

Évaluation de l'intérêt nutritionnel d'isolats de protéines de colza chez le rat et l'Homme : application à la prévention du syndrome métabolique

Dominique HERMIER¹
Jean-François HUNEAU¹
Daniel TOMÉ¹
François MARIOTTI²

¹ Unité 914,
AgroParisTech,
Inra,
Physiologie de la Nutrition et du Comportement
Alimentaire,
16, rue Claude Bernard,
75005 Paris cedex
² UFR de Biologie et nutrition humaines,
AgroParisTech,
16, rue Claude Bernard,
75005 Paris
<francois.mariotti@agroparistech.fr>

Abstract: Plant protein have long been opposed to animal protein because some plant protein present a relative mismatch between their amino acid pattern and human requirements for the renewal of body protein. Nevertheless, beyond its theoretical relevance to match the metabolic demand for protein metabolism, the amino acid pattern of dietary protein may also be of importance in the nutritional prevention of certain metabolic diseases. Of major public health concern is the metabolic syndrome, a cluster of risk factors associating obesity, insulin resistance, endothelial dysfunction, and low-grade inflammation. Two amino acids may be of importance in the pathophysiology of the metabolic syndrome: cysteine, the glutathione precursor, and arginine, the nitric oxide precursor. In this context, rapeseed protein, which is rich in cysteine and a good source of arginine, is an attractive candidate for studying the potential of dietary protein to prevent insulin resistance and related metabolic/physiological abnormalities in the setting of the metabolic syndrome. After having presented a study demonstrating the high postprandial nitrogen utilization of rapeseed protein in humans, this review report two studies from our group showing that 1) rapeseed protein prevents the onset of insulin resistance induced by a diet rich in saturated fatty acids and sucrose in rats ; 2) rapeseed protein alleviates the postprandial vascular endothelial dysfunction and oxidative stress coming after a meal rich in saturated fatty acids and sucrose. The beneficial preventive effects can be accounted for, at least to some extent, by the high cysteine and arginine content of the rapeseed protein. Studies are urgently needed to assess the beneficial effect of this emerging protein source in humans.

Key words: rapeseed protein, metabolic syndrome, arginine, cysteine, vascular endothelial function, oxidative stress

Le critère primaire de qualité nutritionnelle des protéines correspond à leur capacité à couvrir le besoin en acides aminés indispensables, défini pour le renouvellement des protéines corporelles (AFSSA, 2008 ; Mariotti et Tomé, 1999 ; Young et Pellett, 1994). À ce titre, les protéines végétales ont souvent souffert de la comparaison aux protéines animales, en raison d'une richesse et d'un profil en acides aminés suboptimaux en termes de couverture des besoins en situation d'apport quantitativement critique. Ce n'est pas le cas des protéines de colza, réputées pour leur forte teneur et leur profil « équilibré » en acides aminés indispensables. Les protéines de colza sont donc considérées depuis longtemps comme une source potentielle intéressante pour l'alimentation humaine (Sarwar *et al.*, 1978), mais ce n'est que récemment que leur valeur protéique a été étudiée directement chez l'Homme.

Néanmoins, cette composante de la valeur nutritionnelle des protéines reste un critère primaire de qualité qui offre peu de pertinence dans la situation de forte consommation

protéique des pays industrialisés, comme la France (Mariotti et Tomé, 2003). Dans ce contexte, l'étude de la valeur nutritionnelle doit plutôt s'attacher aux répercussions de la consommation protéique sur des critères de santé, à long terme, liés à l'initiation et la progression des maladies dites de civilisation (maladies cardiovasculaires, diabète de type II, etc.). Un ensemble de données d'importance croissante indique que les protéines alimentaires, notamment par les acides aminés qu'elles apportent, peuvent induire des effets métaboliques et physiologiques en rapport avec l'initiation et la progression de facteurs de risque de maladies (AFSSA, 2008 ; Elliott *et al.*, 2006 ; Sluijs *et al.*, 2009 ; Verhoef *et al.*, 2004 ; WHO/FAO/UNU, 2007). Le rôle des protéines alimentaires dans ce contexte n'a été que peu exploré jusqu'à présent. Dans ce cadre, la richesse en acides aminés indispensables et non-indispensables ne s'apprécie plus de la même manière, et certains acides aminés, comme la cystéine et l'arginine, ont fait l'objet d'une attention particulière. Aussi a-t-on voulu

étudier si les protéines de colza, particulièrement riches en ces deux acides aminés, pourraient contribuer à la prévention de certains facteurs de risque. La présente revue a pour objet de présenter les travaux réalisés chez l'Homme et chez l'animal pour évaluer la valeur nutritionnelle des protéines de colza, en particulier en ce qui concerne leur possible intérêt en termes de prévention du risque cardiovasculaire et diabétique.

Le syndrome métabolique

Le régime alimentaire de type occidental favorise l'apparition d'un syndrome métabolique. Le syndrome métabolique touche 10 % des adultes en France, et sa prévalence croissante (Rousseau *et al.*, 2009) en fait un enjeu majeur de santé publique. En effet, ses conséquences pathologiques sont sévères, que ce soit en termes de diabète de type 2 (9 fois plus que dans la population générale) ou de maladies cardiovasculaires (43 % des obèses ont une complication cardiovasculaire, contre 13 %

chez les non-obèses). Sur le plan économique, le coût direct lié au surpoids et aux comorbidités induites est estimé à 5 % des dépenses totales de santé. En conséquence, la recherche publique doit investir massivement dans l'étude du rôle de la nutrition, non seulement dans la prise en charge du syndrome métabolique, mais aussi et surtout dans sa prévention. Cliniquement, le syndrome métabolique associe 3 des 5 critères suivants : obésité abdominale, élévation de la triglycéridémie et de la glycémie à jeun, baisse du cholestérol-HDL et élévation de la pression artérielle (Grundt *et al.*, 2004) (tableau 1). Bien que cliniquement hétérogène, le syndrome métabolique peut se définir d'un point de vue physiopathologique comme la manifestation d'une insulino-résistance multi-tissus se développant dans un contexte d'inflammation à bas bruit, en association étroite avec l'apparition d'une dysfonction endothéliale vasculaire. Sur le plan nutritionnel, il résulte de déséquilibres quantitatifs et/ou qualitatifs des apports énergétiques (surconsommation d'énergie, de glucides simples et d'acides gras saturés) (Reaven, 2005). A l'inverse, certains nutriments, tels que les acides gras polyinsaturés n-3, sont connus pour leur capacité à prévenir et/ou améliorer les dysrégulations métaboliques associées au syndrome métabolique (Vessby, 2003). C'est pourquoi les *apports nutritionnels conseillés* recommandent, non seulement une réduction de l'apport d'acides gras saturés (< 12 % de l'apport énergétique total), mais aussi une augmentation de l'apport des acides gras polyinsaturés n-3, conduisant à un rééquilibrage des familles d'AGPI n-6 et n-3, et plus spécifiquement à un rapport entre les précurseurs, acide linoléique (18:2 n-6)/acide α -linoléique (18:3 n-3) ≤ 5 (AFSSA, 2010).

