima, S., Moon, S.-K., Kim, I.-S., Jeong, B.-Y., and Nakamura, S. (2010). Suppressed Fat Accumulation in Rats Fed a Histidine-Enriched Diet. *J. Food Sci. Nutr.* *15*, 1–6.
- Erickson, R.H., and Kim, Y.S. (1990). Digestion and absorption of dietary protein. *Annu. Rev. Med.* *41*, 133–139.
- Eschwege, E., Charles, M.-A., and Basdevant, A. (2012). ObEpi 2012, Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité [Internet]. INSERM; 2012. Disponible sur: http://eipf.bas.rocche.com/fmfiles/re7199006/enquete_obepi_2012/obepi_2012.pdf.
- Escobar, J. (2005). Regulation of cardiac and skeletal muscle protein synthesis by individual branched-chain amino acids in neonatal pigs. *AJP Endocrinol. Metab.* *290*, E612–E621.
- Esposito, A.M., Mateyak, M., He, D., Lewis, M., Sasikumar, A.N., Hutton, J., Copeland, P.R., and Kinzy, T.G. (2010). Eukaryotic Polyribosome Profile Analysis. *J. Vis. Exp.*
- Even, P., and Nicolaidis, S. (1985). Spontaneous and 2DG induced metabolic changes and feeding: The ischemic hypothesis. *Brain Res. Bull.* *15*, 429–435.
- Even, P.C., and Nadkarni, N.A. (2012). Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* *303*, R459–R476.
- Faisy, C., and Taylor, S.J. (2009). Dépense énergétique en réanimation. *Réanimation* *18*, 477–485.
- Faure, M., Moënnnoz, D., Montigon, F., Mettraux, C., Breuillé, D., and Ballèvre, O. (2005). Dietary threonine restriction specifically reduces intestinal mucin synthesis in rats. *J. Nutr.* *135*, 486–491.

- Fereday, A., Gibson, N.R., Cox, M., Pacy, P.J., and Millward, D.J. (1998). Variation in the apparent sensitivity of the insulin-mediated inhibition of proteolysis to amino acid supply determines the efficiency of protein utilization. *Clin. Sci.* 95, 725–733.
- Fernstorn, J., and Wurtman, R. (1972). Brain Serotonin Content: Physiological Regulation by Plasma Neutral Amino Acids. *Science* 178, 414–416.
- Ferrannini, E. (1988). The Theoretical Bases of Indirect Calorimetry: A Review. *Metabolism* 37, 287–301.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (1991). Protein quality evaluation: report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Bethesda, Md., USA 4-8 December 1989 (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013). Dietary protein quality evaluation in human nutrition: report of an FAO expert consultation, 31 March-2 April, 2011, Auckland, New Zealand (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
- Ford, M.C., Gordon, N.P., Howell, A., Green, C.E., Greenspan, L.C., Chandra, M., Mellor, R.G., and Lo, J.C. (2016). Obesity Severity, Dietary Behaviors, and Lifestyle Risks Vary by Race/Ethnicity and Age in a Northern California Cohort of Children with Obesity. *J. Obes.* 2016, 1–10.
- Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Khan, A., Thorens, B., Vaulont, S., and Viollet, B. (2005). Short-Term Overexpression of a Constitutively Active Form of AMP-Activated Protein Kinase in the Liver Leads to Mild Hypoglycemia and Fatty Liver. *Diabetes* 54, 1331–1339.
- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., and Viollet, B. (2006). du métabolisme énergétique par l'AMPK. *MS Médecine Sci.* 22, 381–388.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010a). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* 120, 2355–2369.
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010b). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* 120, 2355–2369.
- Forslund, A.H., Hambraeus, L., Olsson, R.M., El-Khoury, A.E., Yu, Y.-M., and Young, V.R. (1998). The 24-h whole body leucine and urea kinetics at normal and high protein intakes with exercise in healthy adults. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 275, E310–E320.
- Fox, H.L., Pham, P.T., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., and Lynch, C.J. (1998). Amino acid effects on translational repressor 4E-BP1 are mediated primarily by L-leucine in isolated adipocytes. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 275, C1232–C1238.

- de França, S.A., dos Santos, M.P., Przygodda, F., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I.C., Magalhães, D.A., Bezerra, K.S., Colodel, E.M., Flouris, A.D., Andrade, C.M.B., et al. (2016). A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Stimulates Thermogenesis in the Brown Adipose Tissue of Rats via ATF-2. *Lipids* 51, 303–310.
- Frank, J.W., Escobar, J., Suryawan, A., Kimball, S.R., Nguyen, H.V., Jefferson, L.S., and Davis, T.A. (2005). Protein synthesis and translation initiation factor activation in neonatal pigs fed increasing levels of dietary protein. *J. Nutr.* 135, 1374–1381.
- Frank, J.W., Escobar, J., Nguyen, H.V., Jobgen, S.C., Jobgen, W.S., Davis, T.A., and Wu, G. (2007). Oral N-carbamylglutamate supplementation increases protein synthesis in skeletal muscle of piglets. *J. Nutr.* 137, 315–319.
- Freedman, M.R., King, J., and Kennedy, E. (2001). Popular diets: a scientific review (North American Association for the Study of Obesity (NAASO)).
- Freeman, H.J., Kim, Y.S., and Slesinger, M.H. (1979). Protein digestion and absorption in man: normal mechanisms and protein-energy malnutrition. *Am. J. Med.* 67, 1030–1036.
- Freudenberg, A., Petzke, K.J., and Klaus, S. (2012). Dietary l-leucine and l-alanine supplementation have similar acute effects in the prevention of high-fat diet-induced obesity. *Amino Acids* 44, 519–528.
- Friedman, M. (1995). Control of energy intake by energy metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1096–1100.
- Fromentin, C., Azzout-Marniche, D., Tomé, D., Even, P., Luengo, C., Piedcoq, J., Fromentin, G., and Gaudichon, C. (2010). The postprandial use of dietary amino acids as an energy substrate is delayed after the deamination process in rats adapted for 2 weeks to a high protein diet. *Amino Acids* 40, 1461–1472.
- Fu, W.J., Haynes, T.E., Kohli, R., Hu, J., Shi, W., Spencer, T.E., Carroll, R.J., Meininger, C.J., and Wu, G. (2005). Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* 135, 714–721.
- Fulks, R.M., Li, J.B., and Goldberg, A.L. (1975). Effects of insulin, glucose, and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. *J. Biol. Chem.* 250, 290–298.
- Fuller, M., and Tomé, D. (2005). In vivo determination of amino acid bioavailability in humans and model animals. *J. AOAC Int.* 88, 923–934.
- Gaidhu, M.P., and Ceddia, R.B. (2011). The role of adenosine monophosphate kinase in remodeling white adipose tissue metabolism. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 39, 102–108.
- Galluzzi, L., López-Soto, A., Kumar, S., and Kroemer, G. (2016). Caspases Connect Cell-Death Signaling to Organismal Homeostasis. *Immunity* 44, 221–231.
- Gannon, M.C. (1993). The effect of oral casein on hepatic glycogen metabolism in fasted rats. *Metabolism* 42, 649–653.

