

2m11.2829.7

Université de Montréal

Effet des protéines et du calcium alimentaires sur l'intégrité osseuse chez le rat tout au
long de la vie

Par

Julie Roy

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Nutrition

août 2000

©Julie Roy, 2000



Q11

145

158

2001

N.003

Sommaire

Il a été démontré que des apports élevés en protéines s'accompagnaient d'une élévation de l'excrétion urinaire de calcium et pouvaient affecter la balance calcique, amenant des effets potentiellement délétères sur l'os. Toutefois, ces études utilisaient des apports très élevés en protéines et comportaient des périodes expérimentales relativement courtes, limitant ainsi leur utilité pour l'élaboration de recommandations nutritionnelles. Le but de la présente étude était donc d'évaluer l'impact des protéines et du calcium alimentaires et la relation entre ces deux éléments nutritifs en regard de l'intégrité osseuse, lorsque ceux-ci sont administrés à des doses physiologiques tout au long de la vie. Des rats mâles Sprague-Dawley sevrés ont ainsi été soumis durant 22 mois à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium. Les animaux consommant 0.5% de calcium ont été sacrifiés aux âges de 13, 18 et 22 mois, et ceux soumis à la diète contenant 1% de calcium ont été sacrifiés à l'âge de 22 mois. L'intégrité osseuse a été évaluée en mesurant les paramètres suivants: anthropométrie du fémur (longueur, épaisseur, poids humide, poids sec dégraissé et poids des cendres) et contenu minéral osseux (calcium, phosphore et magnésium). D'autres paramètres ont également été étudiés : le poids corporel, la consommation alimentaire, la calcémie et les excréctions urinaires de calcium, protéines et créatinine. Les minéraux, la créatinine et les protéines ont été mesurés par des méthodes colorimétriques.

Les contenus osseux en calcium et en phosphore n'ont pas été affectés de manière significative par l'âge, contrairement au contenu en magnésium qui a diminué. Malgré que les changements n'étaient pas significatifs, la calciurie tendait à être plus élevée chez les animaux consommant 22% de protéines ($p= 0.13$ chez les rats âgés de 13 mois), mais cet effet s'est estompé avec l'avancement en âge. Par ailleurs, les protéines alimentaires ont eu un impact sur le contenu minéral osseux à un âge avancé et cet effet était intimement lié à l'apport en calcium. Dans la présente étude, les concentrations minérales osseuses les plus élevées (chez les animaux âgés de 22 mois)

ont été observées en présence des diètes contenant 13.2% protéines, 0.5% calcium et 22% protéines, 1% calcium, correspondant à des ratios calcium :protéines (mg :g) de 38:1 et 45.5:1, respectivement. En 1993, l'American Institute of Nutrition établissait les recommandations en protéines à 17% pour le rat en croissance et à 12% chez le rat vieillissant. Quant aux besoins en calcium, l'AIN recommande 0.5%, ce qui correspond à des ratios calcium:protéines de 29:1 (période de croissance) et 42:1 (au cours du vieillissement). Dans la présente étude, un ratio calcium:protéines correspondant à 76:1 (diète contenant 13.2% de protéines et 1% de calcium) a été associé à des contenus osseux en calcium ($p<0.05$) et en phosphore ($p=0.23$) de même qu'à des poids fémoraux (cendres, $p<0.05$; sec dégraissé, $p=0.065$) plus faibles, lorsque comparés aux rats consommant 0.5% de calcium.

En conclusion, malgré une tendance dans le sens d'une augmentation de la calciurie à l'âge adulte, l'administration d'une diète contenant jusqu'à 22% de protéines n'a pas eu d'effets délétères sur l'intégrité osseuse au grand âge. En outre, les résultats de la présente étude confirment l'interaction qui existe entre les protéines et le calcium alimentaires et font ressortir l'importance du ratio calcium : protéines lorsque ces deux nutriments sont administrés à des doses physiologiques. Ainsi, un ratio calcium:protéines de l'ordre de 40:1, proposé pour les animaux vieillissant, semble être approprié. Par contre, l'administration de diètes comprenant des ratios calcium:protéines plus élevés (ex. 76:1) ne semblent pas favoriser une intégrité osseuse optimale.

1.4.2.2	Calcitonine.....	10
1.4.2.3	Hormone de croissance.....	10
1.4.2.4	Autres hormones.....	10
1.5	Marqueurs biochimiques du remodelage osseux.....	12
1.5.1	Marqueurs biochimiques de la formation osseuse.....	12
1.5.1.1	Phosphatase alcaline sérique.....	12
1.5.1.2	Ostéocalcine sérique.....	13
1.5.1.3	Propeptides d'extension du collagène de type I sériques.....	13
1.5.2	Marqueurs biochimiques de la résorption osseuse.....	14
1.5.2.1	Calcium urinaire.....	14
1.5.2.2	Hydroxyproline urinaire.....	14
1.5.2.3	Glycosides de l'hydroxylysine urinaires.....	15
1.5.2.4	Phosphatase acide tartrate-résistante sérique.....	15
1.5.2.5	Molécules de pontage du collagène (pyridinoline et déoxypyridinoline) et leurs peptides associés (urinaires).....	16
1.6	Influences nutritionnelles sur le métabolisme osseux.....	17
1.6.1	Calcium.....	17
1.6.2	Vitamine D.....	18
1.6.3	Phosphore.....	19
1.6.4	Magnésium.....	20
1.6.5	Vitamines (K et C) et minéraux traces.....	20

1.6.6	Protéines.....	22
1.7	Influence des protéines alimentaires sur le métabolisme du calcium.....	23
1.8	Influence des protéines alimentaires sur l'intégrité osseuse.....	29
2.	Besoins protéiques chez le rat.....	32
3.	Hypothèse de recherche et objectifs de l'étude.....	33
3.1	Formulation de l'hypothèse de recherche.....	33
3.2	Objectifs de l'étude.....	33
III.	ARTICLE.....	34
IV.	DISCUSSION.....	59
1.	Discussion des résultats présentés dans l'article.....	59
1.1	Effet de l'âge.....	59
1.2	Effet des protéines et du calcium alimentaires.....	62
V.	CONCLUSION.....	67
VI.	RÉFÉRENCES.....	68

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Composition des diètes administrées aux rats.....	53
Tableau 2	Consommation alimentaire quotidienne des rats âgés de 13, 18 et 22 mois, soumis à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium.....	54
Tableau 3	Effet des protéines et du calcium alimentaires sur la calcémie et les paramètres urinaires (calciurie, protéinurie et créatininurie) des rats âgés de 3, 13, 18 et 22 mois, soumis à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium.....	56
Tableau 4	Effet des protéines et du calcium alimentaires sur les mesures anthropométriques du fémur des rats âgés de 3, 13, 18 et 22 mois, soumis à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium.....	57
Tableau 5	Effet des protéines et du calcium alimentaires sur le contenu minéral du fémur (calcium, phosphore et magnésium) des rats âgés de 3, 13, 18 et 22 mois, soumis à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium.....	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Évolution pondérale des rats soumis à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium à différents âges.....	55
----------	---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxyvitamine D ₃
25(OH)D ₃	25-hydroxyvitamine D ₃
CTX	Carboxy-télopeptide
D-Pyr	Déoxypyridinoline
GFR	Taux de filtration glomérulaire
GH	Hormone de croissance
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-1	Interleukine-1
NTX	Amino-télopeptide
PICP	Propeptide d'extension carboxyterminale
PINP	Propeptide d'extension aminoterminal
PRAL	Charge acide rénale potentielle
PTH	Hormone parathyroïdienne
PTHrp	Protéine reliée à l'hormone parathyroïdienne
Pyr	Pyridinoline
TGF-β ₁	Transforming growth factor-β ₁
TRAP	Phosphatase acide tartrate-résistante

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, le Dr. Guylaine Ferland, pour m'avoir si bien dirigée dans ce travail, pour ses encouragements constants et pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche.

Ma reconnaissance s'adresse également à Dominique Mainville, l'assistante de recherche du laboratoire, amie et confidente, qui m'a été d'une aide technique précieuse et d'un support moral inestimable. Merci Dominique pour ton amitié.

Mes remerciements vont également à tous les stagiaires d'été pour leur aide apportée au travail d'animalerie et aux analyses de laboratoire. Je pense ici à Geneviève Caron, Julie Dutil, Dominique Gendron et Hammou Boubaker.

Je désire également remercier la fondation FCAR-FRSQ qui m'a accordée une bourse de recherche, sans laquelle il m'aurait été difficile de compléter mes études.

Je tiens aussi à remercier tou(te)s mes ami(e)s et ma famille qui n'ont pas cessé de m'encourager.

Enfin, merci Éric pour ta présence, ton soutien et ton amour...

I. INTRODUCTION

Le tissu osseux est composé d'une matrice organique extracellulaire, principalement la protéine du collagène, sur laquelle se dépose une substance minérale, essentiellement le cristal d'hydroxyapatite ou cristal de phosphate de calcium¹. Étant donné qu'approximativement un tiers de la masse osseuse est constituée de protéines, un apport protéique adéquat est essentiel à la synthèse de la nouvelle matrice osseuse². Ainsi, l'acquisition de la masse osseuse et le maintien de l'intégrité de l'os au cours du vieillissement dépendent en partie d'un niveau de protéines alimentaires adéquat³. Bien que les effets délétères d'un apport protéique insuffisant soient très bien démontrés², les conséquences associées à un apport excessif en protéines sur l'intégrité osseuse demeurent controversées.

Depuis l'étude de Wachman et Bernstein⁴ réalisée en 1968, où il a été suggéré qu'un apport protéique élevé causait une hypercalciurie, résultant en une balance calcique négative et au développement de l'ostéoporose, plusieurs travaux ont été menés dans le but d'évaluer l'impact d'un niveau élevé de protéines alimentaires sur l'intégrité osseuse et sur le métabolisme calcique⁵⁻¹⁰. Il a été clairement démontré que des apports protéiques élevés entraînaient une augmentation de l'excrétion urinaire du calcium chez l'humain^{5,6,11-13} et le rat^{7,8,14-16}. Chez ce dernier, une diète élevée en protéines ne semblerait pas être associée à une balance calcique négative, due à une diminution compensatrice de l'excrétion fécale du calcium endogène^{7,14,15}. Cependant, chez l'humain, un apport protéique élevé résulterait en une perte nette du calcium de l'organisme¹⁷. Si la source de ce calcium provient d'une augmentation du taux de résorption osseuse, la consommation chronique d'une diète élevée en protéines pourrait entraîner des effets néfastes sur l'os. Le principal mécanisme par lequel un apport protéique élevé pourrait être délétère en regard de l'intégrité osseuse est relié à l'augmentation de la production d'acides endogènes associée à un niveau élevé de protéines alimentaires^{4,18,19}. Cette diète productrice d'acide pourrait promouvoir la mobilisation des sels de calcium à partir des réserves osseuses dans le but de neutraliser

l'acidité générée, résultant en une dissolution de l'os.

Dans une étude d'une durée de 10 mois réalisée chez le rat, Whiting et Draper⁸ ont rapporté que la composition de l'os était comparable chez les animaux soumis à une diète contenant soit 15% ou 35% de protéines, confirmant d'autres travaux effectués chez le rongeur^{7,16,20}. Des chercheurs ont toutefois observé des effets néfastes²¹⁻²³ ou bénéfiques^{21,24} d'une diète élevée en protéines sur l'intégrité de l'os. Parallèlement aux études chez l'animal, des travaux chez l'humain portant sur l'association entre l'apport protéique et la masse osseuse²⁵⁻²⁹ et le métabolisme osseux (évalué à partir de marqueurs biochimiques)^{9,10,12,30,31} ont produit des résultats contradictoires. Bien que des associations entre les protéines alimentaires et l'incidence de fractures aient été rapportées³²⁻³⁵, ces résultats restent difficiles à interpréter du fait que des facteurs, tels que l'apport en calcium et en d'autres éléments nutritifs impliqués dans le métabolisme osseux, n'ont pas toujours été contrôlés.

Puisqu'un apport protéique élevé induit l'hypercalciurie, les protéines alimentaires représentent un déterminant important des besoins en calcium. Ce minéral est le principal cation de la phase inorganique du squelette³⁶ et 99% du calcium de l'organisme est entreposé dans l'os^{37,38}. Cette grande réserve calcique est utilisée pour le maintien de la concentration extracellulaire en calcium, nécessaire aux fonctions biochimiques essentielles³⁸. La majorité des études suggèrent une relation positive entre l'apport en calcium et l'intégrité de l'os^{37,39,40}. Ainsi, un apport adéquat en calcium semble critique pour l'atteinte d'une masse osseuse optimale et pour le maintien de cette masse osseuse au cours du vieillissement^{37,40}.

L'American Institute of Nutrition (1993)⁴¹ recommande 17 % de protéines chez le rat en croissance et 12% chez le rat vieillissant. La plupart des études ayant évalué l'effet d'un apport protéique élevé sur l'intégrité de l'os chez le rat ont utilisé des niveaux très élevés de protéines alimentaires, et étaient de courte ou de moyenne durée, limitant leur pertinence en regard de la santé de l'os au cours du vieillissement. Afin de

comblent cette lacune, l'impact à long terme de niveaux physiologiques de protéines et de calcium alimentaires sur l'intégrité de l'os a été étudié chez le rat. Plus spécifiquement, une étude d'une durée de 22 mois a été réalisée chez le rat mâle soumis à une diète contenant soit 13.2% ou 22.0% de protéines et soit 0.5% ou 1.0% de calcium.

II. REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

1. Métabolisme osseux

L'os forme, avec le cartilage, le système squelettique de l'organisme. On peut définir l'os comme étant un tissu composé d'une matrice organique extracellulaire sur laquelle se dépose une substance minérale. La matrice osseuse est principalement constituée de collagène et la substance minérale, d'hydroxyapatite, un cristal de phosphate de calcium $[3 \text{ Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{OH})_2]^1$. Le tissu osseux exerce les fonctions essentielles de soutien mécanique du corps et de protection des autres tissus de l'organisme. Il joue également un rôle de réserve d'ions pour le maintien de l'homéostasie minérale (particulièrement le calcium et le phosphore) des liquides extracellulaires.

On distingue deux types d'os : l'os cortical et l'os trabéculaire. Le squelette est composé de 10% d'os trabéculaire et de 90% d'os cortical. Ce dernier, aussi appelé os compact, est dense puisqu'il est constitué de 80 à 90% de matrice osseuse minéralisée. L'os trabéculaire ou spongieux est, quant à lui, composé de 15 à 25% de matrice osseuse minéralisée, le reste étant occupé par la moelle osseuse, les vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif¹. L'os trabéculaire, avec sa structure alvéolaire, possède une aire de surface plus grande que l'os cortical et accomplit essentiellement une fonction métabolique^{1,42}. Quant à l'os cortical, il exerce plutôt les fonctions de support et de protection. Il est le composant majeur des os longs et constitue la surface externe de protection de tous les os de l'organisme^{1,43}.

Le métabolisme osseux se caractérise par les actions séquentielles et opposées de deux types de cellules : les ostéoblastes, responsables de la formation de l'os nouveau, et les ostéoclastes, en charge de la dégradation (résorption) de l'os ancien. Ainsi, l'os est un tissu actif qui se renouvelle constamment. Le maintien de la masse

osseuse au cours de la vie adulte dépend du fonctionnement adéquat de ce processus de remodelage, processus régulé par des hormones systémiques et des facteurs locaux.

1.1 Éléments cellulaires osseux

1.1.1 Ostéoblastes

Formé à partir des cellules souches du stroma médullaire, l'ostéoblaste est une cellule mononucléée de forme cuboïdale responsable de la formation de l'os^{1,44}. Cette cellule synthétise les constituants de la matrice osseuse, c'est-à-dire le collagène et les protéines non collagéniques, et participe à la minéralisation osseuse⁴⁴⁻⁴⁶. L'ostéoblaste possède sur sa membrane une forte activité phosphatase alcaline, enzyme qui jouerait un rôle dans la minéralisation de la matrice osseuse⁴⁴. Après avoir comblé la lacune avec la matrice osseuse non minéralisée (ostéoïde), une faible proportion des ostéoblastes sont intégrés dans la matrice produite et deviennent des ostéocytes, tandis que les ostéoblastes non transformés forment une couche de cellules bordantes de forme aplatie^{42-44,46}. Un réseau de canalicules permettant les échanges relie les cellules bordantes et les ostéocytes⁴⁶. Ces derniers exerceraient un rôle dans l'activation locale du remodelage osseux en détectant les microfractures ou autres imperfections de la structure osseuse et en les signalant aux ostéoclastes^{43,47}. L'intégration des ostéoblastes au tissu ostéoïde s'accompagne de la déposition de minéraux¹.

1.1.2 Ostéoclastes

L'ostéoclaste est une cellule multinucléée provenant de la fusion des cellules de la lignée monocyttaire^{1,43}. Cette cellule, responsable de la résorption osseuse, se retrouve le plus souvent en contact avec la surface de l'os calcifié et dans une dépression de celle-ci appelée lacune de Howship, résultant de son activité de résorption¹. L'ostéoclaste se déplace le long de la surface osseuse et s'ancre sur celle-ci par une région de son cytoplasme appelée zone claire^{1,44,45}. On n'observe pas

d'organelle dans cette région, excepté les microfilaments du cytosquelette^{44,45,48}. Dans cette zone, la membrane se caractérise par de nombreux replis, d'où son appellation de bordure plissée^{1,44,45}. L'attachement de l'ostéoclaste à la matrice osseuse permet de créer un microcompartiment dans les replis de la bordure plissée^{1,43-45}. La cellule va alors acidifier le microcompartiment extracellulaire en sécrétant des protons (via les pompes à protons) et excréter des enzymes lysosomiales et non lysosomiales, comme la collagénase^{1,44,45,48}. L'acide excrété permet la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite et la libération des ions calcium et phosphore contenus dans la matrice osseuse, l'exposant ainsi à l'action des enzymes^{1,44}.

1.2 Remodelage osseux

Le remodelage osseux s'effectue dans des lieux anatomiques appelés unités de remodelage trabéculaire ou cortical, selon l'endroit du remodelage^{42,44}. L'os est formé de millions d'unités de remodelage osseux et ce phénomène ne s'effectue pas de façon synchrone dans le squelette⁴⁴. Le métabolisme osseux représente la somme des activités de plusieurs unités de remodelage osseux⁴³.

Au sein de chacune de ces unités se succède une série d'événements qui débute par une phase d'activation, caractérisée par la rétraction des cellules bordantes et l'arrivée des précurseurs des ostéoclastes le long de la surface osseuse libre⁴⁴. S'ensuit la phase de résorption où les ostéoclastes résorbent activement l'ancienne surface osseuse^{42,43}. Le travail des ostéoclastes terminé, des cellules mononucléées de type macrophagique s'installent dans la lacune creusée par les ostéoclastes ; c'est la phase d'inversion^{1,44}. Une ligne cimentante est alors formée au fond de la lacune; elle marque la limite de résorption et agit en cimentant le nouvel os et l'os ancien¹. Finalement s'ensuit la phase de formation où les ostéoblastes comblent la lacune en produisant une nouvelle matrice osseuse non minéralisée (ostéoïde) qui se minéralisera par la suite^{42,43}. La phase de quiescence, d'une durée de deux à trois ans, correspond à la période qui sépare, en un point précis du tissu osseux, deux cycles de remodelage⁴⁴.

Dans le squelette adulte normal, un cycle de remodelage se déroule sur une période de temps fixe, qui est habituellement de 90 jours^{42,44}.

Ce remodelage permet le renouvellement continu du tissu osseux et le maintien de la quantité et de la structure de l'os à l'âge adulte. Lorsque les activités de formation et de résorption osseuses ne sont pas quantitativement équivalentes, il survient un déséquilibre dans le processus de remodelage qui peut avoir des répercussions sur la masse osseuse^{42,44}. À long terme, une activité de formation plus faible qu'une activité de résorption pourrait, par exemple, contribuer au développement de l'ostéoporose⁴³.

Le remodelage osseux est un processus hautement régulé et comprend des interactions entre les ostéoblastes et les ostéoclastes ainsi qu'entre ces cellules osseuses et la matrice nouvellement synthétisée. La régulation du remodelage osseux sera traitée en détail dans la section 1.4.

1.3 Protéines de la matrice osseuse

1.3.1 Collagène

Le contenu total en protéines de l'os est constitué d'environ 85 à 90% de collagène de type I^{49,50}. Cette protéine possède une conformation en triple hélice formée de trois chaînes^{42,43,49}. Ces dernières sont composées d'une répétition du triplet Gly-X-Y, dans lequel Gly est l'acide aminé glycine, X est souvent l'acide aminé proline et Y est souvent l'acide aminé hydroxyproline. Les différentes fibres de collagène se croisent et sont reliées entre elles et aux protéines non collagéniques par des ponts covalents^{49,50}. La solidité et l'organisation des fibrilles de collagène leur permet de résister aux forces de compression tout en assurant une certaine élasticité⁴⁴.

1.3.2 Protéines non collagéniques

Les protéines non collagéniques constituent 10 à 15% du contenu protéique total de l'os. Environ trois quarts de ces protéines sont synthétisées par les ostéoblastes et le quart restant sont d'origine non osseuse. Ces dernières sont adsorbées ou intégrées dans les espaces de la matrice osseuse. Cette fraction se compose largement de protéines sériques de nature acide permettant la liaison avec l'hydroxyapatite de l'os⁴⁹. On divise les protéines non collagéniques en quatre groupes distincts : (i) les protéoglycannes, (ii) les facteurs de croissance, (iii) les protéines d'attachement à la cellule et (iv) les protéines vitamine K-dépendantes. La plupart des rôles physiologiques de chacune de ces protéines demeurent indéfinis à ce jour⁴⁹.

1.4 Régulation du remodelage osseux

Le remodelage osseux est un processus complexe régulé par des hormones systémiques et des facteurs locaux, via des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés^{43,51}. Les hormones circulantes agissent indirectement sur les cellules osseuses en modulant la synthèse, l'activation et la liaison des facteurs locaux à leurs récepteurs, lesquels stimulent ou inhibent la formation ou la résorption osseuse. Aussi, les hormones circulantes agissent directement sur la prolifération et la différenciation des cellules osseuses⁵¹.

1.4.2 Régulation locale

Les facteurs locaux, dont la plupart sont intégrés à la matrice osseuse, agissent d'intermédiaires pour les hormones systémiques au niveau de l'os. Ils sont nécessaires à la mobilisation et au maintien de l'état différencié des cellules osseuses. Ils agissent également d'agents de communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes durant les cycles de remodelage, modulent la synthèse de la matrice osseuse, et assurent le maintien de la structure osseuse^{51,52}. Ces facteurs sont synthétisés par les ostéoblastes

et incluent les facteurs de croissance [les *insulin-like growth factors* (IGF-1 et -2), la famille des *transforming growth factor- β* (TGF- β 1, - β 2, et - β 3), les *fibroblast growth factors* (FGFs), le *platelet-derived growth factor* (PDGF), l'*epidermal growth factor* (EGF) et les *bone morphogenetic protein* (BMP)], les cytokines [les interleukines (IL-1, -4, -6, et -11), les *tumor necrosis factors* (TNF α et β), les *macrophage et granulocyte/macrophage colony-stimulating factors* (M-CSF et GM-CSF)] et les prostaglandines⁵¹.

1.4.1 Régulation systémique

1.4.1.1 La parathormone et le métabolite actif de la vitamine D

La parathormone (PTH) et le calcitriol [ou 1,25(OH)₂D₃] sont deux hormones systémiques bien connues pour réguler la calcémie. Lorsque le niveau de calcium des fluides extracellulaires diminue, ces deux hormones stimulent la résorption osseuse^{53,54}. Le calcitriol exerce son action via une stimulation directe de la différenciation ostéoclastique, les précurseurs des ostéoclastes possédant des récepteurs au calcitriol, contrairement aux ostéoclastes qui n'en possèdent pas^{45,52}. Le mode d'action par lequel la PTH augmente la résorption osseuse n'est pas encore totalement élucidé. Deux mécanismes ont été proposés, à savoir par une action (directe ou indirecte) au niveau de la différenciation ostéoclastique et/ou via les ostéoblastes, la présence de ces cellules étant nécessaire à l'activité de résorption de l'hormone^{45,51, 52}.

Le calcitriol, essentiel à une minéralisation osseuse normale, possède des effets multiples au niveau de la formation osseuse. En effet, il inhibe directement la synthèse de collagène osseux, mais augmente également la liaison de l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) à son récepteur des cellules de la lignée ostéoblastique⁵¹. L'IGF-1 est un facteur de croissance sécrété par les ostéoblastes, qui stimule la prolifération des cellules de la lignée ostéoblastique et la synthèse de collagène⁵¹. Le calcitriol élève aussi l'activité phosphatase alcaline (enzyme impliquée dans la minéralisation osseuse)

des ostéoblastes et stimule la synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes⁵². Quant à la PTH, elle peut soit stimuler, soit inhiber la synthèse du collagène de la matrice osseuse⁵¹.

1.4.1.2 Calcitonine

La calcitonine inhibe la résorption osseuse par un effet direct sur les ostéoclastes, lesquels possèdent des récepteurs pour cette hormone^{51,52}. Sous l'effet de cette dernière, les ostéoclastes se rétractent de la surface osseuse et s'immobilisent⁵². La calcitonine agit également au niveau de la formation osseuse. Des études *in vitro* ont en effet suggéré que la calcitonine pourrait être impliquée de façon transitoire dans la régulation initiale de la différenciation ostéoblastique⁵².

1.4.1.3 Hormone de croissance

La croissance et la maturation du tissu osseux sont modulées par l'hormone de croissance (GH). Celle-ci agit cependant en partie par l'intermédiaire des somatomédines, particulièrement l'IGF-1, produites localement au niveau de l'os par les cellules ostéoblastiques en réponse à la GH^{51,52}. Par ailleurs, la GH stimule l'absorption intestinale du calcium via l'augmentation de la production du calcitriol, et favorise ainsi la minéralisation osseuse⁵¹.

1.4.1.4 Autres hormones

L'*insuline* stimule de façon marquée la synthèse de la matrice osseuse et la formation du cartilage via une prolifération des cellules ostéoblastiques, modulant par le fait même la croissance squelettique normale. Par ailleurs, l'insuline est nécessaire à une minéralisation osseuse normale⁵¹.

Les *stéroïdes sexuels* (oestrogènes et androgènes) sont importants pour la maturation osseuse des individus en croissance et la prévention de la perte osseuse⁵¹. L'effet inhibiteur des oestrogènes sur la résorption osseuse pourrait en partie s'expliquer par la diminution de la synthèse de certaines cytokines (interleukines-1 et -6), lesquelles jouent un rôle dans la stimulation de la résorption osseuse^{51,52}. Les stéroïdes sexuels activent également la formation osseuse, via une stimulation de la sécrétion de GH et de la synthèse de collagène de type I, d'IGF-1 et de TGF β («transforming growth factor β »). Ce facteur de croissance exerce des effets anabolisants sur la biosynthèse de la matrice osseuse⁵².