Potentiel des protéines végétales dans la prévention du syndrome métabolique

Si le rôle de la qualité de l'apport lipidique et glucidique dans l'apparition et la prévention du syndrome métabolique est assez bien connu, celui des protéines alimentaires et notamment des protéines végétales l'est très peu. Les protéines végétales sont généralement considérées comme étant de qualité moyenne, voire médiocre par rapport aux protéines animales, en raison de leur composition en acides aminés indispensables souvent moins favorable : les protéines de céréales sont ainsi connues pour leur faible niveau en lysine et les légumineuses pour leur niveau en acides aminés soufrés relativement faible. En revanche, les protéines végétales issues de certaines légumineuses ou crucifères (soja, lupin, colza)

sont riches en certains acides aminés non indispensables, précurseurs de composés jouant un rôle important dans la physiopathologie du syndrome métabolique, tels que l'arginine, précurseur du monoxyde d'azote et la cystéine, précurseur du glutathion (tableau 1).

Quelques études récentes suggèrent un effet bénéfique de la substitution des protéines animales par des protéines végétales sur certains facteurs de risques associés au syndrome métabolique. Ainsi, une diminution des triglycérides circulants et une augmentation du cholestérol-HDL ont été rapportées après substitution des protéines animales par des protéines de soja (Castiglioni *et al.*, 2003 ; Greaves *et al.*, 2000 ; Han *et al.*, 2002 ; Lucas *et al.*, 2001 ; Teede *et al.*, 2001), de lupin (Sirtori *et al.*, 2004) ou de millet (Choi *et al.*, 2005), chez l'Homme ou chez l'animal. Chez l'Homme, une diminution de la pression artérielle a été observée en réponse à une augmentation de la consommation de protéines de soja (He *et al.*, 2005 ; Jenkins *et al.*, 2002). Enfin, chez le rat, le remplacement des caséines par des protéines de soja est associé à une moindre détérioration de la régulation glycémique induite par une alimentation hypersaccharosée et hyperlipidique (Lavigne *et al.*, 2000). En revanche, il n'y pas de données pour juger de l'action directe des protéines végétales sur l'obésité abdominale.

Les mécanismes impliqués ne sont pas encore clarifiés, toutefois, le profil en acides aminés des protéines végétales (tableau 1) offre quelques hypothèses intéressantes (Debry, 2004a ; Debry, 2004b ; Gannon *et al.*, 2002a ; Gannon *et al.*, 2002b ; Kurowska et Carroll, 1994 ; McCarty, 1999 ; Sydow *et al.*, 2003 ; West *et al.*, 2005). Ainsi, par le biais de leur richesse en arginine, précurseur du monoxyde d'azote, certaines protéines végétales pourraient faciliter le maintien d'une production normale de monoxyde d'azote, et ainsi exercer un effet favorable sur différentes composantes de la fonction cardiovasculaire (fonction endothéliale vasculaire, pression artérielle) ainsi que sur d'autres facteurs de risque du syndrome métabolique (intolérance au glucose, inflam-

mation à bas bruit...) intimement associés au syndrome métabolique. La richesse en cystéine de certaines protéines végétales, telles que les protéines de colza, pourrait en outre réduire l'apparition du stress oxydant en favorisant le maintien du statut en glutathion. Nous avons donc entrepris une série d'études, chez l'Homme et chez l'animal (rat) pour évaluer le potentiel nutritionnel des protéines de colza.

Préparation de l'isolé de colza

Brièvement, le traitement des graines a été assuré par CREOL, filiale du CETIOM, au sein de l'atelier pilote d'huilerie de Pessac. Une farine déshuilée d'amandes pures a été obtenue par extraction à l'hexane des graines dépelliculées. Le solvant a été éliminé à basse température, sous vide (filtre agité GUEDU ML750), afin de ne pas altérer la fonctionnalité des protéines. Un isolé protéique a ensuite été produit à partir des tourteaux à l'INRA de Nantes (S. Bérot). Pour cela, les protéines de farine délipidée de colza ont été solubilisées à pH 11 dans de l'eau, centrifugées pour éliminer les polysaccharides insolubles, puis ajustées à pH 7 et ultrafiltrées à 20 °C. Le rétentat a été séché par lyophilisation. L'isolé obtenu contenait 14,9 % d'N, soit 93 % de matière azotée totale (Nx6,25). Cet isolé de colza a été utilisé dans les études chez le rat et l'Homme.

Intérêt spécifique des protéines de colza – Valeur nutritionnelle chez l'Homme

Parmi les protéines végétales, les protéines de colza, bien que non encore valorisées en nutrition humaine, sont particulièrement intéressantes car elles sont riches en acides aminés indispensables, sans qu'un d'entre eux soit présent en faible quantité, et elles sont également riches en cystéine et en arginine (tableau 1). Dans la perspective de leur utilisation en nutrition humaine, il était important dans un premier temps de caractériser la valeur nutritionnelle des protéines de colza par rapport au critère primaire du métabolisme azoté. Nous avons donc évalué la qualité nutrition-

Tableau 1. Teneur en certains acides aminés des protéines de soja, lupin et colza par comparaison à la caséine (en % des protéines).

	Caséine	Soja	Lupin	Colza
Arginine	3,5	7,4	10,7	6,6
Lysine	7,6	6,1	5,3	6,4
Glycine	1,7	4,3	4,3	5,7
Cystéine	0,5	1,2	1,3	2,2
Méthionine	2,8	1,3	0,8	2,1

D'après Ishihara *et al.* (2003).

nelle des protéines de colza par la mesure de leur biodisponibilité et de leur utilisation métabolique *in vivo* chez l'homme sain, en combinant l'utilisation de sondes iléales et de repas contenant des protéines de colza marquées intrinsèquement et uniformément à l'azote 15 (Bos *et al.*, 2007). Pour ce faire, des graines de colza (*Brassica napus cv Goëland*) ont été cultivées à la Station expérimentale CETIOM de Saint-Pathus (77). La fertilisation a été réalisée en 3 stades en utilisant du nitrate d'ammonium marqué à l'azote 15. L'isolé de colza était ensuite préparé à partir des graines comme décrit ci-dessus.