- Gannon, M.C., and Nuttall, F.Q. (1995). Physiological doses of oral casein affect hepatic glycogen metabolism in normal food-deprived rats. *J. Nutr.* *125*, 1159.
- Gaull, G., Sturman, J., and R  ih  , N. (1972). Development of Mammalian Sulfur Metabolism: Absence of Cystathionase in Human Fetal Tissues. *Pediatr. Res.* *6*.
- Gausserès, N., Mah  , S., Benamouzig, R., Luengo, C., Drouet, H., Rautureau, J., and Tomé, D. (1996). The gastro-ileal digestion of N-labelled pea nitrogen in adult humans. *Br. J. Nutr.* *76*, 75–85.
- Gebhardt, R. (1992). Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* *53*, 275–354.
- Gietzen, D.W. (1993). Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.-Baltim. Springf. THEN BETHESDA-* *123*, 610–610.
- Gietzen, D.W., Ross, C.M., Hao, S., and Sharp, J.W. (2004). Phosphorylation of eIF2 α is involved in the signaling of indispensable amino acid deficiency in the anterior piriform cortex of the brain in rats. *J. Nutr.* *134*, 717–723.
- Gimeno, R.E., and Moller, D.E. (2014). FGF21-based pharmacotherapy – potential utility for metabolic disorders. *Trends Endocrinol. Metab.* *25*, 303–311.
- Gingras, A.-C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 913–963.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003). The Calpain System. *Physiol. Rev.* *83*, 731–801.
- Gonda, D.K., Bachmair, A., W  nning, I., Tobias, J.W., Lane, W.S., and Varshavsky, A. (1989). Universality and structure of the N-end rule. *J. Biol. Chem.* *264*, 16700–16712.
- Gray, G., and Cooper, H. (1971). Protein digestion and absorption. *Gastroenterology* *61*, 535–544.
- Grimble, G.K., Keohane, P.P., Higgins, B.E., Kaminski, M.V., and Silk, D.B.A. (1986). Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clin. Sci.* *71*, 65–69.
- Groppo, R., and Richter, J.D. (2009). Translational control from head to tail. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 444–451.
- Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E., and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* *115*, 739–750.
- Guo, F., and Cavener, D.R. (2007). The GCN2 eIF2 α Kinase Regulates Fatty-Acid Homeostasis in the Liver during Deprivation of an Essential Amino Acid. *Cell Metab.* *5*, 103–114.

Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.

Halton, T.L., and Hu, F.B. (2004). The effects of high protein diets on thermogenesis, satiety and weight loss: a critical review. *J. Am. Coll. Nutr.* 23, 373–385.

Harber, M.P., Schenk, S., Barkan, A.L., and Horowitz, J.F. (2005). Effects of Dietary Carbohydrate Restriction with High Protein Intake on Protein Metabolism and the Somatotrophic Axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5175–5181.

Hardie, D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 117, 5479–5487.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* 6, 1099–1108.

Hasek, B.E., Stewart, L.K., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Black, C., Shin, J., Huypens, P., Malloy, V.L., Plaisance, E.P., et al. (2010). Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299, R728–R739.

Hasek, B.E., Boudreau, A., Shin, J., Feng, D., Hulver, M., Van, N.T., Laque, A., Stewart, L.K., Stone, K.P., Wanders, D., et al. (2013). Remodeling the Integration of Lipid Metabolism Between Liver and Adipose Tissue by Dietary Methionine Restriction in Rats. *Diabetes* 62, 3362–3372.

Hasenour, C.M., Ridley, D.E., Hughey, C.C., James, F.D., Donahue, E.P., Shearer, J., Viollet, B., Foretz, M., and Wasserman, D.H. (2014). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) Effect on Glucose Production, but Not Energy Metabolism, Is Independent of Hepatic AMPK in Vivo. *J. Biol. Chem.* 289, 5950–5959.

Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Carling, D., and Hardie, D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879–27887.

Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., and Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2, 9–19.

Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945.

Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.-B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A. (2004). The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 465–468.

- Helliwell, S.B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M.N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5, 105–118.
- Henagan, T.M., Laeger, T., Navard, A.M., Albarado, D., Noland, R.C., Stadler, K., Elks, C.M., Burk, D., and Morrison, C.D. (2016). Hepatic autophagy contributes to the metabolic response to dietary protein restriction. *Metabolism* 65, 805–815.
- Hinnebusch, A.G. (2005). Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast*. *Annu Rev Microbiol* 59, 407–450.
- Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., and Itoh, N. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Regulates Lipolysis in White Adipose Tissue But Is Not Required for Ketogenesis and Triglyceride Clearance in Liver. *Endocrinology* 150, 4625–4633.
- Hu, C.-A.A., Wu, Z., and Wang, J. (2015). Amino acids and autophagy: their crosstalk, interplay and interlock. *Amino Acids* 47, 2035–2036.
- Huang, X., Hancock, D.P., Gosby, A.K., McMahon, A.C., Solon, S.M.C., Le Couteur, D.G., Conigrave, A.D., Raubenheimer, D., and Simpson, S.J. (2013). Effects of dietary protein to carbohydrate balance on energy intake, fat storage, and heat production in mice. *Obesity* 21, 85–92.
- Hudson, E., Pan, D., James, J., Lucocq, J., Hawley, S., Green, K., Baba, O., Terashima, T., and Hardie, G. (2003). A Novel Domain in AMP-Activated Protein Kinase Causes Glycogen Storage Bodies Similar to Those Seen in Hereditary Cardiac Arrhythmias. *Curr. Biol.* 13, 861–866.
- Hulbert, A.J., and Else, P.L. (2004). Basal metabolic rate: history, composition, regulation, and usefulness. *Physiol. Biochem. Zool.* 77, 869–876.
- Hutson, S.M., Sweatt, A.J., and LaNoue, K.F. (2005). Branched-chain amino acid metabolism: implications for establishing safe intakes. *J. Nutr.* 135, 1557S–1564S.
- Ijichi, C., Matsumura, T., Tsuji, T., and Eto, Y. (2003). Branched-chain amino acids promote albumin synthesis in rat primary hepatocytes through the mTOR signal transduction system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 59–64.
- Itani, S.I., Saha, A.K., Kurowski, T.G., Coffin, H.R., Tornheim, K., and Ruderman, N.B. (2003). Glucose Autoregulates Its Uptake in Skeletal Muscle Involvement of AMP-Activated Protein Kinase. *Diabetes* 52, 1635–1640.
- Jean, C., Rome, S., Mathé, V., Huneau, J.-F., Aattouri, N., Fromentin, G., Achagiotis, C.L., and Tomé, D. (2001). Metabolic evidence for adaptation to a high protein diet in rats. *J. Nutr.* 131, 91–98.