Les *glucocorticoïdes* sont des hormones stéroïdiennes qui stimulent la résorption osseuse *in vivo*, possiblement via la diminution de l'absorption intestinale du calcium induite par ces hormones, causant l'augmentation subséquente de la sécrétion de PTH⁵¹. Les glucocorticoïdes exercent des effets multiples et complexes sur la formation osseuse. *In vivo*, l'administration chronique de ces hormones stéroïdiennes inhibe l'activité de formation osseuse au niveau cellulaire, par une diminution de la multiplication des ostéoblastes^{51,52}. Par ailleurs, ces hormones exercent des effets indirects additionnels sur la formation osseuse via l'altération de la synthèse et de l'activité des facteurs de croissance osseux, tels que la diminution de l'activité du TGF- β et l'inhibition de la synthèse d'IGF-1^{51, 52}.

Les *hormones thyroïdiennes* stimulent la résorption osseuse, mais agissent de façon plus lente et à un moindre degré que la PTH. Le mécanisme par lequel la résorption osseuse est augmentée demeure inconnu⁵². Les hormones thyroïdiennes sont nécessaires à la croissance et au développement osseux normal, agissant principalement sur la formation du cartilage, possiblement de concert avec l'IGF-1⁵¹. Elles stimulent également l'activité phosphatase alcaline ostéoblastique et la production d'ostéocalcine par les ostéoblastes⁵².

1.5 Marqueurs biochimiques du remodelage osseux

Il existe diverses techniques pour évaluer l'intégrité osseuse, dont l'histomorphométrie (mesure de la fréquence d'activation des unités de remodelage osseux), l'absorptiométrie double énergie à rayon X ou DEXA (mesure de la densité osseuse) et les marqueurs biochimiques du remodelage osseux^{42,43,36}. Ces derniers sont divisés selon qu'ils reflètent le taux de formation osseuse ou de résorption osseuse et représentent des outils utiles pour l'évaluation et le suivi du métabolisme osseux^{43,53}. Les marqueurs biochimiques osseux peuvent être facilement mesurés dans le sang et l'urine de façon répétée chez un même sujet et répondent plus rapidement à une intervention visant à traiter une maladie osseuse, que les méthodes standards telle la DEXA^{43,36}. Cette dernière demeure malgré tout une technique sensible pour l'évaluation de la masse osseuse et la prédiction des risques de fractures^{42,43}. Les marqueurs biochimiques du remodelage osseux peuvent alors être combinés à une mesure de densité osseuse afin d'améliorer l'évaluation du risque de maladies osseuses et le suivi de l'efficacité thérapeutique³⁶.

1.5.1 Marqueurs biochimiques de la formation osseuse

1.5.1.1 Phosphatase alcaline sérique

La phosphatase alcaline est une ecto-enzyme associée à la membrane plasmatique des cellules, qui se retrouve dans le foie, l'os, les reins et le placenta^{42,43,37}. Dans l'os, cette enzyme est synthétisée par les ostéoblastes et participe à l'initiation de la minéralisation^{42,37}. La mesure de la phosphatase alcaline sérique totale représente le marqueur de formation osseuse le plus fréquemment utilisé en clinique, mais sa sensibilité et sa spécificité sont limitées, en raison des diverses sources de l'enzyme^{42,47,36}. Toutefois, le développement récent d'anticorps monoclonaux reconnaissant préférentiellement la forme osseuse de la phosphatase alcaline a permis d'augmenter la validité de ce marqueur, dont la valeur est augmentée dans des

conditions caractérisées par un remodelage osseux élevé, comme la maladie de Paget^{42,47,36}.

1.5.1.2 Ostéocalcine sérique

Une fraction de l'ostéocalcine nouvellement synthétisée par les ostéoblastes n'est pas incorporée à la matrice et est libérée dans la circulation, où elle peut être mesurée par dosage radio-immunologique (RIA)^{42,43,55}. En plus de l'os, cette protéine est contenue dans d'autres tissus calcifiés, incluant la dentine et le cartilage calcifié⁵⁶. L'ostéocalcine sérique est considérée comme étant un marqueur du renouvellement osseux et sa concentration est augmentée lors de la ménopause^{42,43,55}. En général, les concentrations sériques d'ostéocalcine sont augmentées chez les sujets présentant un remodelage osseux élevé, à l'exception de la maladie de Paget où la phosphatase alcaline sérique (totale ou osseuse) reste le meilleur marqueur de la formation osseuse^{42,56}.

1.5.1.3 Propeptides d'extension du collagène de type I sériques

Les molécules précurseurs du collagène (procollagènes de type I, II et III) contiennent des peptides d'extension aux extrémités N- et C-terminales, appelés propeptides d'extension aminoterminal (PINP) et carboxyterminal (PICP). Ces extrémités vont être clivées durant la formation des fibrilles de collagène, avant l'incorporation du collagène de type I dans la matrice osseuse, et libérées dans la circulation. Des dosages immunologiques pour ces deux propeptides ont été développés, et des niveaux sériques élevés ont été observés dans certaines conditions, telles l'hyperparathyroïdisme et l'ostéomalacie^{42,43,56}. Puisque le taux de renouvellement du collagène de type I dans l'os est plus rapide que dans les autres tissus, les niveaux sériques de ces propeptides devraient raisonnablement refléter l'activité de formation osseuse de l'organisme^{43,55,56}. Toutefois, les niveaux de PICP et PINP mesurés dans le sérum pourraient aussi résulter de la dégradation du collagène,

puisque ces propeptides sont partiellement incorporés dans la matrice osseuse. Ceci pourrait expliquer les faibles sensibilité et spécificité de ces marqueurs à détecter les changements subtils du remodelage osseux, telle l'ostéoporose^{42,55-57}.

1.5.2 Marqueurs biochimiques de la résorption osseuse

1.5.2.1 Calcium urinaire

L'excrétion urinaire de calcium peut être utilisée pour mesurer les pertes osseuses, causées par un renouvellement osseux élevé^{43,55}. Malgré qu'il s'agisse d'un marqueur facile à évaluer et peu coûteux, le calcium urinaire présente une sensibilité et une spécificité limitées, notamment dans les conditions de remodelage osseux diminué⁵⁵. En effet, la concentration de calcium urinaire peut être considérablement affectée par des facteurs tels la diète, la fonction rénale, les hormones calciotropes et les oestrogènes^{43,55}.

1.5.2.2 Hydroxyproline urinaire

L'hydroxyproline est un acide aminé modifié qui provient de l'hydroxylation post-traductionnelle de la proline du collagène^{43,55}. Cet acide aminé libéré lors de la dégradation du collagène n'est pas réutilisé pour sa synthèse^{42,43,55}. L'hydroxyproline urinaire peut être mesurée par une technique colorimétrique ou par HPLC (chromatographie liquide à haute performance)^{42,43,56}. Plusieurs études ont rapporté une excrétion urinaire élevée de ce marqueur chez les femmes post-ménopausées^{42,43}. Comme la moitié du collagène de l'organisme humain se retrouve dans l'os, où son renouvellement est probablement plus rapide que celui des autres tissus, l'excrétion urinaire d'hydroxyproline est considérée comme un marqueur de résorption osseuse⁵⁵. Toutefois, une partie de l'hydroxyproline urinaire proviendrait des PINP et sa mesure pourrait ainsi refléter en partie la formation osseuse^{42,43}. De plus, cet acide aminé présente un métabolisme périphérique important (seulement 10% de l'hydroxyproline

intacte provenant de la dégradation du collagène est excrétée dans l'urine) et se retrouve dans la diète et dans tous les collagènes structuraux^{42,43}. Malgré plusieurs désavantages reliés à son utilisation, l'hydroxyproline urinaire a longtemps été le marqueur de la résorption osseuse le plus largement utilisé^{42,43}. Cependant, de nouveaux marqueurs de la résorption osseuse plus performants sont maintenant disponibles, telles les molécules de pontage pyridinologique et leurs peptides associés, et sont en voie de remplacer l'hydroxyproline urinaire.

1.5.2.3 Glycosides de l'hydroxylysine urinaires

L'hydroxylysine est un autre acide aminé modifié du collagène^{42,55,56}. Il provient de l'hydroxylation post-traductionnelle de la lysine contenue dans le collagène⁵⁷. Contrairement à l'hydroxyproline, les résidus glycosylés d'hydroxylysine ne sont pas catabolisés suite à la dégradation du collagène et ne sont pas présents dans la diète normale⁴². L'excrétion urinaire des glycosides de l'hydroxylysine est élevée chez les enfants et chez les sujets affectés par la maladie de Paget⁴². La mesure des glycosides de l'hydroxylysine dans l'urine représente un marqueur de la résorption osseuse prometteur, mais les méthodes disponibles pour le mesurer sont complexes et très longues, ce qui explique pourquoi ce marqueur fut moins utilisé que l'hydroxyproline urinaire dans le passé. De plus, la sensibilité de ce marqueur pour mesurer des changements subtils du remodelage osseux, tels ceux associés à l'ostéoporose, reste à confirmer^{42,55,57}.

1.5.2.4 Phosphatase acide tartrate-résistante sérique

La phosphatase acide est une enzyme lysosomiale sécrétée par les ostéoclastes dans le microcompartiment extracellulaire formé entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse lors de la résorption et semble être impliquée dans la dégradation de la matrice osseuse^{42,43}. Cette enzyme est libérée dans la circulation, suite au détachement de l'ostéoclaste à partir de la matrice de l'os, où elle peut être mesurée⁴³. On dénombre

cinq ou six isoenzymes de la phosphatase acide dans le sang qui peuvent être séparées par leur susceptibilité à l'inhibition par le L(+)-tartrate. Les phosphatases acides provenant de l'os et des érythrocytes sont résistantes au L(+)-tartrate et sont appelées phosphatases acides tartrate-résistantes (TRAP)^{42,43}. L'activité de la TRAP mesurée dans le sérum est augmentée chez les enfants, les femmes post-ménopausées et dans plusieurs maladies osseuses caractérisées par un remodelage accéléré⁴². Un dosage radio-immunologique pour la phosphatase acide osseuse a été développé, toutefois ce dosage n'est pas spécifique à l'isoenzyme de l'os^{42,43,57}. Un dosage spécifique à la TRAP osseuse s'avérerait donc plus utile pour évaluer l'activité ostéoclastique, puisqu'il éliminerait la contribution des tissus d'origine non osseuse^{42,56}.

1.5.2.5 Molécules de pontage du collagène (pyridinoline et déoxypyridinoline) et leurs peptides associés (urinaires)

Chaque fibrille de collagène contient des extrémités amino- et carboxy-terminales [appelées N-télopeptides (NTX) et C-télopeptides (CTX), respectivement], lesquelles sont liées à la région hélicale d'une molécule voisine de collagène via les molécules de pontage non réductibles pyridinoline [pyridinoline (Pyr) et déoxypyridinoline (D-Pyr)]⁴³. Ces dernières se retrouvent dans tous les tissus conjonctifs majeurs, excepté la peau^{42,56}. La Pyr et la D-Pyr sont libérées dans la circulation lors de la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes et ne sont pas réutilisées pour la synthèse de nouvelles molécules de collagène⁵⁶. Les études récentes suggèrent que ces deux composantes ne sont pas métabolisées *in vivo*, et qu'elles se trouvent dans l'urine sous formes libres (30 à 40 %) et liées aux NTX et CTX (60 à 70%)^{42,43,55,56}. L'excrétion urinaire de Pyr et de D-Pyr devrait en principe refléter la résorption osseuse puisque l'os représente le principal réservoir de collagène de l'organisme, et qu'il se renouvelle plus rapidement que les autres tissus conjonctifs^{42,43,55,56}. Récemment, plusieurs dosages immunologiques ont été développés, utilisant des anticorps dirigés contre les formes libres des molécules de pontage pyridinoline ou contre les peptides associés à ces molécules (NTX et

CTX)^{42,43,55-57}. L'excrétion urinaire des formes libres (Pyr et D-Pyr) augmente de manière importante après la ménopause et dans des pathologies caractérisées par une augmentation du renouvellement osseux telle qu'observée dans la maladie de Paget. Une augmentation est aussi observée chez les sujets ostéoporotiques^{43,55}. Les molécules de pontage du collagène et leurs peptides associés représentent le marqueur de résorption osseuse le plus prometteur^{42,55}.

1.6 Influences nutritionnelles sur le métabolisme osseux

1.6.1 Calcium

Le principal cation de la phase inorganique ou minérale de l'os est le calcium³⁶. Le tissu osseux constitue la plus grande réserve de calcium de l'organisme : 99% de celui-ci est entreposé dans l'os^{53,54,38}. En réalité, l'ampleur de cette réserve est l'un des déterminants principal de l'intégrité de l'os. Cette réserve osseuse calcique, essentiellement inépuisable, contribue au maintien de l'homéostasie du calcium extracellulaire, qui est utilisé pour les fonctions métaboliques essentielles de l'organisme^{37,38}. Lorsque l'apport en calcium est insuffisant pour rencontrer les besoins de la croissance ou compenser les pertes excrétoires, la résorption osseuse augmente, entraînant une réduction de la masse osseuse et de la résistance de l'os^{36,37}.

Un apport adéquat en calcium est essentiel à l'atteinte d'une masse osseuse optimale et au maintien de cette masse osseuse à l'âge adulte et au grand âge⁵⁸. Des apports faibles en calcium (moins de 60% des ANR) lors de l'enfance sont associés à une augmentation du risque d'ostéoporose plus tard dans la vie⁵⁹⁻⁶¹. Les apports en calcium sont positivement corrélés à la masse osseuse à tous les âges, mais plus particulièrement au cours du vieillissement alors que les besoins augmentent, dû, en partie, à une diminution de l'absorption intestinale du calcium^{62,63} et de la conservation rénale du calcium⁶⁴⁻⁶⁷. C'est aussi à cet âge que les apports tendent à diminuer, créant un écart encore plus grand entre les besoins et les apports³⁶. Certains changements

associés au vieillissement, tels des niveaux élevés de PTH circulante et des valeurs élevées de marqueurs biochimiques de la résorption osseuse (Pyr), ont pu être limités grâce à des apports élevés en calcium (1600 mg/jour)⁶⁸. De même, une supplémentation en calcium a permis de réduire la perte minérale osseuse et le taux de fractures chez les aînés^{69,70}.