Par cette approche, nous avons montré que la qualité nutritionnelle des protéines de colza était bonne, et tout à fait comparable à celle des protéines de légumineuses et notamment du soja (Bos *et al.*, 2007). Un résultat surprenant de cette évaluation est la relativement faible digestibilité des protéines de colza (84-87 %). En revanche, la plus faible biodisponibilité des acides aminés issus des protéines de colza est contrebalancée par une excellente utilisation des acides aminés absorbés dans les voies anaboliques, correspondant à une valeur biologique de 84 % (rétention élevée), légèrement supérieure à celle des protéines de lait.

Cette démonstration de la valeur nutritionnelle élevée des protéines de colza nous a permis, dans un deuxième temps, de proposer d'évaluer l'effet « préventif » des protéines de colza sur différents facteurs associés au syndrome métabolique. Ces études prospectives ont été conduites sur un modèle animal, le rat, placé dans différentes situations d'induction à long et court terme de dérégulation métabolique et physiologique.

Étude 1 chez le rat : protéines de colza et facteurs de risque du syndrome métabolique – effets à long terme

L'objectif de cette étude était d'évaluer les conséquences d'une substitution des protéines animales de référence (protéines de lait) par des protéines de colza sur l'apparition des facteurs de risque associés au syndrome métabolique, chez un modèle animal. Pour ce faire, des rats ont reçu pendant 9 semaines une alimentation riche en lipides et dont la composition des fractions lipidique (riche en acides gras saturés) et glucidique (riche en saccharose) est connue pour favoriser l'apparition des différentes composantes du syndrome métabolique (Chicco *et al.*, 2003 ; Delbosc *et al.*, 2005 ; Girard *et al.*, 2005 ; Oliart Ros *et al.*, 2001 ; Roberts *et al.*, 2005 ; Sumiyoshi *et al.*, 2006). Dans ce régime inducteur du syndrome métabolique, la fraction protéique

est constituée de protéines de lait ou de colza, afin de tester l'effet spécifique de la nature des protéines sur l'apparition des facteurs de risque. Un groupe supplémentaire d'animaux, consommant un régime dit « prudent », riche en AGPI n-3 (huile de colza) et en glucides complexes (amidon), connus pour prévenir l'apparition des facteurs de risque du syndrome métabolique, a été utilisé comme témoin positif (tableau 2). L'homéostasie glycémique à jeun (glycémie, insulïnémie), la régulation glucidique en situation dynamique (test oral de tolérance au glucose), le profil lipidique (triglycérides, cholestérol-HDL), la pression artérielle ainsi que le statut redox (évalué au travers du glutathion) ont été suivis régulièrement au cours des 9 semaines d'expérimentation.

Les résultats de cette étude montrent que les effets différentiels des régimes ont surtout porté sur l'homéostasie glucidique, évaluée à partir des valeurs de glycémie et d'insulïnémie mesurées à jeun (indice HOMA d'insulino-résistance) (figure 1) et lors d'un test oral de tolérance au glucose – TOTG – (Indice de Belfiore d'insulinosensibilité ou ISI, figure 2) (Mariotti *et al.*, 2008a). En effet, le régime riche en acides gras saturés et en glucides simples (Inducteur, I) favorise, à court terme, l'apparition d'une insulino-résistance : augmentation de la glycémie et de l'insulïnémie à jeun et de l'indice HOMA au cours des 9 semaines de régimes. Ce régime constitue un modèle physiopathologique intéressant d'initiation précoce du syndrome métabolique. La substitution des protéines laitières par les protéines de colza (régime C) entraîne une moindre élévation de l'insulïnémie à jeun, une meilleure

sensibilité à l'insuline à jeun (indice HOMA plus faible) ainsi qu'en provocation orale (indice ISI plus élevé). Ces effets sont souvent similaires à ceux observés en réponse au régime prudent (P) riche en AGPI n-3 et pauvre en saccharose. Ainsi, dans ce contexte expérimental, l'effet seul de la nature des protéines (i.e. colza vs lait) est similaire à l'effet combiné de la nature des glucides (amidon vs saccharose) et des lipides (riche en AGPI vs acides gras saturés).

Lavigne *et al.* (2000) ont montré que l'apport de protéines de soja permettait une régulation glycémique plus efficace que des caséines apportées en même quantité, et ils ont suggéré que cet effet bénéfique pourrait être lié à la teneur en arginine des protéines de soja, qui est environ le double de celle des caséines (respectivement 7,41 et 3,51 g/100 g). Gannon et Nutall ont par ailleurs montré que l'arginine limite l'augmentation de la glycémie, sans stimuler la sécrétion d'insuline après une charge orale de glucose (Gannon *et al.*, 2002b). Il est donc possible que la meilleure régulation glycémique obtenue chez les rats du groupe colza puisse être liée à la teneur en arginine des protéines de colza (6,60 g/100g), qui est proche de celle des protéines de soja. La forte teneur en cystéine des protéines de colza offre également une hypothèse intéressante pour ces effets favorables sur l'homéostasie glycémique et le maintien de l'insulino-sensibilité. En effet, nous avons largement documenté la capacité de la cystéine, à dose nutritionnelle (ou de protéines riche en cystéine) à prévenir l'insulino-résistance induite par un régime riche en saccharose chez le rat (Blouet *et al.*, 2007a ; Huneau *et al.*, 2008).

Tableau 2. Composition des différents régimes (en g/kg aliment).