- Jiang, W., Zhu, Z., and Thompson, H.J. (2008). Modulation of the activities of AMP-activated protein kinase, protein kinase B, and mammalian target of rapamycin by limiting energy availability with 2-deoxyglucose. *Mol. Carcinog.* 47, 616–628.
- Jobgen, W., Meininger, C.J., Jobgen, S.C., Li, P., Lee, M.-J., Smith, S.B., Spencer, T.E., Fried, S.K., and Wu, G. (2008). Dietary L-Arginine Supplementation Reduces White Fat Gain and Enhances Skeletal Muscle and Brown Fat Masses in Diet-Induced Obese Rats. *J. Nutr.* 139, 230–237.
- Joint Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation ; [Geneva, 9 - 16 April 2002] (Geneva: WHO).
- Journel, M., Chaumontet, C., Darcel, N., Fromentin, G., and Tome, D. (2012). Brain Responses to High-Protein Diets. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 3, 322–329.
- Jungas, R., Halperin, M., and Brosnan, J. (1992). Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans.docx. *Physiol. Rev.* 72, 419–448.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). THE MOLECULAR MECHANICS OF EUKARYOTIC TRANSLATION. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657–704.
- Kasaoka, S., Tsuboyama-Kasaoka, N., Kawahara, Y., Inoue, S., Tsuji, M., Ezaki, O., Kato, H., Tsuchiya, T., Okuda, H., and Nakajima, S. (2004). Histidine supplementation suppresses food intake and fat accumulation in rats. *Nutrition* 20, 991–996.
- Kasinath, B.S., Mariappan, M.M., Sataranatarajan, K., Lee, M.J., and Feliers, D. (2006). mRNA Translation: Unexplored Territory in Renal Science. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 3281–3292.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T., and Uyeda, K. (2002). Mechanism for Fatty Acid “Sparing” Effect on Glucose-induced Transcription: Regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 277, 3829–3835.
- Kelley, D.E., and Mandarino, L.J. (2000). Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 49, 677–683.
- Kerr, B.J., and Easter, R.A. (1995). Effect of feeding reduced protein, amino acid-supplemented diets on nitrogen and energy balance in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 73, 3000–3008.
- Kharitonkov, A., Shiyanova, T.L., Koester, A., Ford, A.M., Micanovic, R., Galbreath, E.J., Sandusky, G.E., Hammond, L.J., Moyers, J.S., Owens, R.A., et al. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* 115, 1627–1635.
- Kilberg, M.S., Pan, Y.-X., Chen, H., and Leung-Pineda, V. (2005). NUTRITIONAL CONTROL OF GENE EXPRESSION: How Mammalian Cells Respond to Amino Acid Limitation*. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 59–85.

- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2003). GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11, 895–904.
- Kim, E.-K., Miller, I., Aja, S., Landree, L.E., Pinn, M., McFadden, J., Kuhajda, F.P., Moran, T.H., and Ronnett, G.V. (2004). C75, a Fatty Acid Synthase Inhibitor, Reduces Food Intake via Hypothalamic AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 19970–19976.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kim, J., Sands, L., Slebodnik, M., O'Connor, L., and Campbell, W. (2014). Effects of high-protein weight loss diets on fat-free mass changes in older adults: a systematic review. *FASEB J.* 28, 371–375.
- Kimball, S.R. (2002). Regulation of global and specific mRNA translation by amino acids. *J. Nutr.* 132, 883–886.
- Kimball, S.R. (2004). Glucagon Represses Signaling through the Mammalian Target of Rapamycin in Rat Liver by Activating AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 54103–54109.
- Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2006). Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 136, 227S–231S.
- Kimball, S.R., Ravi, S., Gordon, B.S., Dennis, M.D., and Jefferson, L.S. (2015). Amino Acid-Induced Activation of mTORC1 in Rat Liver Is Attenuated by Short-Term Consumption of a High-Fat Diet. *J. Nutr.* 145, 2496–2502.
- Kisselev, L., Ehrenberg, M. ans, and Frolova, L. (2003). Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.* 22, 175–182.
- Koo, S.-H., Flechner, L., Qi, L., Zhang, X., Sreaton, R.A., Jeffries, S., Hedrick, S., Xu, W., Boussouar, F., Brindle, P., et al. (2005). The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437, 1109–1111.
- Kopple, J.D., and Swendseid, M.E. (1975). Evidence that histidine is an essential amino acid in normal and chronically uremic man. *J. Clin. Invest.* 55, 881.
- Kraegen, E.W. (2005). Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *AJP Endocrinol. Metab.* 290, E471–E479.

Krebs, M., Brehm, A., Krssak, M., Anderwald, C., Bernroider, E., Nowotny, P., Roth, E., Chandramouli, V., Landau, B.R., Waldh $\text{\textcircled{d}}$ usl, W., et al. (2003). Direct and indirect effects of amino acids on hepatic glucose metabolism in humans. *Diabetologia* 46, 917–925.

Lacroix, M. (2004). A long-term high-protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R934–R942.

Laeger, T., Reed, S.D., Henagan, T.M., Fernandez, D.H., Taghavi, M., Addington, A., Munzberg, H., Martin, R.J., Hutson, S.M., and Morrison, C.D. (2014a). Leucine acts in the brain to suppress food intake but does not function as a physiological signal of low dietary protein. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R310–R320.

Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014b). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922.

Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014c). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922.

Laeger, T., Henagan, T.M., Albarado, D.C., Redman, L.M., Bray, G.A., Noland, R.C., Münzberg, H., Hutson, S.M., Gettys, T.W., Schwartz, M.W., et al. (2014d). FGF21 is an endocrine signal of protein restriction. *J. Clin. Invest.* 124, 3913–3922.

Laeger, T., Albarado, D.C., Burke, S.J., Trosclair, L., Hedgepeth, J.W., Berthoud, H.-R., Gettys, T.W., Collier, J.J., Münzberg, H., and Morrison, C.D. (2016). Metabolic Responses to Dietary Protein Restriction Require an Increase in FGF21 that Is Delayed by the Absence of GCN2. *Cell Rep.* 16, 707–716.

Lane, M.D., Wolfgang, M., Cha, S.-H., and Dai, Y. (2008). Regulation of food intake and energy expenditure by hypothalamic malonyl-CoA. *Int. J. Obes.* 32, S49–S54.

Laplante, M., and Sabatini, D.M. (2009). An Emerging Role of mTOR in Lipid Biosynthesis. *Curr. Biol.* 19, R1046–R1052.