1.6.2 Vitamine D

La vitamine D est produite par la peau sous l'action des rayons ultraviolets du soleil, et/ou peut être fournie par la diète⁷¹. Pour devenir biologiquement active, cette vitamine doit subir deux hydroxylations successives dans le foie {25-hydroxyvitamine D [25(OH)D]} et le rein [1,25(OH)₂D ou calcitriol]^{71,72}. La 25(OH)D constitue la principale forme de réserve de la vitamine et son niveau plasmatique est le meilleur indicateur du statut en vitamine D^{37,71}. La 1,25(OH)₂D exerce plusieurs rôles en relation avec le métabolisme osseux. Elle stimule l'absorption intestinale du calcium, en augmentant la synthèse de la protéine de liaison du calcium dans les cellules de la muqueuse intestinale³⁷. Elle stimule également l'absorption intestinale du phosphore, la mobilisation du calcium et du phosphore osseux et la synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes^{36,72}. Par ces actions sur l'intestin et l'os, la vitamine D augmente les concentrations extracellulaires de calcium et de phosphore, favorisant ainsi la minéralisation de la matrice osseuse^{71,72}.

À tous les âges, la vitamine D exerce un rôle important dans la minéralisation du squelette⁷². Une carence en cette vitamine durant l'enfance entraîne le rachitisme, affection caractérisée par une insuffisance de la minéralisation osseuse, causant des retards de croissance et des anomalies squelettiques⁷³. Chez l'adulte, une carence sévère et prolongée en vitamine D cause l'ostéomalacie, maladie qui se caractérise par un ramollissement des os et un taux de fractures élevé⁷³. La concentration de 25(OH)D dans le sérum décline avec l'âge et s'explique par une diminution de l'exposition au soleil, une diminution de l'efficacité de la synthèse cutanée de la vitamine D et/ou une

diminution de l'ingestion d'aliments riches en vitamine D^{37,71}. Par ailleurs, le vieillissement s'accompagne d'une diminution de l'activité de l'enzyme responsable de la transformation du 25(OH)D en 1,25(OH)₂D^{36,37}. Dans une étude de Ooms et al.⁷⁴, une supplémentation en vitamine D (12µg/jour, pendant 3.5 années) chez des personnes âgées a été associée à une réduction des niveaux de PTH et à une augmentation de la densité minérale osseuse.

1.6.3 Phosphore

Le phosphore est un minéral aussi important que le calcium pour la santé osseuse. Composante importante de la molécule d'hydroxyapatite avec le calcium, le phosphore contribue approximativement à la moitié du poids des minéraux de l'os et 85% du phosphore de l'organisme se retrouve dans l'os. Des apports adéquats en phosphore sont donc nécessaires pour permettre la minéralisation et le maintien du squelette^{37,47,53}. Les métabolismes du phosphore et du calcium étant intimement liés, de faibles apports en phosphore peuvent mener à une augmentation du calcium urinaire³⁷. En effet, des apports faibles en phosphore (moins de deux tiers des ANR) sont relativement communs parmi les aînés (approximativement 25%) et peuvent limiter l'utilisation du calcium par l'organisme pour l'accrétion et le remodelage osseux³⁷. Aussi, de faibles concentrations sériques en phosphore limitent la minéralisation osseuse, et ce, bien avant d'observer une diminution du calcium sérique. Il est probable que des niveaux faibles de phosphore compromettent les fonctions ostéoblastiques³⁶. Par ailleurs, peu d'études ont mesuré directement les effets d'apports en phosphore sur les marqueurs de formation et de résorption osseuses. Une étude récente effectuée chez des femmes pré- et péri-ménopausées a montré que l'ingestion de faibles quantités de phosphore est significativement associée à l'excrétion élevée de Pyr et de D-Pyr, marqueurs de la résorption osseuse⁴⁷.

Le phosphore est un minéral relativement peu toxique chez l'humain. En 1982, Heaney et Recker⁷⁵ ont étudié l'influence d'apports variables en phosphore sur la balance calcique et, lorsque consommé en quantités physiologiques, aucun effet dommageable n'a été démontré. D'autres ont confirmé ces résultats chez l'adulte^{13,76}. Chez les rongeurs, la consommation excessive de phosphore alimentaire, lorsque l'apport en calcium est adéquat ou faible, a mené à l'hyperparathyroïdisme secondaire (causé par la diminution du calcium sérique) et à une perte osseuse progressive⁷⁷⁻⁷⁹. La pertinence de ces résultats chez l'humain demeure cependant controversée⁸⁰.

Finalement, chez le rat, le ratio calcium : phosphore de la diète semble être important pour la santé de l'os, un ratio de 1 :1 étant nécessaire à une croissance squelettique normale, et un ratio d'au moins 1.4 :1 étant requis pour une minéralisation adéquate⁸¹. De plus, un ratio encore plus élevé (2 :1) a été suggéré pour réduire la perte osseuse reliée à l'âge chez les rongeurs adultes⁷⁸.

1.6.4 Magnésium

Approximativement 60% du magnésium de l'organisme se retrouve dans l'os⁵³. Localisé sur la surface des cristaux d'hydroxyapatite⁵³, ce minéral participe au métabolisme osseux en agissant comme cofacteur de plusieurs enzymes et contribue à la synthèse de l'ATP (adénosine triphosphate)⁸². Chez l'animal, une carence en magnésium (50 ppm vs 1000 ppm pour les rats contrôles) a été associée à une diminution des activités ostéoblastiques et ostéoclastiques, à un arrêt de la croissance, au développement de l'ostéopénie et à une augmentation de la fragilité osseuse⁸³.

1.6.5 Vitamines (K et C) et éléments traces

Les vitamines K et C et les éléments traces zinc, manganèse et cuivre, sont des cofacteurs essentiels à l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse de divers constituants de la matrice osseuse. Des diètes carencées en ces micronutriments sont

associées à des anomalies squelettiques^{36,37}. Chez l'humain, des diètes carencées en zinc et manganèse ont été associées à un retard de croissance et une fragilité osseuse³⁷. Par ailleurs, des lésions ostéoporotiques sont apparues chez des moutons, des bovins et des rats suite à une carence en cuivre^{36,37}.

La vitamine C est essentielle à l'hydroxylation de la proline et de la lysine, nécessaire au pontage des fibres de collagène^{36,47}. Une carence en vitamine C (< 10 mg/jour) cause le scorbut, maladie caractérisée par des saignements, une chute des dents, une fragilité osseuse et l'apparition de difformités au niveau des articulations⁸⁴. Le rôle précis de la vitamine C au niveau de l'os reste à déterminer³⁶.

Trois protéines osseuses sont dépendantes de la vitamine K pour leur activation physiologique : l'ostéocalcine (protéine-gla osseuse), la protéine-gla matricielle (MGP) et la protéine S⁸⁵. L'ostéocalcine est la protéine la mieux caractérisée des trois. Un niveau sérique élevé d'ostéocalcine sous-carboxylée, forme inactive de la protéine et marqueur d'un apport insuffisant en vitamine K, a été observé chez des sujets ostéoporotiques^{36,37,47}. Les niveaux d'ostéocalcine sous-carboxylée peuvent être normalisés suite à l'ingestion de doses physiologiques de vitamine K^{36,37,47}. En effet, dans une étude d'intervention de deux semaines, Vermeer et collaborateurs⁸⁶ ont démontré que l'administration de 1 mg de vitamine K permettait de diminuer la concentration d'ostéocalcine sous-carboxylée et les niveaux urinaires de calcium et d'hydroxyproline (marqueurs de la résorption osseuse) chez des individus souffrant d'ostéoporose. Malgré tout, le rôle précis de la vitamine K dans le métabolisme osseux reste à déterminer.

1.6.6 Protéines

Environ un tiers de la masse osseuse est constitué de protéines². De ce fait, l'os représente l'un des tissus de l'organisme les plus denses en protéines. Les protéines alimentaires, avec leur contenu en acides aminés essentiels, sont nécessaires à la synthèse de la nouvelle matrice osseuse². Chez l'humain, les ANR pour les protéines varient de 2,0 g/kg de poids corporel chez l'enfant à 1,0 g/kg chez l'adolescent et 0,8 g/kg chez l'adulte⁸⁷. Des apports protéiques inférieurs aux ANR peuvent être particulièrement néfastes pour l'acquisition de la masse osseuse et le maintien de l'intégrité de l'os à l'âge avancé³. Une carence protéique au cours de l'enfance et de l'adolescence est associée à une diminution de la taille, du poids et du contenu protéique corporel. Chez l'animal en croissance, une carence en protéines a entraîné une réduction de la masse et de la résistance osseuse (ostéoporose)³.

La malnutrition protéique est associée à une augmentation du taux de fractures de la hanche, causée par la diminution de la masse osseuse et/ou par l'augmentation des risques de chutes pouvant résulter de la faiblesse musculaire³. Chez la femme âgée, l'apport protéique est inversement corrélé au taux de perte osseuse et positivement corrélé à la densité minérale osseuse³⁷. Par ailleurs, des études ont démontré que la supplémentation protéique chez les patients présentant une fracture de la hanche diminuait les taux de décès et d'institutionnalisation^{3,36,37,88}.

Alors que les conséquences néfastes d'apports protéiques insuffisants sont très bien documentées, les impacts associés à des apports excessifs ne sont pas aussi bien caractérisés. Dans les pages qui suivent, cette dernière problématique sera discutée en détail.

1.7 Influence des protéines alimentaires sur le métabolisme du calcium

Chez l'humain, l'effet calciurétique des protéines alimentaires est connu depuis 1920 grâce aux travaux de Sherman qui observa que l'addition de viande à une diète contenant 390 mg de calcium induisait une augmentation du calcium urinaire⁸⁹. Depuis, plusieurs études ont confirmé qu'une augmentation de l'apport protéique est associée à une élévation de l'excrétion urinaire du calcium chez les sujets humains^{5,6,11-13,30,90-98} et les animaux^{7,8,14-16,20,99-101}. Un article de revue comprenant 16 études réalisées chez des sujets humains indique une relation linéaire ($r = 0,70$) entre les protéines alimentaires et l'excrétion urinaire de calcium pour des apports protéiques <175 g/jour ; pour chaque 50 g de protéines additionnel ingéré, 60 mg supplémentaire de calcium urinaire est excrété^{17,102}. Dans ces études, d'une durée variant entre 12 et 60 jours, les protéines alimentaires étudiées étaient de nature complexe (bœuf, lait, œufs, soya, gluten de blé), ou purifiée (lactalbumine, caséine)^{17,102}. De plus, des analyses de régression, réalisées à partir des études ayant utilisé des protéines *purifiées* ont montré qu'à des niveaux constants de calcium et de phosphore alimentaires, le doublement des apports en protéines de la diète est associé à une augmentation de 50% du calcium urinaire¹³.

Par ailleurs, le rat a souvent été utilisé pour étudier l'effet des protéines alimentaires sur le métabolisme calcique et en particulier sur l'excrétion urinaire du calcium, même s'il ne représente pas un modèle parfait. En effet, la quantité de calcium excrétée dans l'urine est très petite, moins de 1% du calcium de la diète, comparativement à environ 20% chez l'humain^{14,17}. Malgré tout, chez le rongeur, une diète élevée en protéines est également associée à une augmentation de l'excrétion urinaire de calcium. Toutefois, contrairement à l'humain, l'effet calciurétique des protéines tend à diminuer avec le temps^{14,17}. En effet, Allen et Hall¹⁴ ont observé que le doublement des apports en caséine, de 18 à 36%, entraînait une augmentation de la calciurie à court terme (0,7 à 1,7 mg/jour au jour 3), mais que cette augmentation était transitoire, puisqu'au jour 29, le niveau de calciurie était similaire à celui du groupe

témoin. Cette adaptation à une diète élevée en protéines a également été observée dans d'autres études^{16,100}.

Toutefois, il existe quelques études chez les rongeurs où un apport protéique élevé a été associé à une hypercalciurie persistante. En effet, dans une étude de Whiting et Draper⁸, une diète contenant 35% de protéines (comparativement à 15% pour le groupe contrôle) administrée à des rats adultes a été associée à un pic de calciurie au deuxième jour et à une hypercalciurie persistante durant les 8 semaines de l'expérience. Précisons que cette tendance a été confirmée chez la souris²⁰ et dans une autre étude utilisant le rat comme modèle⁷.

Par ailleurs, un article de revue de 15 études réalisées chez l'humain indique que l'augmentation de l'excrétion urinaire du calcium associée aux protéines alimentaires, résulte en une balance calcique négative^{17,102}. Lorsque les apports en calcium varient de 500 à 1400 mg/jour, des apports protéiques relativement faibles (25-74 g/jour) ne semblent pas associés à une balance calcique négative^{17,102}. Cependant, lorsque ces derniers sont augmentés (75 à 124 g/jour), diète typique de la plupart des adultes américains, une rétention négative du calcium est observée chez 10 des 12 groupes de sujets^{17,102}.