	Induction	Colza	« Prudent »
	I	C	P
Protéines de lait	250,0	-	250,0
Protéines de colza	-	207,0	-
Amidon de maïs	20,0	58,0	436,4
Saccharose	487,4	487,4	71,0
Huile de palme	109,7	109,7	0
Huile de colza	-	-	109,7
Matière grasse laitière	-	5,0	-
Huile de lupin	35,6	35,6	35,6
Complément minéral	35,0	35,0	35,0
Complément vitaminique	10,0	10,0	10,0
Alpha-cellulose	50,0	50,0	50,0
Choline	2,3	2,3	2,3

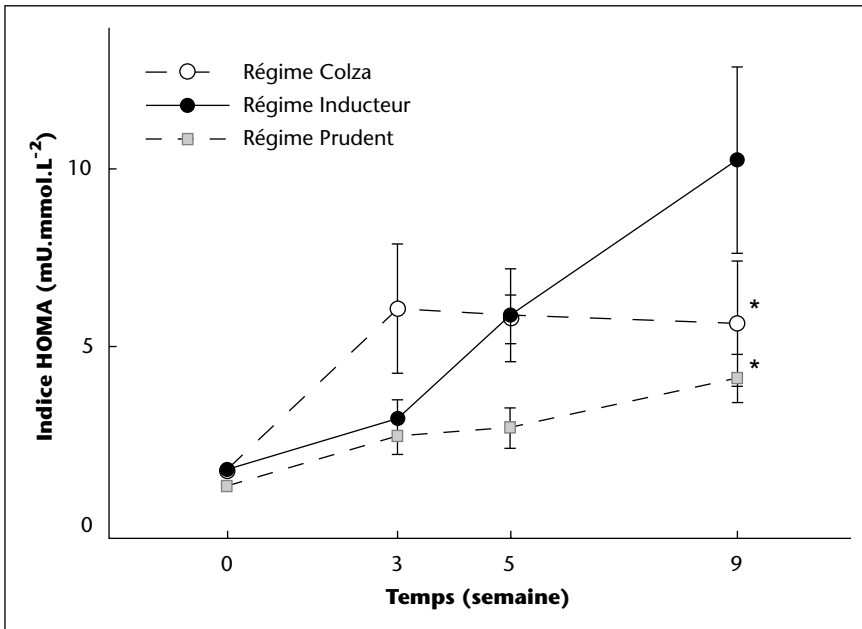


Figure 1. Effet des régimes sur l'indice d'insulino-résistance à jeun (HOMA). Moyenne + Erreur type, $n \geq 9$ rats/régime. Effet régime : $P < 0,05$; Effet temps : $P < 0,01$; Régime*Temps : $P < 0,05$. Les groupes portant une même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 0,05.

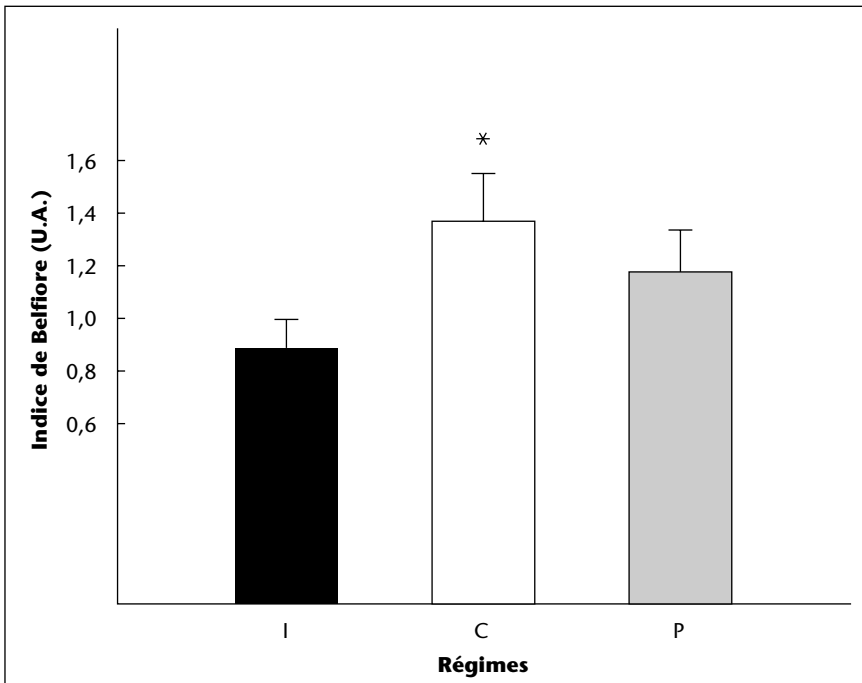


Figure 2. Indice d'insulino-sensibilité de Belfiore (IS) déterminé lors du test oral de tolérance au glucose. Moyenne + Erreur standard, $n \geq 9$ rats/régime. *significativement différent de I, $P < 0,05$.

Les effets favorables de la cystéine semblent médiés par le glutathion, avec un effet favorable sur le statut redox dans différents tissus, associé à une modification de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (Blouet *et al.*, 2007b ; Blouet *et al.*, 2006). Certains auteurs

ont également montré que le glutathion hépatique jouait un rôle clé dans la production d'un signal favorisant l'insulino-sensibilité périphérique en phase postprandiale (Guarino *et al.*, 2003 ; Guarino et Macedo, 2006). Dans diverses conditions relevant ou non du stress

oxydant, l'apport en cystéine semble pouvoir moduler le métabolisme du glutathion (Cresenzi *et al.*, 2003 ; Huneau *et al.*, 2008 ; Mariotti *et al.*, 2004 ; Morand *et al.*, 1997). Dans cette étude, même si le métabolisme de la cystéine et du glutathion n'a pas été spécifiquement étudié, on peut remarquer que la consommation des protéines de colza a pu affecter le métabolisme du glutathion, dans la mesure où la concentration intra-érythrocytaire en glutathion était nettement plus élevée que celle des autres groupes de rats (Mariotti *et al.*, 2008a).

Conclusion. Nous avons montré que, à moyen terme, les protéines de colza prévenaient la détérioration de l'insulino-sensibilité induite par un régime gras et sucré chez le rat, avec une efficacité similaire à celle d'un régime riche en AGPI n-3 et pauvre en saccharose (Mariotti *et al.*, 2008a). Des études supplémentaires, notamment à long terme, sont nécessaires pour confirmer ce potentiel extrêmement intéressant des protéines de colza. Par ailleurs, il serait important de déterminer les ou les mécanisme(s) qui permettent l'effet préventif identifié dans la présente étude. Nous faisons l'hypothèse que cet effet bénéfique s'explique, au moins en partie, par l'apport supplémentaire en arginine et en cystéine, qui a des effets favorables sur le métabolisme du glutathion et du monoxyde d'azote, dans le contexte d'un stress oxydant induit par l'alimentation.