Laurent, B., Moldawer, L., Young, V., Bistrrian, B., and Blackburn, G. (1984). Whole-body leucine and muscle protein kinetics in rats fed varying protein intakes. *Am. J. Physiol.* 246, 444–451.

Lavrik, I.N. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.* 115, 2665–2672.

Leclerc, I., and Rutter, G. (2004). AMP-Activated Protein Kinase: A New B-Cell Glucose Sensor? *Diabetes* 53, 67–74.

Leib, D.E., and Knight, Z.A. (2015). Re-examination of Dietary Amino Acid Sensing Reveals a GCN2-Independent Mechanism. *Cell Rep.* 13, 1081–1089.

- Lejeune, M.P., Westerterp, K.R., Adam, T.C., Luscombe-Marsh, N.D., and Westerterp-Plantenga, M.S. (2006). Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 89–94.
- Li, J., and Jefferson, L. (1978). Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 544, 351–359.
- Liang, R., Fei, Y., Prasad, P., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T., Hediger, M., Ganpathy, V., and Leibach, F. (1995). Human Intestinal H⁺/Peptide Cotransporter. *J. Biol. Chem.* 270, 6456–6463.
- Liddle, R.A. (1997). Cholecystokinin cells. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 221–242.
- Lin, X. (2005). Hepatic triglyceride contents are genetically determined in mice: results of a strain survey. *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 288, G1179–G1189.
- Liu, Y.-W., Zhang, L., Li, Y., Cheng, Y.-Q., Zhu, X., Zhang, F., and Yin, X.-X. (2015). Activation of mTOR signaling mediates the increased expression of AChE in high glucose condition: in vitro and in vivo evidences. *Mol. Neurobiol.*
- Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Yonezawa, K., and Avruch, J. (2005). Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol. CB* 15, 702–713.
- López-Lastra, M., Rivas, A., and Barría, M.I. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res.* 38, 121–146.
- Ludwig, D.S., Majzoub, J.A., Al-Zahrani, A., Dallal, G.E., Blanco, I., and Roberts, S.B. (1999). High glycemic index foods, overeating, and obesity. *Pediatrics* 103, e26–e26.
- Luo, Z., Saha, A.K., Xiang, X., and Ruderman, N.B. (2005). AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 69–76.
- Lynch, C.J. (2006). Leucine in food mediates some of the postprandial rise in plasma leptin concentrations. *AJP Endocrinol. Metab.* 291, E621–E630.
- Lynch, C.J., Hutson, S.M., Patson, B.J., Vaval, A., and Vary, T.C. (2002). Tissue-specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 283, E824–E835.
- Macfarlane, G., and Macfarlane, S. (2012). Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *J. AOAC Int.* 95, 50–60.
- MacLennan, P.A., Brown, R.A., and Rennie, M.J. (1987). A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 215, 187–191.

- MacLeod, E.L., and Ney, D.M. (2010). Prise en charge nutritionnelle de la phénylcétonurie. *Ann. Nestlé Ed Fr.* 68, 60–71.
- Maire, I. (2012). Le système lysosomal dans la protéolyse : panorama des maladies lysosomiales. *Bull Acad Natle Méd* 196, 1561–1574.
- Malloy, V.L., Krajcik, R.A., Bailey, S.J., Hristopoulos, G., Plummer, J.D., and Orentreich, N. (2006). Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. *Aging Cell* 5, 305–314.
- Mandayam, S., and Mitch, W.E. (2006). Dietary protein restriction benefits patients with chronic kidney disease (Review Article). *Nephrology* 11, 53–57.
- Mariotti, F., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Daré, S., Gaudichon, C., and Tomé, D. (1999). Nutritional value of [15N]-soy protein isolate assessed from ileal digestibility and postprandial protein utilization in humans. *J. Nutr.* 129, 1992–1997.
- Markan, K.R., Naber, M.C., Ameka, M.K., Anderegg, M.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Mohammadi, M., and Potthoff, M.J. (2014). Circulating FGF21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes* 63, 4057–4063.
- Marmonier, C., Chapelot, D., and Louis-Sylvestre, J. (2000). Effects of macronutrient content and energy density of snacks consumed in a satiety state on the onset of the next meal. *Appetite* 34, 161–168.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol.* 10, 1247–1255.
- Masanes, R., Fernandez-Lopez, J., Alemany, M., Remesar, X., and Rafecas, I. (1999). Effect of dietary protein content on tissue protein synthesis rates in Zucker lean rats. *Nutr. Res.* 19, 1017–1026.
- Mashili, F.L., Austin, R.L., Deshmukh, A.S., Fritz, T., Caidahl, K., Bergdahl, K., Zierath, J.R., Chibalin, A.V., Moller, D.E., Kharitononkov, A., et al. (2011). Direct effects of FGF21 on glucose uptake in human skeletal muscle: implications for type 2 diabetes and obesity. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27, 286–297.
- Matthews, D., Schwarz, H., Yang, R., Motil, Y., Young, V., and Bier, D. (1982). Relationship of Plasma Leucine and a-Ketoisocaproate During a L-[1-13C]Leucine Infusion in Man: A Method for Measuring Human Intracellular Leucine Tracer Enrichment. *Metabolism* 31, 1105–1112.
- Maurin, A.-C., Jousse, C., Averous, J., Parry, L., Bruhat, A., Cherasse, Y., Zeng, H., Zhang, Y., Harding, H.P., Ron, D., et al. (2005). The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab.* 1, 273–277.

- Maurin, A.-C., Benani, A., Lorsignol, A., Brenachot, X., Parry, L., Carraro, V., Guissard, C., Averous, J., Jousse, C., Bruhat, A., et al. (2014). Hypothalamic eIF2 α Signaling Regulates Food Intake. *Cell Rep.* 6, 438–444.
- McCarty, M.F. (2016). The moderate essential amino acid restriction entailed by low-protein vegan diets may promote vascular health by stimulating FGF21 secretion. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*
- Meijer, A.J., and Dubbelhuis, P.F. (2004). Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 397–403.
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J.H.P.M., Dubbelhuis, P.F., Helmond, M.T.J., Codogno, P., and Meijer, A.J. (2006). AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Autophagic Proteolysis. *J. Biol. Chem.* 281, 34870–34879.
- Mellinkoff, S., and Frankland, M. (1956). Relationship Between Serum Amino Acid Concentration and Fluctuations in Appetite. *J. Appl. Physiol.* 8, 535–538.
- Menaker, L., and Navia, J.M. (1973). Appetite regulation in the rat under various physiological conditions: the role of dietary protein and calories. *J. Nutr.* 103, 347–352.
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2010). permeabilité et antigènes MENARD 2010.pdf. *Mucosal Immunology* 3, 247–259.
- Menezes, A.L., Pereira, M.P., Buzelle, S.L., dos Santos, M.P., de França, S.A., Baviera, A.M., Andrade, C.M.B., Garófalo, M.A.R., Kettelhut, I. do C., Chaves, V.E., et al. (2013). A low-protein, high-carbohydrate diet increases de novo fatty acid synthesis from glycerol and glycerokinase content in the liver of growing rats. *Nutr. Res.* 33, 494–502.
- Meyuhas, O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* 267, 6321–6330.
- Mikkelsen, P.B., Toubro, S., and Astrup, A. (2000). Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *Am. J. Clin. Nutr.* 72, 1135–1141.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574.
- Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Lee, S., Suzuki, A., and Okamoto, S. (2008). Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 24, 786–790.
- Momcilovic, M., Hong, S.-P., and Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in Vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 25336–25343.