Contrairement à ce qui est observé lorsque les apports en calcium sont supérieurs à 500 mg/jour, la calciurie induite par les protéines alimentaires ne semble pas associée à des changements significatifs dans l'absorption intestinale du calcium lorsque les apports en calcium sont relativement faibles (500 mg/jour)^{93,103}. En effet, dans une étude de Linkswiler et al.⁹³ réalisée chez de jeunes adultes, l'absorption intestinale du calcium n'a pas été affectée lorsque les apports protéiques passaient de 48 à 95 puis à 142 g/jour, pour un apport quotidien en calcium de 500 mg. Lorsque les apports quotidiens en calcium étaient de 800 et 1400 mg, et que les apports protéiques étaient augmentés jusqu'à 142 g/jour, l'absorption intestinale du calcium était augmentée, mais pas suffisamment pour éviter une balance calcique négative.

Par contre, chez le rat, la balance calcique ne semble pas affectée par l'augmentation des apports protéiques^{7,14,15}. Plusieurs hypothèses ont été suggérées pour expliquer les divergences observées chez l'humain et le rat. Selon Whiting et Draper⁸, la capacité du rat à contrer l'effet calciurétique des protéines alimentaires, par le maintien d'une balance calcique stable, s'expliquerait par une réduction de l'excrétion fécale du calcium endogène, une augmentation de l'absorption intestinale du calcium et/ou une diminution de la proportion de calcium endogène excrété dans l'urine. Toutefois, cette adaptation à une diète riche en protéines nécessite un apport en calcium suffisant⁷.

On a clairement vu que l'aspect quantitatif des apports protéiques avait un impact considérable sur la calciurie et la balance calcique. Toutefois, la source protéique est également importante et a fait l'objet de plusieurs études.

Lorsque l'on considère la calciurie, le contenu de la diète en phosphore semble particulièrement important. En effet, il semble que le contenu relativement élevé en phosphore des protéines complexes, telle que la viande, pourrait contribuer à empêcher l'augmentation de la calciurie¹⁰⁴. Toutefois, d'autres études ont noté une augmentation de la calciurie suite à un apport élevé en viande, mais l'augmentation du calcium urinaire était moins élevée que celle observée en présence d'une diète élevée en protéines purifiées^{13,105-107}. On peut donc conclure que règle générale, les protéines complexes exercent moins d'effets sur la calciurie lorsque comparées aux protéines purifiées. L'effet du phosphore sur la balance calcique a également été étudié et, en présence d'apports normaux, ce minéral semble avoir peu d'impact^{17,102}. Par exemple, Hegsted et al.¹³ ont mesuré la balance calcique chez des adultes à deux niveaux de protéines (50 et 150 g) et de phosphore (1010 et 2525 mg) alimentaires. Pour les deux niveaux d'apports protéiques, l'augmentation du phosphore a permis de réduire le calcium urinaire d'environ 40% et a amélioré la balance calcique, laquelle est cependant demeurée négative (- 25 mg/jour) pour la diète riche en protéines.

L'incapacité du phosphore à totalement normaliser la balance calcique pourrait s'expliquer par une perte supplémentaire de calcium dans les fécès, pouvant être associée à une augmentation de l'excrétion de calcium dans les sécrétions digestives¹⁰⁸.

De plus, la source protéique alimentaire, animale versus végétale, pourrait représenter un déterminant important du degré de la calciurie induit. Plus particulièrement, il a été suggéré que les protéines de soya (origine végétale) n'élèveraient pas autant la calciurie que les protéines d'origine animale¹⁰⁹. Cependant, des études chez le rat réalisées dans des conditions où les quantités de phosphore et de protéines (purifiées à partir de différentes sources) étaient maintenues constantes, ont démontré que l'apport en protéines de soya induisait néanmoins une hypercalciurie, mais pas aussi marquée qu'en présence de lactalbumine (origine animale)¹¹⁰.

Des mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer l'effet calciurétique des protéines alimentaires, qui semble résulter d'un effet direct des protéines sur les fonctions rénales et non d'un effet sur les hormones régulant la calcémie, c'est-à-dire la PTH et le calcitriol. L'excrétion urinaire de calcium est fonction de la quantité de calcium intégrée à l'ultrafiltrat par opposition à la quantité de calcium qui est par la suite réabsorbée par le néphron¹⁷. La quantité de calcium introduite à l'ultrafiltrat dépend principalement de la concentration sérique en calcium ionisé et du taux de filtration glomérulaire (GFR)¹⁷. Les protéines alimentaires n'exercent pas d'influence mesurable sur la concentration de calcium sérique ultrafiltrable^{6,96,97}. Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation significative du GFR, jusqu'à 20%, suite à un apport protéique élevé^{6,12,13,30,97,111}. Ainsi, Kim et Linkswiler³⁰ ont démontré, chez l'homme adulte, que le fait d'augmenter les apports protéiques quotidiens, de 47 à 142 g, entraînait une élévation significative de 10% du GFR (105 à 116 ml/minute). En tenant compte du fait que le glomérule filtre chaque jour environ 10 g de calcium, une augmentation de 10% du GFR résulterait en une filtration supplémentaire quotidienne de 1 g de calcium³⁰. L'augmentation du GFR ne peut cependant pas totalement expliquer la réponse calciurétique¹⁷. Allen et al.⁹⁵ ont en effet démontré dans une étude

à court terme (4 heures), que l'ingestion de quantités élevées de protéines chez des sujets humains induisait une hypercalciurie immédiate, sans modifier le GFR ou le calcium sérique.

L'augmentation des protéines alimentaires entraîne également une réduction de 0,8 à 1,0% de la réabsorption tubulaire du calcium^{6,30,95}. Cette diminution peut sembler minime, mais considérant que 10 g de calcium sont filtrés chaque jour, une perte de 1% n'est pas négligeable¹⁷. Schuette et al.⁶ ont observé que l'augmentation des apports protéiques, de 47 à 112 g, réduisait de 0,9% la réabsorption du calcium (98,7 à 97,8%) chez des sujets âgés. Une corrélation significative a aussi été observée entre la réabsorption du calcium et la calciurie⁶.

L'acide généré au cours du métabolisme des protéines représente l'élément le plus fréquemment cité pour expliquer la diminution de la réabsorption rénale du calcium en présence d'un apport élevé en protéines^{17,106,109}. Entre 50% et 100% du calcium urinaire excrété suite à l'ingestion d'une diète élevée en protéines, serait attribuable à la production d'acides endogènes^{110,111}. Cette hypothèse a été vérifiée dans une étude de Lutz⁹⁸, où l'ingestion simultanée de 102 g de protéines et de 5,85 g de bicarbonate de sodium (une base) a entraîné une réduction de 43% de la calciurie chez des femmes adultes et une neutralisation complète de l'acide urinaire. Les résultats de cette étude suggèrent donc que d'autres facteurs que l'acide généré par le métabolisme des protéines contribueraient au développement de l'hypercalciurie.

Par ailleurs, il a été proposé que la charge acide d'une diète élevée en protéines et la charge alcaline d'une diète élevée en aliments d'origine végétale pourraient être les facteurs responsables de la balance calcique¹¹². La diète courante contiendrait et/ou générerait environ 50 à 100 mEq d'acide par jour, devant être neutralisé¹¹³. La charge acide rénale potentielle (PRAL) d'une diète peut être prédite à partir de sa composition. En effet, Remer et Manz¹¹⁴ ont calculé le PRAL de 114 aliments fréquemment consommés (portion de 100 g). Ainsi, les fruits et légumes ont une valeur de PRAL

négative, indiquant une réduction de la production d'acide ; le lait et le yogourt produisent un PRAL d'environ 1 mEq, alors que les viandes rouges, poissons, volailles, fromages et certains produits céréaliers génèrent 7 mEq ou plus d'acide par portion de 100 g. Une étude récente a démontré que l'addition de fruits et légumes à une diète élevée en protéines diminuait la calciurie de 47 mg/jour (157 à 110 mg/jour), même si les apports protéiques et calciques étaient demeurés constants¹¹⁵. Ainsi, il semble que le PRAL de la diète totale est un élément plus important relativement à la rétention calcique que la source protéique¹¹².

L'origine de l'augmentation de la production et de l'excrétion d'acides endogènes a été étudiée par Trilok et Draper¹¹⁶ chez des sujets adultes consommant une diète élevée en protéines (120 g/jour pour les hommes et 106 g/jour pour les femmes) et semblerait reliée à une augmentation de l'oxydation des acides aminés soufrés, c'est-à-dire la méthionine et la cystéine. Cette réaction produit du sulfate inorganique (SO_4^{2-}) et deux ions hydrogènes (H^+). Le sulfate est excrété dans l'urine et les ions hydrogènes se combinent à l'ammoniaque pour être excrété sous forme d'ammonium¹⁷. D'ailleurs, une corrélation positive a été observée entre la calciurie et l'excrétion urinaire d'acide et de sulfate chez des sujets âgés⁶. La diminution de la réabsorption du calcium associée à l'augmentation de la concentration du sulfate s'expliquerait par l'augmentation de l'électronégativité dans la lumière du tubule rénal et/ou par la formation d'un complexe calcium-sulfate dans le filtrat rénal⁶. Dans une étude de Whiting et Draper¹⁰⁰, effectuée chez le rat adulte, il a été démontré que la réponse calciurétique aux protéines alimentaires était proportionnelle au contenu en acides aminés soufrés de la diète : lactalbumine > blancs d'œufs > caséine > gélatine. Des études chez l'humain suggèrent que plus de la moitié de l'augmentation de la calciurie serait attribuable au catabolisme des acides aminés soufrés et à l'excrétion ultérieure du sulfate^{31,111,116}.

Par ailleurs, d'autres facteurs, en plus de l'augmentation du GFR, pourraient expliquer l'augmentation de la calciurie. En effet, il est bien établi que les protéines et les acides aminés de la diète stimulent la sécrétion d'insuline¹⁷. Allen et al.¹¹⁷ ont réalisé une étude chez des sujets humains dans laquelle ils ont évalué l'effet postprandial de la consommation d'une diète adéquate (15 g) ou élevée (45 g) en protéines sur la concentration d'insuline dans le sérum, et la relation entre la sécrétion de cette hormone et la calciurie. La concentration sérique d'insuline était significativement plus élevée en présence de la diète élevée en protéines et une corrélation significative a été observée entre l'excrétion urinaire de calcium et l'insuline sérique, suggérant une implication de l'insuline dans la réponse calciurétique. Cette hypothèse a été appuyée dans une étude réalisée chez l'animal, où l'effet hypercalciurétique induit par l'infusion d'arginine, a été bloqué par la streptozotocine, un agent inhibiteur de la sécrétion d'insuline¹⁷. Il a aussi été suggéré que le glucagon et l'IGF-1 pourraient jouer un rôle dans la réponse calciurétique associée aux protéines alimentaires¹⁰⁹. Toutefois, l'importance du rôle exercé par ces facteurs reste à déterminer.

En somme, ces données suggèrent que les effets des protéines de la diète sur l'excrétion et la rétention du calcium sont, en grande partie, dépendants du contenu en acides aminés soufrés des protéines de la diète.

1.8 Effets des protéines alimentaires sur l'intégrité osseuse

En dépit de l'impact net des protéines de la diète sur la calciurie et la balance calcique, l'importance de ces effets sur le métabolisme osseux demeure controversée. Bien que suggéré en 1968 par Wachman et Bernstein⁴, ce n'est qu'à partir des années 1970 que la question des effets possiblement néfastes d'un excès d'apports protéiques sur l'intégrité osseuse commença à être étudiée, grâce à une étude où l'ajout de protéines purifiées à une diète a été associé à une balance calcique négative⁹³. La conséquence à long terme d'une faible diminution de la balance calcique peut être

considérable. En effet, il a été calculé qu'une balance calcique négative quotidienne de 25 à 30 mg représenterait une perte de 10 g de calcium par année, soit 1% du calcium de l'organisme¹⁷. L'effet de la présence d'acide sur les cellules osseuses a été étudiée *in vitro*¹¹⁸ et même une légère baisse du pH (environ 0,02 unités) dans des conditions physiologiques a induit une importante stimulation de la résorption osseuse. Selon Green et Kleeman¹¹⁹, l'impact sur l'intégrité osseuse sera d'autant plus important en présence d'une production *chronique* d'acide, puisque les réserves de l'os seront mises à contribution.

L'effet des protéines alimentaires sur le métabolisme osseux a été évalué à partir de divers marqueurs biochimiques du remodelage osseux, mais les études ayant utilisé cette méthode sont limitées. Schuette et al.³¹ et Kim et Linkswiler³⁰ ont rapporté chez des sujets humains une augmentation de l'excrétion urinaire d'hydroxyproline, un marqueur de la résorption osseuse, suite à l'ingestion d'une diète riche en protéines. Cependant, dans une étude de Allen et al.¹², aucun changement de ce marqueur n'a été observé suite à un apport protéique élevé. Utilisant l'excrétion urinaire des molécules de pontage pyridinologique (Pyr), Shapses et al.⁹ en sont venus à la même conclusion. Plus récemment, une étude de Kerstetter et al.¹⁰ réalisée chez des jeunes femmes en santé a évalué l'effet de trois apports protéiques (faible, moyen et élevé) sur différents marqueurs biochimiques du remodelage osseux et lorsque comparée à la diète faible en protéines (0,7 g/kg), la diète riche en protéines (2,1 g/kg) a été associée à une augmentation significative des excrétions urinaires de calcium et de N-télopeptides, deux marqueurs de la résorption osseuse. De plus, en comparant les mêmes diètes, aucun changement de l'ostéocalcine (un marqueur du remodelage osseux) et de la phosphatase alcaline (un marqueur de la formation osseuse) n'a été observé dans le sérum. Sur la base de cette étude, il semble donc que la résorption osseuse soit augmentée sans qu'il y ait compensation de la formation osseuse.