Étude 2 chez le rat : protéines de colza et facteurs de risque du syndrome métabolique – phase postprandiale

La phase postprandiale place l'individu « sain » dans une situation transitoire d'épreuve métabolique liée à la gestion de l'afflux de nutriments. Il est maintenant admis que des repas riches en acides gras saturés et en sucre, qui entraînent de fortes excursions glycémique et triglycéridémique, provoquent l'apparition transitoire de stress oxydant, de dysfonction endothéliale vasculaire et d'inflammation à bas-bruit, qui sont autant de puissants facteurs de risque de syndrome métabolique (Blendea *et al.*, 2005 ; Ceriello, 2004 ; Ceriello *et al.*, 2002 ; Daskalova *et al.*, 2005 ; Neri *et al.*, 2005 ; Title *et al.*, 2000 ; Vogel *et al.*, 1997). En particulier, la dysfonction endothéliale vasculaire est l'objet d'un intérêt particulier : elle décrit de façon intégrative l'altération de l'homéostasie vasculaire, au niveau du tissu-clé qu'est l'endothélium vasculaire ; elle signe l'initiation d'un phénotype pro-athérogène au niveau vasculaire ; elle est étroitement liée au risque cardiovasculaire et diabétique (Brunner *et al.*, 2005 ; Davignon et Ganz, 2004).

Selon le paradigme nutritionnel actuel, c'est à travers la répétition à long terme de ces événements indésirables postprandiaux que se constitue le risque de syndrome métabolique (Ceriello, 2000 ; Ceriello *et al.*, 2002 ; Esposito *et al.*, 2003 ; Poppitt, 2005). Aussi, dans la continuité de l'étude précédente, nous avons voulu explorer en aigu l'effet des protéines de colza, au sein d'un repas gras et sucré, sur ces facteurs de risque.

Les rats ont été étudiés lors de trois conditions successives (selon un dispositif croisé randomisé) consistant en l'ingestion d'un repas-test de 25 kcal, contenant 60 % de l'énergie sous forme d'huile de palme (soit 1,67 g d'huile), 20 % de l'énergie sous forme de saccharose (soit 1,25 g de saccharose), 20 % de l'énergie sous forme de protéines (soit 1,25 g de protéines) et différant par la nature protéique, soit : un concentré de protéines totales de lait (repas témoin « Inducteur ») ; un isolé de protéines de colza (repas « colza ») ; un concentré de protéines totales de lait, additionné de L-arginine et de L-cystéine, à hauteur des teneurs apportées par l'isolé de colza (repas « acides aminés », dit repas « AA ») (Magne *et al.*, 2009b). (tableau 3)

Durant les 6 heures qui ont suivi le repas-test, la triglycéridémie a fortement augmenté sans effet significatif de la nature des protéines. Concernant l'état inflammatoire associé à la phase postprandiale, la concentration plasmatique de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL1-b, IL-6) ainsi que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), ont effectivement augmenté, mais de nouveau sans effet de la nature des protéines. En revanche, la fonction endothéliale, fortement détériorée par le repas "Inducteur", était en partie préservée après les repas « Colza » et « AA » (figure 3) (Magne *et al.*, 2009b)

Enfin, l'augmentation de la concentration d'hydroperoxydes était atténuée par les repas « Colza » et « AA », comparés au repas « Inducteur », l'effet étant apparent en fin de période postprandiale (figure 4). Des analyses ont été réalisées sur les aortes abdominales des rats prélevées 6h après le repas-test, afin de déterminer la production d'une des espèces réactives de l'oxygène à l'origine du stress oxydant : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) (Magne *et al.*, 2009a ; Oudot *et al.*, 2006). Elles montrent qu'au niveau vasculaire (aortique), un tissu cible du syndrome métabolique, le stress oxydant est significativement plus faible après le repas "Colza" qu'après le repas « Inducteur », tandis que le repas « AA » induit un stress oxydant qui est numériquement intermédiaire entre ceux induits par les deux autres repas (figure 5) (Magne *et al.*, 2009b).

Conclusion. Le résultat principal de cette étude est que l'isolé de protéines de colza, par substi-

Tableau 3. Composition des repas expérimentaux utilisés lors des études postprandiales.

	Repas		
	« Inducteur »	« Colza »	« AA »
Teneurs en macronutriments			
Huile de Palme (g)	1,67	1,67	1,67
Saccharose (g)	1,25	1,25	1,25
Protéines (g)	1,25	1,25	1,25
Composition protidique			
Matière protéique	Concentré de Protéines de lait	Isolé de Protéines de colza	Concentré de Protéines de lait
Quantité de matière utilisée (g)	1,48	1,57 ¹	1,48
Teneur de la matière en arginine (mg)	42,5	75	42,5
L-arginine ajoutée (mg)	0	0	32,5
Teneur finale en arginine (mg)	42,5	75	75
Teneur de la matière en cystéine (mg)	10,6	25	10,6
L-cystéine ajoutée (mg)	0	0	14,4
Teneur finale en cystéine (mg)	10,6	25	25

¹ Calculé en utilisant un facteur de conversion spécifique de l'azote en protéines (Nx5,35 pour l'isolé de protéines de colza et Nx6,25 pour les protéines de lait) (Mariotti F *et al.*, 2008b).

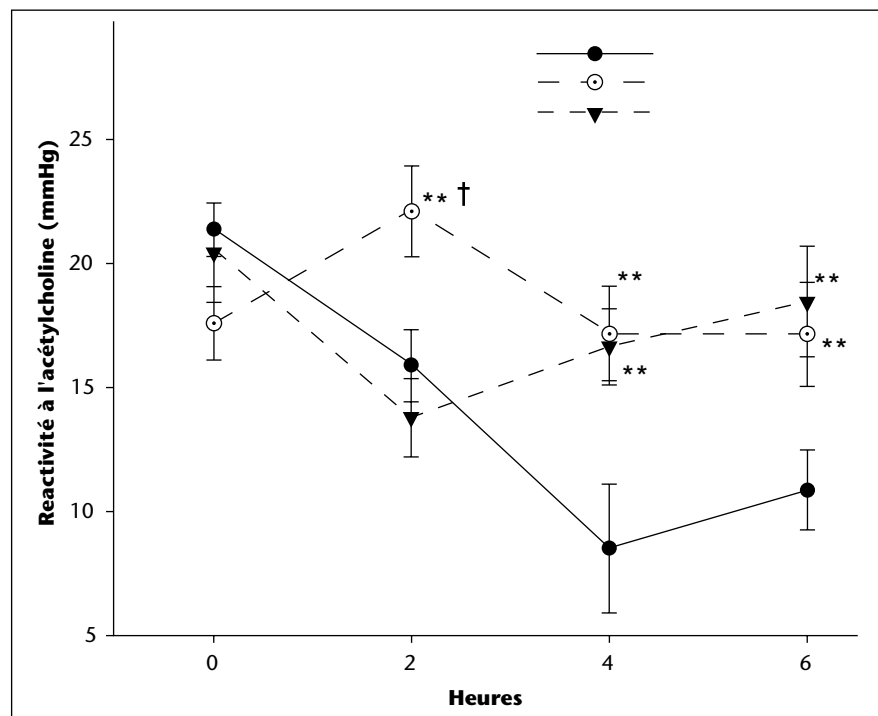


Figure 3. Fonction endothéliale vasculaire après l'ingestion de repas riches en acides gras saturés et en sucre et comportant soit des protéines de lait (« Inducteur »), des protéines de colza (« Colza ») ou des protéines de lait supplémentées en arginine et en cystéine (« AA »). Moyenne + Erreur standard, n ≥ 9 rats/régime. Effet temps (P < 0,05) ; Effet Repas*Temps (P < 0,001). ** : significativement différent du groupe inducteur au même temps, P < 0,01. † : significativement différent du groupe AA au même temps, P < 0,05.