- Morens, C., Bos, C., Pueyo, M.E., Benamouzig, R., Gausserès, N., Luengo, C., Tomé, D., and Gaudichon, C. (2003). Increasing habitual protein intake accentuates differences in postprandial dietary nitrogen utilization between protein sources in humans. *J. Nutr.* *133*, 2733–2740.
- Morrison, C., and Laeger, T. (2015). Protein-dependent regulation of feeding and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *26*, 256–262.
- Morrison, C.D., Xi, X., White, C.L., Ye, J., and Martin, R.J. (2007). Amino acids inhibit *AgRP* gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *AJP Endocrinol. Metab.* *293*, E165–E171.
- Morrison, C.D., Reed, S.D., and Henagan, T.M. (2012). Homeostatic regulation of protein intake: in search of a mechanism. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* *302*, R917–R928.
- Morris-Stiff, G., and Feldstein, A.E. (2010). Fibroblast growth factor 21 as a biomarker for NAFLD: Integrating pathobiology into clinical practice. *J. Hepatol.* *53*, 795–796.
- Mottillo, E.P., Desjardins, E.M., Crane, J.D., Smith, B.K., Green, A.E., Ducommun, S., Henriksen, T.I., Rebalka, I.A., Razi, A., Sakamoto, K., et al. (2016). Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. *Cell Metab.* *24*, 118–129.
- Munday, M.R., Milic, M.R., Takhar, S., Holness, M.J., and Sugden, M.C. (1991). The short-term regulation of hepatic acetyl-CoA carboxylase during starvation and re-feeding in the rat. *Biochem J* *280*, 733–737.
- Muoio, D., Seefeld, K., Witters, L., and Coleman, R. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* *338*, 783–791.
- Nadkarni, N.A., Chaumontet, C., Azzout-Marniche, D., Piedcoq, J., Fromentin, G., Tomé, D., and Even, P.C. (2013). The Carbohydrate Sensitive Rat as a Model of Obesity. *PLoS ONE* *8*, e68436.
- Nakajima, S., Tanaka, N., Hamada, M., Tsuchiya, T., and Okuda, H. (2001). Correlation between energy and histidine intake in female living in Setouchi area. *J Jpn Soc Stud Obes* *7*, 276–282.
- Nakashima, K., Yakabe, Y., Ishida, A., Yamazaki, M., and Abe, H. (2007). Suppression of myofibrillar proteolysis in chick skeletal muscles by α -ketoisocaproate. *Amino Acids* *33*, 499–503.
- Nelson, D., and Cox, M. (2013). *CourseSmart International E-Book for Principles of Biochemistry* (Palgrave Macmillan).
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates mTOR and Autophagy. *Cell* *136*, 521–534.

- Nilsson, M., Holst, J.J., and Björck, I.M. (2007). Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 996–1004.
- Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M., and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim. Biophys. Acta* 203–206.
- Nixon, S., and Mawer, G. (1970). The digestion and absorption of protein in man. *Br. J. Nutr.* 24, 227–240.
- Noda, N.N., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2009). ATG Systems from the Protein Structural Point of View. *Chem. Rev.* 109, 1587–1598.
- Obeid, O.A., Boukarim, L.K., Al Awar, R.M., and Hwalla, N. (2006). Postprandial glycogen and lipid synthesis in prednisolone-treated rats maintained on high-protein diets with varied carbohydrate levels. *Nutrition* 22, 288–294.
- Oberer, M., Marintchev, A., and Wagner, G. (2005). Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *Genes Dev.* 19, 2212–2223.
- Ögmundsdóttir, M.H., Heublein, S., Kazi, S., Reynolds, B., Visvalingam, S.M., Shaw, M.K., and Goberdhan, D.C.I. (2012). Proton-Assisted Amino Acid Transporter PAT1 Complexes with Rag GTPases and Activates TORC1 on Late Endosomal and Lysosomal Membranes. *PLoS ONE* 7, e36616.
- Ono, H., Pocai, A., Wang, Y., Sakoda, H., Asano, T., Backer, J.M., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2008). Activation of hypothalamic S6 kinase mediates diet-induced hepatic insulin resistance in rats. *J. Clin. Invest.*
- Overton, J.M. (2010). Phenotyping small animals as models for the human metabolic syndrome: thermoneutrality matters. *Int. J. Obes.* 34, S53–S58.
- Palii, S.S., Kays, C.E., Deval, C., Bruhat, A., Fafournoux, P., and Kilberg, M.S. (2009). Specificity of amino acid regulated gene expression: analysis of genes subjected to either complete or single amino acid deprivation. *Amino Acids* 37, 79–88.
- Palou, M., Priego, T., Sánchez, J., Villegas, E., Rodríguez, A.M., Palou, A., and Picó, C. (2008). Sequential changes in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue and liver in response to fasting. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 456, 825–836.
- Patel, M.S., and Srinivasan, M. (2011). Metabolic Programming in the Immediate Postnatal Life. *Ann. Nutr. Metab.* 58, 18–28.
- Pesta, D.H., and Samuel, V.T. (2014). A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. *Nutr. Metab.* 11, 1–8.