Par ailleurs, les études ayant analysé l'association entre les protéines de la diète et la masse osseuse ont donné des résultats contradictoires²⁵⁻²⁹. Trois de ces cinq études, réalisées chez des jeunes femmes adultes, ont démontré une association positive entre l'apport protéique et la masse osseuse, telle qu'évaluée par la densité osseuse et le contenu minéral osseux^{25,28,29}. Cette corrélation n'a toutefois pas été confirmée dans un groupe de femmes post-ménopausées²⁹. Par ailleurs, des corrélations négatives ont été observées entre l'apport protéique et la masse osseuse²⁶ et entre l'apport protéique et l'accrétion osseuse²⁷. La relation entre l'apport protéique et l'incidence de fractures a également été étudiée et, bien que des études aient observées des associations positive³²⁻³⁴ et négative³⁵, ces résultats restent difficiles à interpréter du fait que des facteurs, tels que l'apport en calcium et en d'autres éléments nutritifs impliqués dans le métabolisme osseux, n'ont pas toujours été contrôlés. D'ailleurs, étant donné l'importance de ces éléments nutritifs, il a été proposé d'évaluer les diètes non pas au niveau de leurs apports protéiques totaux, mais plutôt au niveau de leurs ratios calcium : protéines^{2,120}.

En marge des études chez l'humain, des études animales ont été réalisées pour évaluer l'effet d'un apport protéique élevé sur l'intégrité osseuse. La plupart des études ont démontré que chez le rat, l'augmentation des apports protéiques n'affectait pas la balance calcique et l'intégrité osseuse^{7,8,16,20,24,121}. En effet, dans une étude à long terme (10 mois) réalisée par Whiting et Draper⁸, le poids, la composition, la densité et la morphométrie du fémur, un os considéré comme étant sensible à la perte osseuse chez les rongeurs, étaient comparables chez les animaux recevant une diète de 15% et 35% de protéines.

Cependant, quelques études ont démontré certains effets néfastes sur l'intégrité osseuse d'un apport excessif en protéines²¹⁻²³. En effet, des apports protéiques élevés ont été associés à une réduction de la longueur et de la résistance du fémur chez des rats adultes²¹ et à une inhibition de la formation osseuse (due à un défaut spécifique de la

formation de l'ostéoïde et de sa minéralisation ultérieure)^{22,23}. Des résultats similaires ont été obtenus avec une diète élevée en acides aminés soufrés¹²².

Par contre, certaines études ont démontré des effets bénéfiques d'une diète élevée en protéines sur l'intégrité osseuse^{21,24}. En effet, dans une étude de Howe et Beecher²¹ réalisée chez des jeunes rats et des rats adultes, l'administration de 45% de protéines a été associée à une concentration en phosphore significativement plus élevée dans le fémur des jeunes rats seulement. Suite à ces observations, il a été proposé qu'une diète riche en protéines au cours de la croissance pourrait stimuler le stockage du phosphore, ce qui, en retour, retarderait le développement de l'ostéoporose associé à l'âge²¹. Aussi, des rats âgés de 4 mois soumis à une diète contenant 24% de protéines présentaient des contenus osseux en calcium significativement plus élevés que ceux des rats consommant 16% de protéines, sans toutefois affecter le contenu en phosphore de l'os²⁴.

2. Besoins protéiques chez le rat

Selon les dernières recommandations de l'American Institute of Nutrition (1993)⁴¹, les besoins protéiques chez le rat en croissance s'établissent à 17% et sont de 12% chez le rat adulte. Des niveaux de protéines allant jusqu'à 22-23% ont cependant souvent été utilisés comme apports normaux. Toutefois, l'impact de ces niveaux de protéines en regard de la santé de l'os a été peu étudié en fonction du vieillissement. Compte tenu de l'importance du calcium au niveau de la santé osseuse, le présent projet consistait donc à étudier l'effet d'apports variables en protéines (13.2% et 22%) et en calcium (0.5% et 1%) au cours du vieillissement chez le rat.

3. Hypothèse de recherche et objectifs de l'étude

3.1 Formulation de l'hypothèse de recherche

Les apports en protéines et en calcium influencent le contenu minéral osseux au grand âge.

3.2 Objectifs de l'étude

Les principaux objectifs de cette étude sont les suivants :

1. Évaluer l'impact des protéines et du calcium alimentaires sur divers paramètres sériques et urinaires du métabolisme calcique et protéique, et sur l'intégrité osseuse, au cours du vieillissement.
2. Déterminer s'il existe une relation entre l'apport en protéines et en calcium en regard de l'intégrité osseuse.

III. ARTICLE

Life-long protein and calcium intake affects bone integrity in aging rats: importance of the calcium:protein ratio.

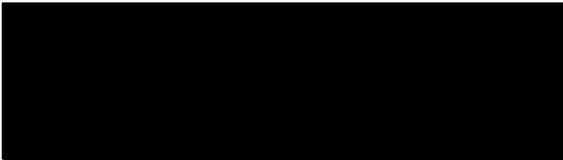
Roy J¹, Mainville D¹, Gaudreau P², Ferland G^{1&3}.

¹ Département de nutrition, Université de Montréal

² Département de médecine, Université de Montréal

³ To whom correspondence should be addressed at:

Département de nutrition
Université de Montréal
2405 Ch Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec CANADA
H3C 3J7



Abbreviations used: P, protein; Ca, calcium; PTHrp, parathyroid hormone-related protein

Key words: Protein intake, calcium intake, bone health, aging, animal studies

ABSTRACT

High protein intake has been shown to increase urinary calcium excretion and affect calcium balance, with potential effects on bone status. However, most studies conducted thus far have used levels of protein that bear little pertinence to normal diet and have mostly been short term in design. To gain insight on the effect of physiologically normal levels of protein intake on bone during aging and to determine the potential interaction with calcium intake, a 22-month study was conducted in male Sprague-Dawley rats fed diets containing either 13.2% or 22.0% proteins (P) and 0.5% or 1.0% calcium (Ca). Parameters of bone status were femur anthropometry (length, width, wet weight, dry fat-free weight and ash weight) and femur calcium, phosphorus and magnesium contents. Other parameters investigated were body weight, daily food intake, plasma calcium and urinary calcium, proteins and creatinine concentrations. Minerals, creatinine and proteins were measured using colorimetric methods. Rats consuming the 0.5% calcium diet were killed at 13, 18 and 22 months of age, and those fed the 1.0% calcium diet were killed at 22 month-old age. Our results show that femur calcium and phosphorus contents were not affected significantly during aging, while bone magnesium decreased with age. Although not significantly affected by protein intake, calciuria tended to be higher in 13-month old rats receiving the 22% protein diet ($p=0.13$) although this effect gradually disappeared with advancing age. Highest bone calcium and phosphorus concentrations were observed with the 13.2% P/0.5% Ca and the 22% P/1% Ca diets which correspond to calcium:proteins (mg:g) ratios of 38:1 and 45.5:1, respectively. Interestingly, when fed 13.2% protein, rats had significantly lower ash bone weight and lower bone calcium content when diets contained 1% (calcium:proteins, 76:1) than 0.5% calcium ($p<0.05$). In conclusion, results from this study show that despite a tendency for increased calciuria at adulthood, diets containing 22% protein are not detrimental to bone in old age. Results also confirm the interaction between dietary protein and calcium and point to the importance of the calcium:protein ratio of the diet. During aging, ratios in the 40:1 range appears adequate whereas higher ratios (76:1) could be detrimental. Further studies using more specific markers of bone turnover and measures of functional capacities should be conducted to confirm

these results.

INTRODUCTION

Dietary proteins are an essential component of bone and are required for the synthesis of new bone matrix. While the detrimental effects of low dietary protein intakes are well established (Heaney 1998), the impact of excess protein intake on bone integrity remains equivocal. In a 10-month study, Whiting and Draper (1981) reported no significant effect of a high protein diet (35% vs 15%) on bone composition, confirming reports by Bell et al. (1975), Calvo et al. (1982) and Yuen and Draper (1983). However, deleterious (Funaba et al. 1990, Howe et Beecher 1983, Weiss et al. 1981) and beneficial (Graves et Wolinski 1980, Howe et Beecher 1983) effects of high protein diets on bone status have also been reported. In a study of Graves and Wolinsky (1980), 4 month-old rats receiving a 24% protein diet had significantly higher bone calcium concentration compared to rats fed a 16% protein diet.

One mechanism through which protein appears to exert its effect on bone is by alteration of calcium metabolism. Excess dietary proteins have been shown to induce hypercalciuria and have been associated with negative calcium balance in some studies (Heaney 1993, Reid and New 1997). The hypercalciuria is primarily the result of a decrease in renal tubular reabsorption of calcium associated with the increased acid load following amino acids catabolism.

Most studies conducted thus far that have investigated the impact of high protein intakes on calcium metabolism and bone have used levels that often fall outside the normal physiological range. Consequently, these studies bear little relevance to normal nutritional conditions. Furthermore, most studies have been short term in design or have been conducted in growing or mature animals. In 1993, the American Institute of Nutrition published dietary guidelines for rodents, protein recommendations were set at 17% and 12% for growing and aging rats respectively, while those for

calcium were set at 0.5%, irrespective of age. It is noteworthy that levels up to 22-23% have often been used as 'normal diets' in many published short-term studies. Furthermore, the AIN protein recommendation for aging rats (12%), has been little investigated with respect to bone status during aging. To gain insight on the effect of these physiologically normal levels of protein intake on bone during aging and to determine their potential interaction with calcium intake, a 22-month study was conducted where male Sprague-Dawley rats were fed diets containing either 13.2% or 22.0% proteins and 0.5% or 1.0% calcium.

MATERIALS AND METHODS

Rats and diets. This experimental protocol was approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Male weanling Sprague-Dawley rats ($n = 156$) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec). Animals were housed in wire-bottom cages under constant temperature of 22°C and a 12 h light/12 h dark cycle. After one week of acclimatization, rats were randomly assigned to a semi-synthetic diet containing either 13.2% or 22.0% protein and either 0.5% or 1.0% calcium. The calcium : phosphorus ratio was 1.3 : 1. Details of the diets are presented in **Table 1**. Three month-old rats (CR Rodents, # 5075, Charles River, Québec) which had been fed a chow diet containing 18% protein since weaning were purchased separately. All animals had free access to water.

Experimental design. Rats were weighed once a week and food intake was monitored bi-weekly during the first 8 months and once a week thereafter. Rats consuming the 0.5% calcium diet were killed at 13, 18 and 22 month-old age, while those fed the 1% calcium diet were killed at 22 months of age. In all groups, 24 hrs urine collections were obtained before each sacrifice by placing rats in metabolic cages. At death, animals were exsanguinated and plasma was immediately separated following a 10 minutes centrifugation at 500 X g. Femurs were excised, stripped of soft tissue and stored at -80°C until assayed. Three month-old rats were subjected to the same procedure.

Analytical procedures.

Bone measurements. Femur length, width and weights were assessed using bone from the right leg. Total length and width were measured with a Vernier calliper. Femur weights (dry and ash) were determined as follows : bones were dehydrated and defatted by extraction in ethanol/ethyl ether for 48 hrs (1 :1 with a change of solvents after 24 hrs) and in ethyl ether (100%) for another 24 hrs. They were dried at 110°C for 24 hrs and weighed for the determination of dry fat-free weight. Bones were then placed in

crucibles and ashed at 600°C overnight. Following ashing, ash weights were obtained and bones were dissolved in 6N HCl for mineral analyses. Calcium, phosphorus and magnesium contents of femurs were determined colorimetrically (Sigma Diagnostics, St-Louis, MO).

Urine measurements. Parameters consisted of urinary volume, calcium, protein and creatinine, and represent the means of four collections. For calcium analysis only, urinary pH was adjusted to 4-6 with 6M HCl. Calcium and creatinine contents were assessed using colorimetric methods (Sigma Diagnostics, St-Louis, MO). Urinary protein concentrations were determined according to Lowry et al. (1951).

Serum measurements. Serum calcium concentrations were determined using colorimetric methods (Sigma Diagnostics, St-Louis, MO).

Statistical analyses. All variables were analyzed with respect to diet using Student's t-test and with respect to age using oneway ANOVA. Differences of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Statistical analyses were conducted using the SPSS/PC + 8.0 program (Microsoft Corp., 1988). The data are presented as means \pm SEM.

RESULTS

Daily food intake at ages 13, 18 and 22 months are presented in **Table 2**. Diet did not influence the daily consumption of food except at 13 months when rats fed the 13.2% P/1% Ca diet had significantly higher food intake when compared to rats receiving the 13.2 % P/0.5% Ca diet (23.4 g/d vs 21.5 g/d, respectively). Body weights of animals are shown in **Figure 1**. Body weights increased gradually with age, reached a plateau around 18 months and then started to decline around 20 months of age. Body weights were not significantly affected by protein and calcium intakes.

Results for calcemia, calciuria, proteinuria and creatininuria are shown in **Table 3**. Calcemia generally increased with age ($p < 0.05$ between 3 months and 18 and 22 month-old age, 22% P diet; and $p < 0.05$ between 13 months and 18 and 22 months, 22% P diet). At 22 months, calcemia were higher in rats fed the 22% protein diet ($p < 0.05$) and tended to decrease as a function of calcium intake ($p < 0.05$, 22% protein diet).

Urinary calcium, creatinine and proteins tended to increase with age, suggesting a decrease in renal function. Calcium excretion tended to be higher in rats fed the 22% P diet at 13 months of age ($p = 0.13$), but this effect was no longer observed at 22 months. Calciuria was not significantly affected by calcium intake. Finally, creatininuria and proteinuria were not significantly affected by any of the dietary factors.