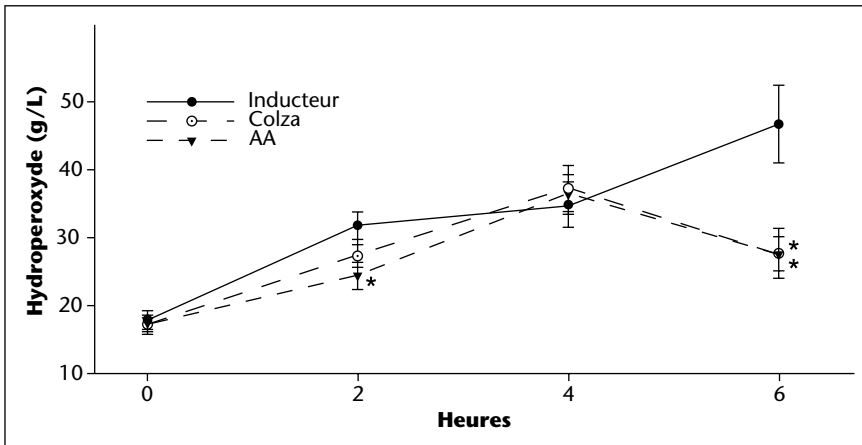


Figure 4. Concentration plasmatique en hydroperoxydes après l'ingestion de repas riches en acides gras saturés et en sucre et comportant soit des protéines de lait (« Inducteur »), des protéines de colza (« Colza ») ou des protéines de lait supplémentées en arginine et en cystéine (« AA »). Moyenne + Erreur type, $n \geq 9$ rats/régime. **: significativement différent du groupe inducteur au même temps, $P < 0,05$.

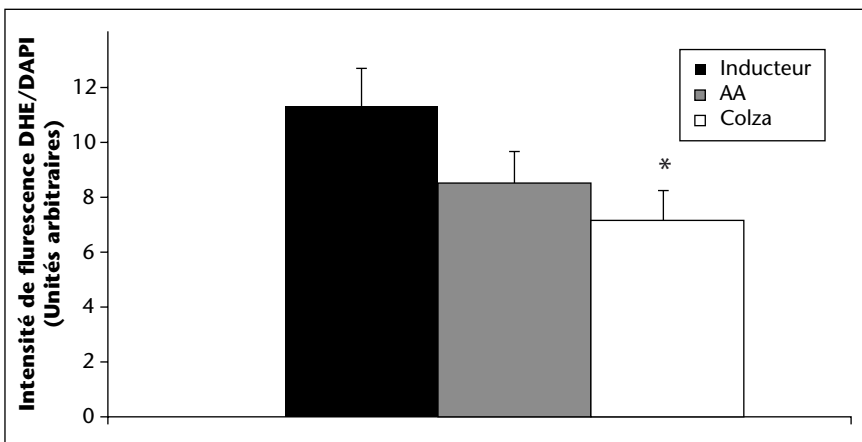


Figure 5. Stress oxydant vasculaire (quantification de la fluorescence à l'éthidine de sections aortiques) 6 heures après administration du repas de charge riche en acides gras saturés et en sucre contenant des protéines de lait (« Inducteur »), ou des protéines de colza (« Colza »), ou des protéines de lait additionnées d'arginine et de cystéine pour atteindre les mêmes teneurs que dans le repas colza (« AA »). Moyenne + Erreur type, $n \geq 9$ rats/régime. * $P < 0,05$ vs. Inducteur.

tution à des protéines de lait témoins, au sein d'un repas de charge riche en acides gras saturés et en sucre, réduit l'apparition de la dysfonction endothéliale et du stress oxydant (au niveau systémique et aortique). Par ailleurs, nos travaux ont été les premiers à démontrer l'existence de ce stress oxydant au niveau vasculaire dans la phase postprandiale. Or, le stress oxydant au niveau vasculaire est considéré comme un contributeur majeur de la destruction oxydative du monoxyde d'azote, qui est la molécule-clé de l'homéostasie vasculaire (Cai et Harrison, 2000 ; Kay et Holub, 2003 ; Sies *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2008). À l'inverse, une supplémentation en antioxydants limite ou supprime la dysfonction endothéliale postprandiale (Plotnick *et al.*, 1997 ; Sies *et al.*,

2005 ; Vogel *et al.*, 2000). Cependant, d'autres études seraient nécessaires pour identifier les mécanismes qui permettent aux protéines de colza de limiter le stress oxydant aortique, et pour statuer sur l'importance de ce phénomène dans la médiation de l'effet protecteur constaté des protéines de colza sur la fonction endothéliale postprandiale. Par ailleurs, il est important de noter que l'effet protecteur sur le stress oxydant vasculaire n'est pas mimé, ou pas entièrement mimé, par l'adjonction d'arginine et de cystéine à hauteur des niveaux apportés par les protéines de colza. Ainsi, il semble que ces acides aminés n'expliquent pas entièrement les effets protecteurs des protéines de colza, ce qui suggère que d'autres constituants puissent intervenir, ainsi que

d'autres mécanismes. À ce titre, on peut signaler que les effets antihypertenseurs des protéines de colza ont pu être attribués à 4 peptides (2-4 acides aminés) chez le rat (Marczak *et al.*, 2003). L'effet de ces peptides sur les facteurs de risque du syndrome métabolique mériterait également des études spécifiques.

Au final, cette étude a apporté des résultats, assez congruents, indiquant que les protéines de colza peuvent réduire l'initiation de phénomènes centraux dans la physiopathologie vasculaire.