- Peters, J.C., and Harper, A.E. (1985). Adaptation of rats to diets containing different levels of protein: effects on food intake, plasma and brain amino acid concentrations and brain neurotransmitter metabolism. *J. Nutr.* *115*, 382–398.
- Petzke, K.J., Riese, C., and Klaus, S. (2007). Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats. *J. Nutr. Biochem.* *18*, 400–407.
- Pichon, L., Huneau, J.-F., Fromentin, G., and Tomé, D. (2006). A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J. Nutr.* *136*, 1256–1260.
- Planavila, A., Redondo-Angulo, I., Ribas, F., Garrabou, G., Casademont, J., Giralt, M., and Villarroya, F. (2015). Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc. Res.* *106*, 19–31.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S., Jennings, I., Campbell, D., Witters, L., Parker, M., et al. (2003). AMPK B Subunit Targets Metabolic Stress Sensing to Glycogen. *Curr. Biol.* *13*, 867–871.
- Poortmans, J., and Delalieux, O. (2000). Do Regular High Protein Diets Have Potential Health Risks on Kidney Function in Athletes? *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* *10*, 28–38.
- Pritchett, A.M., Foreyt, J.P., and Mann, D.L. (2005). Treatment of the metabolic syndrome: the impact of lifestyle modification. *Curr. Atheroscler. Rep.* *7*, 95–102.
- Proud, C.G. (2004). mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *313*, 429–436.
- Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 785–789.
- Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the Eukaryotic Cell. *Eukaryot. Cell* *1*, 11–21.
- Rivas, D.A., Yaspelkis, B.B., Hawley, J.A., and Lessard, S.J. (2009). Lipid-induced mTOR activation in rat skeletal muscle reversed by exercise and 5'-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside. *J. Endocrinol.* *202*, 441–451.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: the PEST Hypothesis. *Science* *234*, 364–368.
- Romano, P.R., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, X., Wang, Q., Taylor, D.R., Zhang, F., Herring, C., Mathews, M.B., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2 α kinases PKR and GCN2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2282–2297.

- Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Fernandes, M.F.A., Rocco, S.A., Marin, R.M., Morari, J., Souza, K.K., Dias, M.M., Gomes-Marcondes, M.C., Gontijo, J.A.R., et al. (2008). A Central Role for Neuronal AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in High-Protein Diet-Induced Weight Loss. *Diabetes* 57, 594–605.
- Rose, W. (1957). The amino acid requirements of adult man. *Nutr Abstr Rev* 27, 631–647.
- Rozin, P. (1968). Are carbohydrates and protein separately regulated? *J. Comp. Physiol. Psychol.* 65, 23–29.
- Ruan, Z., Yang, Y., Wen, Y., Zhou, Y., Fu, X., Ding, S., Liu, G., Yao, K., Wu, X., Deng, Z., et al. (2014). Metabolomic analysis of amino acid and fat metabolism in rats with l-tryptophan supplementation. *Amino Acids*.
- Russell, R., Bergeron, R., Shulman, G., and Young, L. (1999). Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 277, 643–649.
- Sacks, F.M., Bray, G.A., Carey, V.J., Smith, S.R., Ryan, D.H., Anton, S.D., McManus, K., Champagne, C.M., Bishop, L.M., Laranjo, N., et al. (2009). Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N. Engl. J. Med.* 360, 859–873.
- Sakamoto, K., McCarthy, A., Smith, D., Green, K.A., Hardie, D.G., Ashworth, A., and Alessi, D.R. (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J.* 24, 1810–1820.
- Salas-Marco, J., and Bedwell, D.M. (2004). GTP Hydrolysis by eRF3 Facilitates Stop Codon Decoding during Eukaryotic Translation Termination. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7769–7778.
- Salway, J. (2013). *Metabolism at a Glance*.
- Samms, R.J., Murphy, M., Fowler, M.J., Cooper, S., Emmerson, P., Coskun, T., Adams, A.C., Kharitonov, A., Ebling, F.J.P., and Tsintzas, K. (2015). Dual effects of fibroblast growth factor 21 on hepatic energy metabolism. *J. Endocrinol.* 227, 37–47.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem. J.* 403, 139.
- dos Santos, M.P., Batistela, E., Pereira, M.P., Paula-Gomes, S., Zanon, N.M., Kettelhut, I. do C., Karatzaferi, C., Andrade, C.M.B., de França, S.A., Baviera, A.M., et al. (2016). Higher insulin sensitivity in EDL muscle of rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet inhibits the caspase-3 and ubiquitin-proteasome proteolytic systems but does not increase protein synthesis. *J. Nutr. Biochem.* 34, 89–98.

- Sarbasov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* *14*, 1296–1302.
- Sarruf, D.A., Thaler, J.P., Morton, G.J., German, J., Fischer, J.D., Ogimoto, K., and Schwartz, M.W. (2010). Fibroblast Growth Factor 21 Action in the Brain Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes* *59*, 1817–1824.
- Sassi, F. (2010). L'obésité: Tendances passées et projections pour l'avenir. L'obésité et l'économie de la prévention: objectif santé. OCDE.
- Schwarz, J., Tomé, D., Baars, A., Hooiveld, G.J.E.J., and Müller, M. (2012). Dietary Protein Affects Gene Expression and Prevents Lipid Accumulation in the Liver in Mice. *PLoS ONE* *7*, e47303.
- Scott, R.C., Schuldiner, O., and Neufeld, T.P. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell* *7*, 167–178.
- Shaw, R.J. (2005). The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. *Science* *310*, 1642–1646.
- Shigemitsu, K., Tsujishita, Y., Miyake, H., Hidayat, S., Tanaka, N., Hara, K., and Yonezawa, K. (1999). Structural requirement of leucine for activation of p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* *447*, 303–306.
- Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* *306*, 990–995.
- Sikalidis, A.K., Lee, J.-I., and Stipanuk, M.H. (2011). Gene expression and integrated stress response in HepG2/C3A cells cultured in amino acid deficient medium. *Amino Acids* *41*, 159–171.
- Simpson, S.J., and Raubenheimer, D. (2005). Obesity: the protein leverage hypothesis. *Obes. Rev.* *6*, 133–142.
- Sinclair, L.V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y.-B., Taylor, P.M., and Cantrell, D.A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. *Nat. Immunol.* *14*, 500–508.
- Singh, M., Shin, Y.-K., Yang, X., Zehr, B., Chakrabarti, P., and Kandror, K.V. (2015). 4E-BPs Control Fat Storage by Regulating the Expression of Egr1 and ATGL. *J. Biol. Chem.* *290*, 17331–17338.
- Skov, A.R., Toubro, S., Rønn, B., Holm, L., and Astrup, A. (1999). Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int. J. Obes.* *23*, 528–536.
- Solon-Biet, S.M., McMahon, A.C., Ballard, J.W.O., Ruohonen, K., Wu, L.E., Cogger, V.C., Warren, A., Huang, X., Pichaud, N., Melvin, R.G., et al. (2014). The Ratio of Macronutrients, Not Caloric Intake, Dictates Cardiometabolic Health, Aging, and Longevity in Ad Libitum-Fed Mice. *Cell Metab.* *19*, 418–430.