Results for bone anthropometry are presented in **Table 4**. All parameters increased significantly after 3 months of age, and reflect normal growth. In general, bone weights were not affected during aging, values at 13 and 22 month-old being statistically comparable. The significantly lower wet weights observed at 18 months remains unexplained and may be due to a cohort effect. At 13 months of age, femurs were significantly longer and dry and ash weights tended ($p = 0.06$) to be higher in rats fed 13.2% than in those fed 22% proteins but these trends disappeared with age.

Finally, in 22-month old rats fed 13.2% P diets, ash ($p<0.05$) and dry weights ($p=0.065$) were higher in those fed diets containing 0.5% than 1% Ca.

Table 5 shows results of bone mineral contents for calcium, phosphorus and magnesium. Femur calcium and phosphorus contents were not significantly different between 13 and 22 months but were statistically lower at 18 compared to 22 months ($p<0.05$). Bone magnesium content generally decreased with age irrespective of protein intake ($p<0.05$ between 13 and 18 month-old age ; $p<0.05$ between 13 and 22 months of age for 13.2 % P diet only).

At 22 months, highest bone calcium and phosphorus contents were observed with diets containing 13.2% P/0.5% Ca, and 22% P/1% Ca which correspond to calcium:proteins (mg:g) ratios of 38:1 and 45.5:1, respectively. Interestingly, when fed 13.2% protein, rats had lower bone calcium content when diets contained 1% (calcium:proteins, 76:1) than 0.5% Ca ($p<0.05$).

Finally, femur magnesium content were not significantly affected by dietary proteins but increased as a function of calcium intake in rats fed the 13.2% P diet ($p<0.05$).

DISCUSSION

Age effect

Calcemia. In the present study, calcemia was found to increase generally with age in contrast to other studies where serum calcium was often reported not to be affected by age (Kalu et al. 1983, Kalu et al. 1984, Kiebzak and Sacktor 1986, Kiebzak et al. 1988, Prasad et al. 1986). In a study by Kiebzak et al. (1988) conducted in 6, 12 and 24 month-old rats fed a 23.5% P/1.2% Ca diet, serum calcium levels were 2.28, 2.32 and 2.30 mM (91.2, 92.8 and 92.0 mg/L) respectively. The observed age-related increase in calcemia in the present study could be explained by the presence of tumors in old animals. Indeed, hypercalcemia is often associated with malignancy (humoral hypercalcemia of malignancy or HHM), where hypercalcemia results from an increase in systemic bone resorption by bone resorbing factors, especially PTHrp (parathyroid hormone-related protein), produced from tumor cells (Ng and Martin 1990, Rankin et al. 1997, Takahashi et al. 1998). Both PTHrp and PTH act through a common receptor which elevate serum calcium by promoting bone resorption and increasing tubular reabsorption of calcium (Rankin et al. 1997, Rizzoli et al. 1989). In the present study, 11.6% of rats had developed mammary (fibroadenomas) and pituitary tumors at the time of death. Another possible mechanism could be the onset of primary hyperparathyroidism (Mundy and Martin 1982).

Urinary parameters. Although results did not reach statistical significance, calciuria, proteinuria and creatininuria gradually increased with age. Data from other studies have reported 2.5 to 3-fold higher daily urinary calcium excretion in senescent (24, 25 and 30 months of age) as compared to young (6 month-old age) or adult rats (12 and 13 month-old age) (Armbrecht et al. 1984, Gaumet et al. 1997, Prasad et al. 1986). In the present study, 24-hour urinary Ca excretion were 1.5- 2.4 X and 1.2-2.2 X greater in 18 and 22 than in 13 month-old rats, respectively. Elevated urinary protein (Beauchene et al. 1970, Bertani et al. 1989, Everitt et al. 1982, Neuhaus and Flory 1978) and creatinine (Bertani et al. 1989) excretions with increasing age have also been

reported in rats. It has been suggested that age-associated proteinuria reflect a decrease in renal function (Bertani et al. 1989, Everitt et al. 1982).

Anthropometry. In the present study, all anthropometric parameters increased significantly after 3 month-old age, reflecting the normal growth, and confirming results reported by other investigators (Blanusa et al. 1978, Kalu et al. 1984, Kiebzak et al. 1988). Also, femur length did not increase after 13 month-old age for both dietary groups. Our results agree with those of Kalu et al. (1984), in which length of femurs and tibiae were assessed in 1.5, 6, 12, 18, 24 and 27-month old rats, and maximal lengths were observed at 12 months of age. Another study conducted in rats reported no measurable growth after 14 months of age (McDonald et al. 1986). Increases in femoral width and weight have been reported between 12 and 24 months and may suggest ongoing architectural adjustments rather than linear growth (Kiebzak et al. 1988).

Bone mineral content. Femoral calcium and phosphorus contents were not significantly different between 13 and 22 months of age confirming other reports in which calcium content were assessed up to 30 months (Beyer et al. 1985, Kalu et al. 1984, Weiss et al. 1969). Interestingly, bone calcium content was significantly lower in 18-month old rats fed the 13.2% P diet. Decreased bone calcium content have been observed between 12 and 30 months (Gaumet et al. 1997, Kiebzak et al. 1988), and between 7 and 19 months (McDonald et al. 1986), in rats were fed 18-23.5% protein. In most of these studies, bone phosphorus content did not change as a function of age as was observed in the present study.

About two-thirds of the body's magnesium is present in bone, this mineral being located on the surface of the hydroxyapatite crystal (Martini and Mayer 1999). In the present study, magnesium was shown to decrease during aging, a finding reported by others (Alfrey et al. 1974, McDonald et al. 1986, Nishimoto and Padilla 1989, Smith and Field 1963, Wallach 1990). Some years ago, Alfrey et al. (1974) suggested that the age-induced decrease in bone magnesium was the result of a

reduction of the freely exchangeable bone magnesium pool. However this hypothesis remains to be confirmed.

Dietary effects

Calcemia. Our results show that calcemia was unaffected by dietary protein level, except at 22 months of age, where rats fed the 22% protein diet (0.5% calcium) had significantly higher plasma calcium. In a study by Kalu et al. (1984) conducted in rats aged 1.5, 6, 12, 18, 24, 27 and 30 month-old consuming 12.6% and 21% P diets, serum calcium was not significantly different among groups. In another report, 5 month-old rats fed 25% proteins had lower whole-blood calcium concentration when compared to rats fed 45% proteins (Howe and Beecher 1983). Because part of serum calcium are bound to proteins and because protein level increase with intake (El-Maraghi et al. 1965), this higher calcemia could simply reflects an elevation in protein-bound calcium (Howe and Beecher 1983).

In the present study, calcemia decreased significantly as a function of dietary calcium in 22 month-old rats ($p < 0.05$, 22% P diet). Our results are in accord with those of Newell and Beauchene (1975), where 13 and 25 month-old rats fed 1.2% Ca diet were found to have significantly lower calcemia when compared to those fed 0.5% Ca diet. These authors attributed this change to the high level of phosphorus (1%) present in the high Ca diet as it is well established that a high phosphorus diet induces hypocalcemia (Calvo 1993, Robins and New 1997). However, the effect of a high Ca diet on calcemia have not been observed in all studies, although factors such as phosphorus content of the diet have not always been controlled (Blanusa et al. 1978b, Boyce and Weisbrode 1983, Shapira et al. 1995).

Calciuria. Elevated protein intake have resulted in increased calciuria in both rats (Allen and Hall 1978, Bell et al. 1975, Calvo et al. 1982, Howe and Beecher 1981, Whiting and Draper 1980) and humans (Allen et al. 1979, Hegsted et al. 1981, Johnson et al. 1970, Margen et al. 1974, Schuette et al. 1980). However, in many of these

reports, dietary protein was consumed in very high amounts, in contrast to our study where physiological amounts were investigated. Although not statistically different, urinary calcium excretion tended to be higher at 13 months of age in rats fed 22% proteins ($p=0.13$ in rats) compared to those fed the 13.2% P diet. Interestingly, this protein effect gradually disappeared at a later age. In a study by Graves and Wolinsky (1980) conducted in 3 month-old female rats, calciuria was significantly greater when rats were fed 24% than 16% proteins.

Anthropometry. In general, anthropometric measures were little affected by either protein or calcium intake, the only significant result being observed at 22 months in the 13.2% P group with rats fed 0.5% Ca showing higher ash and dry weights compared to those fed 1% . The lack of a protein effect on bone anthropometry agree with results from Kalu et al. (1984), where dietary protein (12.6% vs 21%) had no significant effect on femur length and dry defatted weight in 12, 18 and 24 month-old rats. Similar lack of a protein effect on femur length, wet weight, dry weight, dry fat-free weight and ash weight have been reported in other studies using rats and mice (Calvo et al. 1982, Whiting and Draper 1981, Yuen and Draper 1983).

Effects of high calcium content on bone anthropometry also resulted in no effect. In a study by Peterson et al. (1995), feeding weanling rats 0.5% or 1% Ca diets for 37 weeks had no impact on fat-free dry and ash tibial weights. Also, increasing Ca intake from 0.6% to 1.2% had no effect on vertebral weight in 24-month old rats (Shapira et al. 1995).

Bone mineral content. Results from this study indicate that despite a calciuric effect at 13 months of age, prolonged consumption of a 22% P diet is not associated with lower bone mineral content in old age. Highest bone calcium and phosphorus contents were observed with diets containing 13.2% P/0.5% Ca, and 22% P/1% Ca. Most studies conducted thus far have failed to show significant impact of protein intake on either bone calcium, phosphorus or magnesium contents (Kalu et al. 1984, Roughead et al. 1988, Takeda et al. 1996, Whiting and Draper 1981). However, in one

report by Graves and Wolinsky (1980), feeding 4 month-old rats diets containing 24% P diets were associated with significantly higher bone calcium (but not phosphorus) concentrations when compared to rats fed 16% proteins. In diets containing 20-21% proteins, increasing calcium intake (0.8-1.2% vs 0.4-0.6%) resulted in higher bone calcium (Kunkel et al. 1990, Peterson et al. 1995, Shapira et al. 1995) and phosphorus (Kunkel et al. 1990) contents of femur, tibiae and vertebrae. In the present study, increasing the calcium content of the diet from 0.5 to 1% was associated with significantly higher mineral content in the 22% P but not in the 13.5% P diet.

In 1993, protein recommendations for growing and mature rats were established at 17% and 12% by the American Institute of Nutrition while those for calcium were set at 0.5% irrespective of age. These recommendations imply Ca:P ratios of 29:1 and 42:1 respectively. In the present study, diets with Ca:P ratios of 38:1 and 45.5:1 were associated with highest bone mineral contents while a ratio of 76:1 (13.2% P/1% Ca) was associated with lower contents. Hence it appears that while Ca:P ratios in the range of 40:1 appears adequate to maintain bone health during aging, higher ratios could be detrimental. Further studies using markers of bone turnover and functional capacity will have to be conducted to confirm these preliminary results.

REFERENCES

- Alfrey, A.C., Miller, N.L. & Trow, R. (1974) Effect of age and magnesium depletion on bone magnesium pools in rat. *J. Clin. Invest.* 54 : 1074-1081.
- Allen, L.H. & Hall, T.E. (1978) Calcium metabolism, intestinal calcium-binding protein, and bone growth of rats fed high protein diets. *J. Nutr.* 108 : 967-972.
- Allen, L.H., Oddoye, E.A. & Margen, S. (1979a) Protein-induced hypercalciuria : a longer term study. *Am. J. Clin. Nutr.* 32 : 741-749.
- Armbrecht, H.J., Forte, L.R. & Halloran, B.P. (1984) Effect of age and dietary calcium on renal 25(OH)D metabolism, serum 1,25(OH)₂D, and PTH. *Am. J. Physiol.* 246: E266-E270.
- Beauchene, R.E., Roeder, L.M. & Barrows Jr., C.H. (1970) The interrelationship of age, tissue protein synthesis, and proteinuria. *J. Gerontol.* 25 : 359-363.
- Bell, R.R., Engelmann, D.T., Sie, T.-L. & Draper, H.H. (1975) Effect of a high protein intake on calcium metabolism in the rat. *J. Nutr.* 105 : 475-483.
- Bertani, T., Zoja, C., Abbate, M., Rossini, M. & Remuzzi, G. (1989) Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content. *Lab. Invest.* 60 : 196-204.
- Beyer, R.E., Huang, J.C. & Wilshire, G.B. (1985) The effect of endurance exercise on bone dimensions, collagen, and calcium in the aged male rat. *Exp. Gerontol.* 20 : 315-323.
- Blanuša, M., Bogunovic, M. & Matkovic, V. (1978) Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. I. Influence of sex and age. *Pflügers Arch.* 375 : 233-238.
- Blanuša, M., Matkovic, V. & Kostial, K. (1978b) Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. II. Influence of ovariectomy and dietary calcium. *Pflügers Arch.* 375 : 239-244.
- Boyce, R.W. & Weisbrode, S.E. (1983) Effect of dietary calcium on the response of bone to 1,25(OH)₂D₃. *Lab. Invest.* 48 : 683-689.
- Calvo, M.S., Bell, R.R. & Forbes, R.M. (1982) Effect of protein-induced calciuria on calcium metabolism and bone status in adult rats. *J. Nutr.* 112 : 1401-1413.
- Calvo, M.S. (1993) Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *J. Nutr.* 123 : 1627-1633.
- El-Maraghi, N.R.H., Platt, B.S. & Stewart, R.J.C. (1965) The effect of the interaction of dietary protein and calcium on the growth and maintenance of the bones of young, adult and aged rats. *Brit. J. Nutr.* 19 : 491-508.
- Everitt, A.V., Porter, B.D. & Wyndham, J.R. (1982) Effects of caloric intake and dietary composition on the development of proteinuria, age-associated renal disease and longevity in the male rat. *Gerontology.* 28 : 168-175.
- Funaba, M., Kawashima, T., Yano, H. & Kawashima, R. (1990) Effects of a high protein diet on bone formation and calcium metabolism in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 36: 559-567.
- Gaumet, N., Seibel, M.J., Coxam, V., Davicco, M.J., Lebecque, P. & Barlet, J.P. (1997) Influence of ovariectomy and estradiol treatment on calcium homeostasis during aging in rats. *Arch. Physiol Biochem.* 105 : 435-444.