Conclusion générale

Au cours de ces dernières années, nous avons montré la bonne qualité protéique des protéines de colza au sens de leur capacité à assurer le renouvellement normal des protéines corporelles (Bos *et al.*, 2007). Au-delà de la couverture des besoins en acides aminés indispensables pour le métabolisme protéique, la richesse des protéines de colza en certains acides aminés non (strictement) indispensables (arginine, cystéine) semble leur conférer un rôle dans la prévention nutritionnelle de certains facteurs de risques associés au syndrome métabolique : insulino-résistance, stress oxydant, dysfonction endothéliale (Magne *et al.*, 2009b ; Mariotti *et al.*, 2008a). Cependant, il est probable que l'effet bénéfique des protéines de colza est une résultante complexe qui ne s'explique pas aisément par réductionnisme nutritionnel. De façon plus générale, la "qualité" des protéines est probablement un paramètre nutritionnel sous-évalué en termes de prévention du risque cardiovasculaire et diabétique.

En parallèle, l'innocuité de l'isolé de colza, a été documentée récemment par des études toxicologiques chez le rat (Mejia *et al.*, 2009a ; Mejia *et al.*, 2009b), ce qui contribue à ouvrir des perspectives pour une utilisation importante de ces protéines dans l'alimentation humaine. Cela souligne également l'importance de développer des études chez l'Homme, fort des résultats très encourageants obtenus chez l'animal, pour évaluer l'intérêt nutritionnel des protéines de colza en alimentation préventive chez l'Homme.

Remerciements. Ont également participé à ces projets de recherche : Cécile Bos (responsable de l'étude chez l'Homme), Joëlle Magné, Véronique Mathé, Charlotte Sarrat (Unité 914, Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire) ; Stéphanie Delemasure, Luc Rochette (Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, Facultés de médecine et de pharmacie, Dijon).. Nos remerciements vont également aux personnes suivantes : Gheorghe Airinei, Cécile Faure, Angélique

Foucault-Simonin, Claire Gaudichon (Unité 914, Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire) ; Nouredine Hafnaoui (Equipe NSP, Unité de Nutrition Humaine, INRA-Theix, St Genès-Champagnelle) ; Anja Mitschke, Dimitrios Tsikas (Institut für Klinische Pharmakologie, Edizinische Hochschule Hannover, Hannover, Allemagne) ; Serge Bérot (UR1268 BIA Biopolymères, Interactions Assemblages, INRA-Nantes) ; Catherine Vergely (Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Cardiovasculaires Expérimentales, Faculté de médecine et de pharmacie, Dijon).

RÉFÉRENCES

AFSSA. Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations : AFSSA ; 2008.

AFSSA. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. : AFSSA ; 2010 1/03/2010.

Blendea MC, Bard M, Sowers JR, Winer N. High-fat meal impairs vascular compliance in a subgroup of young healthy subjects. *Metabolism* 2005 ; 54 : 1337-44.

Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, et al. Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. *Free Radic Biol Med* 2007a ; 42 : 1089-97.

Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D, Huneau JF. NO bioavailability, and not production, is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007b ; 232 : 1458-64.

Blouet C, Mariotti F, Mikogami T, Tome D, Huneau JF. Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. *J Nutr Biochem* 2006 ; 18 : 519-24.

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

Brunner H, Cockcroft Jr, Deanfield J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II : Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005 ; 23 : 233-46.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000 ; 87 : 840-4.

Castiglioni S, Manzoni C, D'Uva A, et al. Soy proteins reduce progression of a focal lesion and lipoprotein oxidizability in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *Atheroscler Suppl* 2003 ; 171 : 163-70.

Ceriello A. The post-prandial state and cardiovascular disease: relevance to diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2000 ; 16 : 125-32.

Ceriello A. Impaired glucose tolerance and cardiovascular disease: the possible role of post-prandial hyperglycemia. *Am Heart J* 2004 ; 147 : 803-7.

Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, et al. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002 ; 106 : 1211-8.

Chicco A, D'Alessandro ME, Karabatas L, Pastorale C, Basabe JC, Lombardo YB. Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet. *J Nutr* 2003 ; 133 : 127-33.

Choi YY, Osada K, Ito Y, Nagasawa T, Choi MR, Nishizawa N. Effects of dietary protein of Korean foxtail millet on plasma adiponectin, HDL-cholesterol, and insulin levels in genetically type 2 diabetic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005 ; 69 : 31-7.

Cresenzi CL, Lee JI, Stipanuk MH. Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J Nutr* 2003 ; 133 : 2697-702.

Daskalova DC, Kolovou GD, Panagiotakos DB, Pilatis ND, Cokkinos DV. Increase in aortic pulse wave velocity is associated with abnormal postprandial triglyceride response. *Clin Cardiol* 2005 ; 28 : 577-83.

Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004 ; 109 : III27-III32.

Debry G. Chapter 4 - Data on Atherosclerosis. Dietary Proteins and Atherosclerosis: CRC Press; 2004a.

Debry G. Chapter 5 - Data on Hypertension. Dietary Proteins and Atherosclerosis: CRC Press; 2004b.

Delbosch S, Paizanis E, Magous R, et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atheroscler Suppl* 2005 ; 179 : 43-9.

Elliott P, Stamler J, Dyer AR, et al. Association between protein intake and blood pressure: the INTERMAP Study. *Arch Intern Med* 2006 ; 166 : 79-87.

Esposito K, Nappo F, Giugliano F, et al. Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2003 ; 78 : 1135-40.

Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. The metabolic response to ingested glycine. *Am J Clin Nutr* 2002a ; 76 : 1302-7.

Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. Oral arginine does not stimulate an increase in insulin concentration but delays glucose disposal. *Am J Clin Nutr* 2002b ; 76 : 1016-22.

Girard A, Madani S, El Boustani ES, Belleville J, Prost J. Changes in lipid metabolism and antioxidant defense status in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids. *Nutrition* 2005 ; 21 : 240-8.

Greaves KA, Wilson MD, Rudel LL, Williams JK, Wagner JD. Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with an isoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr* 2000 ; 130 : 820-6.

Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman Jr, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome : report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : e13-8.

Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF, Macedo MP. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 ; 284 : G588-G594.

Guarino MP, Macedo MP. Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol* 2006 ; 147 : 959-65.

Han KK, Soares Jr JM, Haidar MA, De Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* 2002 ; 99 : 389-94.

He J, Gu D, Wu X, Chen J, Duan X, Whelton PK. Effect of soybean protein on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 2005 ; 143 : 1-9.