- Sood, R., Porter, A., Olsen, D., Cavener, D., and Wek, R. (2000). A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α . *Genetics* 154(2), 787–801.
- Stepien, M., Gaudichon, C., Azzout-Marniche, D., Fromentin, G., Tome, D., and Even, P. (2010). Postprandial Nutrient Partitioning but Not Energy Expenditure Is Modified in Growing Rats during Adaptation to a High-Protein Diet. *J. Nutr.* 140, 939–945.
- Stepien, M., Gaudichon, C., Fromentin, G., Even, P., Tomé, D., and Azzout-Marniche, D. (2011). Increasing Protein at the Expense of Carbohydrate in the Diet Down-Regulates Glucose Utilization as Glucose Sparing Effect in Rats. *PLoS ONE* 6, e14664.
- Steyn, N.P., Mchiza, Z., Hill, J., Davids, Y.D., Venter, I., Hinrichsen, E., Opperman, M., Rumbelow, J., and Jacobs, P. (2014). Nutritional contribution of street foods to the diet of people in developing countries: a systematic review. *Public Health Nutr.* 17, 1363–1374.
- Stoll, B., Henry, J., Reeds, P.J., Yu, H., Jahoor, F., and Burrin, D.G. (1998). Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.* 128, 606–614.
- Stone, K.P., Wanders, D., Orgeron, M., Cortez, C.C., and Gettys, T.W. (2014). Mechanisms of increased in vivo insulin sensitivity by dietary methionine restriction in mice. *Diabetes* 63, 3721–3733.
- Sturman, J., Gaull, G., and Räihä, N. (1970). Absence of Cystathionase in Human Fetal Liver: Is Cystine Essential? *Science* 74–76.
- Suchankova, G., Tekle, M., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Clarke, S.D., and Gettys, T.W. (2005). Dietary polyunsaturated fatty acids enhance hepatic AMP-activated protein kinase activity in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 851–858.
- Swick, R., and Benevenga, N. (1977). Labile Protein Reserves and Protein Turnover. *J. Dairy Sci.* 60, 505–515.
- Taillandier, D., Guezennec, C.-Y., Patureau-Mirand, P., Bigard, X., Arnal, M., and Attaix, D. (1996). A high protein diet does not improve protein synthesis in the nonweight-bearing rat tibialis anterior muscle. *J. Nutr.* 126, 266–272.
- Taylor, P.M. (2014). Role of amino acid transporters in amino acid sensing. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 223S–230S.
- Tischler, M.E., Desautels, M., and Goldberg, A.L. (1982). Does leucine, leucyl-tRNA, or some metabolite of leucine regulate protein synthesis and degradation in skeletal and cardiac muscle. *J Biol Chem* 257, 1613–1621.
- Tremblay, A., and Chaput, J. (2008). About unsuspected potential determinants of obesity. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 33, 791–796.
- Twombly, J., and Meyer, J. (1961). Endogenous nitrogen secretions into the digestive tract. *J. Nutr.* 74, 453–460.

- Uno, K., Yamada, T., Ishigaki, Y., Imai, J., Hasegawa, Y., Sawada, S., Kaneko, K., Ono, H., Asano, T., Oka, Y., et al. (2015). A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nat. Commun.* *6*, 7940.
- Valentine, R.J., Coughlan, K.A., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2014). Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* *562*, 62–69.
- Vandanmagsar, B., Warfel, J.D., Wicks, S.E., Ghosh, S., Salbaum, J.M., Burk, D., Dubuisson, O.S., Mendoza, T.M., Zhang, J., Noland, R.C., et al. (2016). Impaired Mitochondrial Fat Oxidation Induces FGF21 in Muscle. *Cell Rep.* *15*, 1686–1699.
- Velasco, G., Geelen, M.J., and Guzmán, M. (1997). Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* *337*, 169–175.
- Veldhorst, M., Smeets, A., Soenen, S., Hochstenbach-Waelen, A., Hursel, R., Diepvens, K., Lejeune, M., Luscombe-Marsh, N., and Westerterp-Plantenga, M. (2008). Protein-induced satiety: Effects and mechanisms of different proteins. *Physiol. Behav.* *94*, 300–307.
- Veldhorst, M.A.B., Westerterp, K.R., and Westerterp-Plantenga, M.S. (2012). Gluconeogenesis and protein-induced satiety. *Br. J. Nutr.* *107*, 595–600.
- Viana, R., Aguado, C., Esteban, I., Moreno, D., Viollet, B., Knecht, E., and Sanz, P. (2008). Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *369*, 964–968.
- Viollet, B., Foretz, M., Guigas, B., Horman, S., Dentin, R., Bertrand, L., Hue, L., and Andreelli, F. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J. Physiol.* *574*, 41–53.
- Viollet, B., Mounier, R., Leclerc, J., Yazigi, A., Foretz, M., and Andreelli, F. (2007). Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes Metab.* *33*, 395–402.
- Viollet, B., Foretz, M., and Schlattner, U. (2014). Bypassing AMPK Phosphorylation. *Chem. Biol.* *21*, 567–569.
- Wang, M. -y. (2004). Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *AJP Endocrinol. Metab.* *288*, E216–E221.
- Wang, X., Qiao, S., Yin, Y., Yue, L., Wang, Z., and Wu, G. (2007). A deficiency or excess of dietary threonine reduces protein synthesis in jejunum and skeletal muscle of young pigs. *J. Nutr.* *137*, 1442–1446.

- Watford, M., and Wu, G. (2005). Glutamine metabolism in uricotelic species: variation in skeletal muscle glutamine synthetase, glutaminase, glutamine levels and rates of protein synthesis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *140*, 607–614.
- Watt, M.J., Steinberg, G.R., Chen, Z.-P., Kemp, B.E., and Febbraio, M.A. (2006). Fatty acids stimulate AMP-activated protein kinase and enhance fatty acid oxidation in L6 myotubes: Fatty acid activation of AMPK. *J. Physiol.* *574*, 139–147.
- Weiner, I.D., Mitch, W.E., and Sands, J.M. (2015). Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 1444–1458.
- Weir, J. de V. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol.* *109*, 1.
- Wessels, A.G., Kluge, H., Hirche, F., Kiowski, A., Schutkowski, A., Corrent, E., Bartelt, J., König, B., and Stangl, G.I. (2016). High Leucine Diets Stimulate Cerebral Branched-Chain Amino Acid Degradation and Modify Serotonin and Ketone Body Concentrations in a Pig Model. *PLOS ONE* *11*, e0150376.
- Westerterp, K.R. (2004). Diet induced thermogenesis. *Nutr. Metab.* *1*, 1.
- Westerterp-Plantenga, M.S. (2008). Protein intake and energy balance. *Regul. Pept.* *149*, 67–69.
- Westerterp-Plantenga, M.S., Lejeune, M.P.G.M., Nijs, I., van Ooijen, M., and Kovacs, E.M.R. (2004). High protein intake sustains weight maintenance after body weight loss in humans. *Int. J. Obes.* *28*, 57–64.
- Willett, W.C. (1998). Is dietary fat a major determinant of body fat? *Am. J. Clin. Nutr.* *67*, 556S–562S.
- Winder, W.W., Wilson, H.A., Hardie, D.G., Rasmussen, B.B., Hutber, C.A., Call, G.B., Clayton, R.D., Conley, L.M., Yoon, S., and Zhou, B. (1997). Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A. *J. Appl. Physiol.* *82*, 219–225.
- Wojtaszewski, J.F., Jørgensen, S.B., Hellsten, Y., Hardie, D.G., and Richter, E.A. (2002). Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in ratskeletal muscle. *Diabetes* *51*, 284–292.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* *37*, 1–17.
- Wu, G. (2016). Dietary protein intake and human health. *Food Funct* *7*, 1251–1265.
- Wu, G., Knabe, D.A., and Kim, S.W. (2004). Arginine nutrition in neonatal pigs. *J. Nutr.* *134*, 2783S–2790S.
- Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M., and Zou, M.-H. (2007). Activation of Protein Phosphatase 2A by Palmitate Inhibits AMP-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 9777–9788.

- Wykes, L.J., Fiorotto, M., Burrin, D.G., Del Rosario, M., and others (1996). Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *J. Nutr.* *126*, 1481.
- Xia, Y., Wen, H.Y., Young, M.E., Guthrie, P.H., Taegtmeier, H., and Kellems, R.E. (2003). Mammalian Target of Rapamycin and Protein Kinase A Signaling Mediate the Cardiac Transcriptional Response to Glutamine. *J. Biol. Chem.* *278*, 13143–13150.
- Xu, X., Hu, J., McGrath, B.C., and Cavener, D.R. (2013). GCN2 regulates the CCAAT enhancer binding protein beta and hepatic gluconeogenesis. *AJP Endocrinol. Metab.* *305*, E1007–E1017.
- Yao, K., Yin, Y.-L., Chu, W., Liu, Z., Deng, D., Li, T., Huang, R., Zhang, J., Tan, B., Wang, W., et al. (2008). Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J. Nutr.* *138*, 867–872.
- Ye, J., Kumanova, M., Hart, L., Sloane, K., Zhang, A., De Panis, D., Bobrnikova-Marjon, E., Diehl, J., Ron, D., and Koumenis, C. (2010). The GCN2-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J.* *29*, 2082–2096.
- Yoon, M.-S. (2016). The Emerging Role of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism. *Nutrients* *8*, 405.
- Yoshizawa, F., Kimball, S.R., Vary, T.C., and Jefferson, L.S. (1998). Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* *275*, E814–E820.
- Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H., Brecher, P., Ruderman, N.B., and Cohen, R.A. (2004). AMP-activated Protein Kinase Is Required for the Lipid-lowering Effect of Metformin in Insulin-resistant Human HepG2 Cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 47898–47905.
- Zhang, Y., Guo, K., LeBlanc, R.E., Loh, D., Schwartz, G.J., and Yu, Y.-H. (2007). Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-Induced Obesity and Improves Glucose and Cholesterol Metabolism in Mice via Multimechanisms. *Diabetes* *56*, 1647–1654.
- Zhu, S., Ma, L., Wu, Y., Ye, X., Zhang, T., Zhang, Q., Rasoul, L.M., Liu, Y., Guo, M., Zhou, B., et al. (2014). FGF21 treatment ameliorates alcoholic fatty liver through activation of AMPK-SIRT1 pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *46*, 1041–1048.
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase. *Science* *334*, 678–683.

Titre : Rôle des acides aminés dans la limitation de l'adiposité sous régime hyperprotéique.

Mots clés : Nutrition-Acide aminé-Calorimétrie indirecte-AMPK-GCN2-FGF21

Résumé : Plusieurs études ont montré que certaines kinases situées dans le foie, « *mammalian target of rapamycin* » (mTOR), « *adenosine monophosphate-activated protein kinase* » (AMPK) et « *general control non-depressible kinase 2* » (GCN2) répondent à la disponibilité en acides aminés.

L'objectif de nos études a été de préciser le rôle de deux de ces voies, l'AMPK et GCN2, dans les adaptations du métabolisme énergétique et de la synthèse protéique en réponse aux variations en protéines du régime. Pour cela, des souris de type sauvage et des souris KO n'exprimant plus la voie AMPK ou GCN2 dans le foie ont été nourries pendant trois semaines avec un régime faible, normal ou fort en protéines. Les analyses ont montré que les souris KO-AMPK foie spécifique et nourries sous régime normoprotéique adaptent leur métabolisme hépatique notamment en sécrétant le facteur fibroblastique FGF21 ce qui leur permet de compenser l'absence d'AMPK et de présenter des profils d'oxydation normaux.

Au contraire, les souris KO-AMPK foie spécifique nourries avec des régimes faibles ou forts en protéines présentent des altérations des profils d'oxydation des lipides et des glucides liées à une absence de modification du métabolisme hépatique.

La délétion de GCN2 dans le foie, quant à elle, n'a d'effet que sous régime faible en protéines : les souris KO-GCN2 foie spécifique présentent une plus faible oxydation lipidique et une plus forte oxydation glucidique que les souris sauvages en période postprandiale dû à l'absence d'induction de la sécrétion de FGF21.

Concernant le métabolisme des protéines, les kinases GCN2 et AMPK ne semblent pas impliquées dans l'intensité du flux de synthèse protéique dans le foie et en périphérie dans le muscle en période postprandiale.

En conclusion, ces travaux montrent que les délétions de l'AMPK et de GCN2 hépatiques affectent le métabolisme énergétique mais pas le métabolisme protéique et que les conséquences dépendent de la composition du régime.

Title : Role of dietary amino acids in the limitation of adiposity under a high protein diet.

Keywords : Nutrition-Amino acid-Indirect calorimetry-AMPK-GCN2-FGF21

Abstract : Several studies have reported that some kinases located in the liver respond to the availability of amino acids. These kinases are mammalian target of rapamycin (mTOR), "adenosine monophosphate-activated protein kinase" (AMPK) and "general control non-depressible kinase 2" (GCN2).

The aim of our study was to clarify the role of two of these signaling pathways, AMPK and GCN2 in the adaptations of energy and protein metabolism in response to the modulation of dietary protein content. Wild-type and liver AMPK-deficient or liver GCN2-deficient mice were fed either a low, a normal or high protein diet during three weeks. Analyses showed that liver AMPK-deficient mice fed under a normo-protein diet exhibit an adaptation of liver metabolism and secrete FGF21 which enables them to have normal postprandial oxidation profiles.

In contrast, liver AMPK-deficient mice fed a low or a high protein diet exhibit an alteration in postprandial oxidation profiles. The deletion of GCN2 in the liver only has an effect under low protein diet as liver GCN2 deficient mice have a lower lipid oxidation and a higher carbohydrate oxidation linked to the absence of FGF21 secretion. Concerning protein metabolism, AMPK and GCN2 do not seem to be involved in protein synthesis rate in the postprandial period in the liver and periphery in the postprandial muscle. In conclusion, these studies show that hepatic AMPK and GCN2 deletions affect energy metabolism, but not protein metabolism and that the consequences depend on diet composition.