Huneau JF, Mariotti F, Blouet C, Tome D, Blachier F. Implications métaboliques, physiologiques et fonctionnelles de l'apport en acides aminés soufrés et en protéines riches en acides aminés soufrés. In : Roberfroid M, Coxam V, Delzenne N, eds. *Aliments fonctionnels (2^e édition)*. Paris : Lavoisier, 2008.

Ishihara K, Fukuchi Y, Mizunoya W, et al. Amino acid composition of soybean protein increased postprandial carbohydrate oxidation in diabetic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003 ; 67 : 2505-11.

Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, et al. Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* 2002 ; 76 : 365-72.

Kay CD, Holub BJ. The postprandial effects of dietary antioxidants in humans. *Curr Atheroscler Rep* 2003 ; 5 : 452-8.

Kurowska EM, Carroll KK. Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of dietary essential amino acids. *J Nutr* 1994 ; 124 : 364-70.

Lavigne C, Marette A, Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000 ; 278 : E491-500.

Lucas EA, Khalil DA, Daggy BP, Arjmandi BH. Ethanol-extracted soy protein isolate does not modulate serum cholesterol in golden Syrian hamsters: a model of postmenopausal hypercholesterolemia. *J Nutr* 2001 ; 131 : 211-4.

Magne J, Huneau JF, Delemasure S, Rochette L, Tome D, Mariotti F. Whole-body basal nitric oxide production is impaired in postprandial endothelial dysfunction in healthy rats. *Nitric oxide* 2009a ; 21 : 37-43.

- Magne J, Huneau JF, Tsikas D, *et al.* Rapeseed protein in a high-fat mixed meal alleviates postprandial systemic and vascular oxidative stress and prevents vascular endothelial dysfunction in healthy rats. *J Nutr* 2009b ; 139 : 1660-6.
- Marczak ED, Usui H, Fujita H, *et al.* New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 2003 ; 24 : 791-8.
- Mariotti F, Hermier D, Sarrat C, *et al.* Rapeseed protein inhibits the initiation of insulin resistance by a high saturated fat, high sucrose diet in rats. *Br J Nutr* 2008a ; 100 : 984-91.
- Mariotti F, Simbelie KL, Makarios-Lahham L, *et al.* Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. *J Nutr* 2004 ; 134 : 128-31.
- Mariotti F, Tome D. The nutritional properties of plant proteins in the human diet. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 1999 ; 6 : 487-93.
- Mariotti F, Tome D. New data to appreciate the quality of vegetal proteins in humans - Implications and outlook. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* 2003 ; 10 : 17-22.
- Mariotti F, Tomé D, Patureau-Mirand P. Converting nitrogen into protein - beyond 6.25 and Jones' factors. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2008b ; 48 : 177-84.
- Mccarty MF. Vegan proteins may reduce risk of cancer, obesity, and cardiovascular disease by promoting increased glucagon activity. *Med Hypotheses* 1999 ; 53 : 459-85.
- Mejia LA, Korgaonkar Ck, Schweizer M, *et al.* A 13-week sub-chronic dietary toxicity study of a cruciferin-rich canola protein isolate in rats. *Food Chem Toxicol* 2009a ; 47 : 2645-54.
- Mejia LA, Korgaonkar CK, Schweizer M, *et al.* A 13-week dietary toxicity study in rats of a Napin-Rich Canola Protein Isolate. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009b ; 55 : 394-402.
- Morand C, Rios L, Moundras C, Besson C, Remesy C, Demigne C. Influence of methionine availability on glutathione synthesis and delivery by the liver. *J Nutr Biochem* 1997 ; 8 : 246-55.
- Neri S, Signorelli SS, Torrisi B, *et al.* Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. *Clin Ther* 2005 ; 27 : 1764-73.
- Oliart Ros RM, Torres-Marquez ME, Badillo A, Angulo Guerrero O. Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats. *J Nutr Biochem* 2001 ; 12 : 207-12.
- Oudot A, Martin C, Busseuil D, Vergely C, Demaison L, Rochette L. NADPH oxidases are in part responsible for increased cardiovascular superoxide production during aging. *Free Radic Biol Med* 2006 ; 40 : 2214-22.
- Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *Jama* 1997 ; 278 : 1682-6.
- Poppitt SD. Postprandial Lipaemia, Haemostasis, Inflammatory Response and other Emerging Risk Factors for Cardiovascular Disease: The Influence of Fatty Meals. *Curr Nutr Food Sci* 2005 ; 1 : 23-34.
- Reaven GM. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr* 2005 ; 25 : 391-406.
- Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdia A, Vaziri ND. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol* 2005 ; 98 : 203-10.
- Rousseau A, Sevin C, Comité De Pilotage D.E.S.I.R. (2009). Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance. 2009 [cited 21/10/2010]; Available from: <http://ifr69.vjf.inserm.fr/~desir/index.html>
- Sarwar G, Sosulski FW, Bell JM, Bowland JP. Nutritional evaluation of oilseeds and legumes as protein supplements to cereals. *Adv Exp Med Biol* 1978 ; 105 : 415-41.
- Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 2005 ; 135 : 969-72.
- Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, *et al.* Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *J Nutr* 2004 ; 134 : 18-23.
- Sluijs I, Beulens JW, Van Der AD, Spijkerman AM, Grobbee DE, Van Der Schouw YT. *Dietary Intake of Total, Animal, and Vegetable Protein and Risk of Type 2 Diabetes in the EPIC-NL Study.* *Diabetes Care*, 2009.
- Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr* 2006 ; 136 : 582-7.
- Sydow K, Schwedhelm E, Arakawa N, *et al.* ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia : effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc Res* 2003 ; 57 : 244-52.
- Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, Mcgrath BP. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects : a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86 : 3053-60.
- Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, *et al.* The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 2008 ; 45 : 18-31.
- Title LM, Cummings PM, Giddens K, Nassar BA. Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E. *J Am Coll Cardiol* 2000 ; 36 : 2185-91.
- Verhoef P, Steenge GR, Boelsma E, Van Vliet T, Olthoff MR, Katan MB. Dietary serine and cystine attenuate the homocysteine-raising effect of dietary methionine: a randomized crossover trial in humans. *Am J Clin Nutr* 2004 ; 80 : 674-9.
- Vessby B. Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2003 ; 14 : 15-9.
- Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997 ; 79 : 350-4.
- Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2000 ; 36 : 1455-60.
- West SG, Likos-Krick A, Brown P, Mariotti F. Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *J Nutr* 2005 ; 135 : 212-7.
- WHO/FAO/UNU. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2007 : 1-265 back cover.
- Young VR, Pellett PL. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *Am J Clin Nutr* 1994 ; 59 : 1203S-1212S.