- Graves, K.L. & Wolinsky, I. (1980) Calcium and phosphorus metabolism in pregnant rats ingesting a high protein diet. *J. Nutr.* 110 : 2420-2432.
- Heaney, R.P. (1993) Nutritional factors in osteoporosis. *Annu. Rev. Nutr.* 13 : 287-316.
- Heaney, R.P. (1998) Excess dietary protein may not adversely affect bone. *J. Nutr.* 128 : 1054-1057.
- Hegsted, M., Schuette, S.A., Zemel, M.B. & Linkswiler, H.M. (1981) Urinary calcium and calcium balance in young men as affected by level of protein and phosphorus intake. *J. Nutr.* 111 : 553-562.
- Howe, J.C. & Beecher, G.R. (1981) Effect of dietary protein and phosphorus levels on calcium and phosphorus metabolism of the young, fast growing rat. *J. Nutr.* 111 : 708-720.
- Howe, J.C. & Beecher, G.R. (1983) Dietary protein and phosphorus metabolism in bone, blood and muscle of the rat. *J. Nutr.* 113 : 2185-2195.
- Johnson, N.E., Alcantara, E.N. & Linkswiler, H. (1970) Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium retention of young adult males. *J. Nutr.* 100 : 1425-1430.
- Kalu, D.N., Cockerham, R., Yu, B.P. & Roos, B.A. (1983) Lifelong dietary modulation of calcitonin levels in rats. *Endocrinology.* 113 : 2010-2016.
- Kalu, D.N., Hardin, R.H., Cockerham, R. & Yu, B.P. (1984) Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 115 : 1239-1247.
- Kiebzak, G.M. & Sacktor, B. (1986) Effect of age on renal conservation of phosphate in the rat. *Am. J. Physiol.* 251 : F399-F407.
- Kiebzak, G.M., Smith, R., Gundberg, C.C., Howe, J.C. & Sacktor, B. (1988) Bone status of senescent male rats : chemical, morphometric, and mechanical analysis. *J. Bone Miner. Res.* 3 : 37-45.
- Kunkel, M.E., Powers, D.L. & Hord, N.G. (1990) Comparison of chemical, histomorphometric, and absorptiometric analyses of bones of growing rats subjected to dietary calcium stress. *J. Am. Coll. Nutr.* 9 : 633-640.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 :265-275.
- Margen, S., Chu, J.-Y., Kaufmann, N.A. & Calloway, D.H. (1974) Studies in calcium metabolism. I. The calciuretic effect of dietary protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 27 : 584-589.
- Martini, L.A. & Mayer, J. (1999) Magnesium supplementation and bone turnover. *Nutr. Rev.* 57 : 227-229.
- McDonald, R., Hegenauer, J. & Saltman, P. (1986) Age-related differences in the bone mineralization pattern of rats following exercise. *J. Gerontol.* 41 : 445-452.
- Mundy, G.R. & Martin, T.J. (1982) The hypercalcemia of malignancy : pathogenesis and management. *Metabolism.* 31 : 1247-1277.
- Neuhaus, O.W. & Flory, W. (1978) Age-dependent changes in the excretion of urinary proteins by the rats. *Nephron.* 22 : 570-576.
- Newell, G.C. & Beauchene, R.E. (1975) Effects of dietary calcium level, acid stress, and age on renal, serum, and bone responses of rats. *J. Nutr.* 105 : 1039-1047.
- Ng, K.W. and Martin, T.J. (1990) Humoral hypercalcemia of malignancy. *Clin. Biochem.* 23 : 11-16.

- Nishimoto, S.K. & Padilla, S.M. (1989) Age-related changes in organic and inorganic bone matrix constituents : the effect of environment and diet. Snyder (Ed.) Dietary restriction and aging. Liss., New York, NY, pp. 87-94.
- Peterson, C.A., Eurell, J.O.C. & Erdman Jr., J.W. (1995) Alterations in calcium intake on peak bone mass in the female rat. *J. Bone Miner. Res.* 10 : 81-95.
- Prasad, R., Kinsella, J. & Sacktor, B. (1986) Renal adaptation in metabolic acidosis : effect of age (abstract 2062). *Fed. Proc.* 45 : 508.
- Rankin, W., Grill, V. & Martin, T.J. (1997) Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia. *Cancer.* 80 : 1564-1571.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H. & Fahey, G.C. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939-1951.
- Reid, D.M. & New, S.A. (1997) Nutritional influences on bone mass. *Proc. Nutr. Soc.* 56 : 977-987.
- Rizzoli, R., Caverzasio, J., Chapuy, M.C., Martin, T.J. & Bonjour, J.P. (1989) Role of bone and kidney in parathyroid hormone-related peptide-induced hypercalcemia in rats. *J. Bone Miner. Res.* 4 : 759-765.
- Robins, S.P. & New, S.A. (1997) Symposium on 'Nutritional aspects of bone'. Markers of bone turnover in relation to bone health. *Proc. Nutr. Soc.* 56 : 903-914.
- Roughead, Z.K., Hoover, J.L.B. & Kunkel, M.E. (1988) Effects of dietary protein on bone composition of rats determined by biochemical and absorptiometric methods. *Nutr. Rep. Int.* 37 : 653-664.
- Schuette, S.A., Zemel, M.B. & Linkswiler, H.M. (1980) Studies on the mechanism of protein-induced hypercalciuria in older men and women. *J. Nutr.* 110 : 305-315.
- Shapira, D., Linn, S., Sarid, M., Mokadi, S., Kabala, A. & Silbermann, M. (1995) Calcium and vitamin D enriched diets increase and preserve vertebral mineral content in aging laboratory rats. *Bone.* 16 : 575-582.
- Smith, B.S.W. & Field, A.C. (1963) Effect of age on magnesium deficiency in rats. *Br. J. Nutr.* 17 : 591-600.
- Takahashi, K., Shirahata, A., Fukushima, S., Kokubo, S., Teramura, K. & Usuda, S. (1998) Effects of YM175, a new-generation bisphosphonate, on hypercalcemia induced by tumor-derived bone resorbing factors in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 76 : 155-163.
- Takeda, T., Kimura, M., Yokoi, K. & Itokawa, Y. (1996) Effect of age and dietary protein level on tissue mineral levels in female rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 54 : 55-74.
- Wallach, S. (1990) Effects of magnesium on skeletal metabolism. *Magnes. Trace Elem.* 9 : 1-14.
- Weiss, A.K., McBroom, M.J. & Cornelison, R.L. (1969) Bone electrolytes in the aging rat. *J. Gerontol.* 24 : 438-443.
- Weiss, R.E., Gorn, A., Dux, S. & Nimni, M.E. (1981) Influence of high protein diets on cartilage and bone formation in rats. *J. Nutr.* 111: 804-816.
- Whiting, S.J. & Draper, H.H. (1980) The role of sulfate in the calciuria of high protein diets in adult rats. *J. Nutr.* 110 : 212-222.

- Whiting, S.J. & Draper, H.H. (1981) Effect of chronic high protein feeding on bone composition in the adult rat. *J. Nutr.* 111 : 178-183.
- Yuen, D.E. & Draper, H.H. (1983) Long-term effects of excess protein and phosphorus on bone homeostasis in adult mice. *J. Nutr.* 113 : 1374-1380.

FIGURE LEGEND

Figure 1. Mean body weight of rats fed diets containing 13.2% P/ 0.5% Ca (filled circle), 13.2% P/ 1.0% Ca (opened circle), 22.0% P/ 0.5% Ca (filled triangle) and 22.0% P/ 1.0% Ca (opened triangle) at various ages. Mean body weight were not significantly affected by diet.

Table 1 Diet composition

Ingredient	13.2% protein 0.5% calcium (/kg diet)	13.2% protein 1.0% calcium (/kg diet)	22.0% protein 0.5% calcium (/kg diet)	22.0% protein 1.0% calcium (/kg diet)
Casein, "Vitamin-free test" (g) ¹	132.0	132.0	220.0	220.0
Sucrose (g) ²	485.0	485.0	485.0	485.0
Cornstarch (g) ³	210.0	210.0	122.0	122.0
Corn Oil (g) ⁴	60.0	60.0	60.0	60.0
Cellulose (fiber) (g) ¹	59.0	37.5	59.0	37.5
Mineral mix (g) ^{1,5}	17.5	17.5	17.5	17.5
Vitamin mix (g) ^{1,6}	10.0	10.0	10.0	10.0
DL-Methionine (g) ¹	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate (g) ¹	2.0	2.0	2.0	2.0
Dicalcium phosphate, dihydrate (g) ⁷	21.5	43.0	21.5	43.0
Vitamin K1 (phylloquinone) (µg) ⁸	500	500	500	500

¹ICN Biomedicals Inc.

²Sucre Lantic Limitée

³Best Foods Canada Inc.

⁴Les Produits Alimentaires SA-GER Inc. (La Perla)

⁵without calcium (AIN76)

⁶without vitamin K (AIN76)

⁷Rhône-Poulenc Inc. (food grade)

⁸Sigma Chemical CO, V-3501

Table 2 Daily food intake of rats at 13, 18 and 22 months.

Age (months)	Food intake (g/d)			
	13.2% protein 0.5% calcium	13.2% protein 1.0% calcium	22.0% protein 0.5% calcium	22.0% protein 1.0% calcium
13	21.86 ± 0.22*	23.41 ± 0.52	22.06 ± 0.22	23.23 ± 0.68
18	22.82 ± 0.45	23.11 ± 0.75	23.16 ± 0.38	22.80 ± 0.55
22	22.39 ± 1.05	22.98 ± 0.44	23.27 ± 0.83	23.82 ± 2.12

Values are means ± SEM, n= 9-66 rats.

*P< 0.05 different from rats same age consuming 1.0% calcium diet.

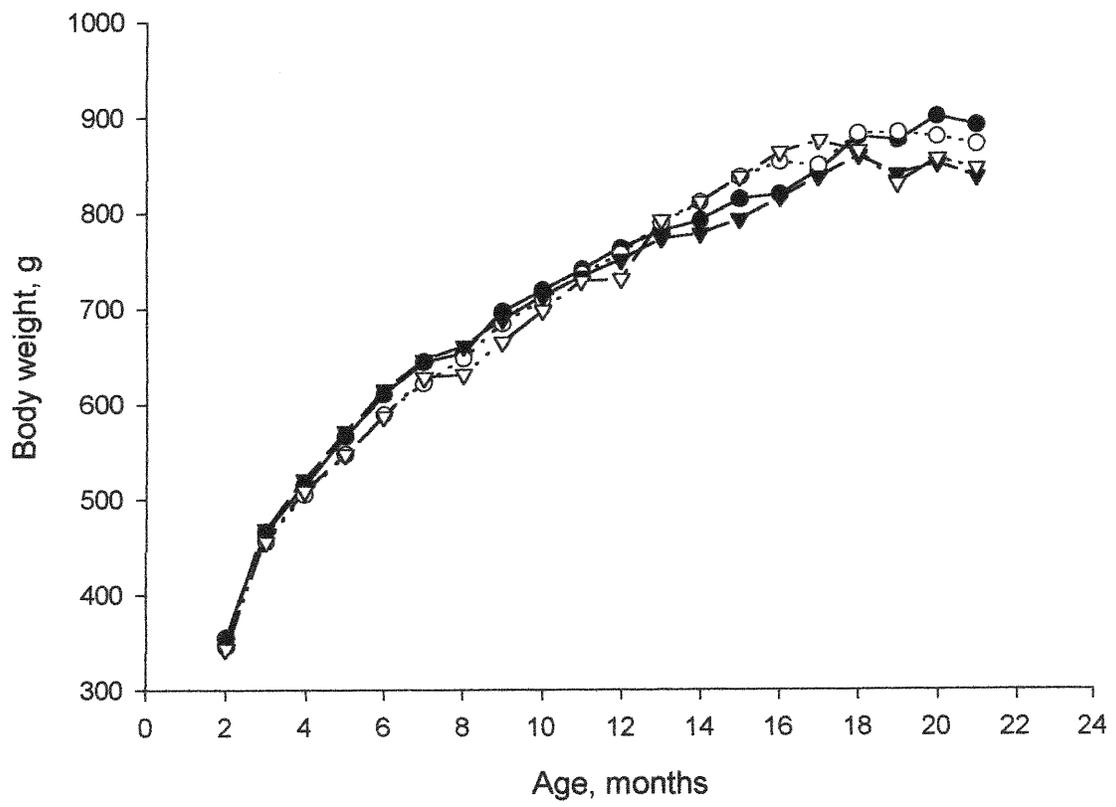


Table 3. Effect of dietary protein and calcium on calcemia and various urinary parameters (calciuria, proteinuria and creatininuria).

Parameters	Proteins(%)	Calcium (%)	3 months**	13 months		18 months		22 months	
				Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
Calcemia (mg/L)	13.2	0.5	-----	121.74 ± 3.63 ^a	-----	129.37 ± 2.81 ^a	-----	125.05 ± 3.16 ^{at}	-----
	22.0	1.0	-----	115.68 ± 3.77 ^a	-----	133.57 ± 3.33 ^b	-----	117.56 ± 2.95	-----
Calciuria (mg/24 hrs)	13.2	0.5	-----	0.350 ± 0.119 ^a	-----	0.834 ± 0.121 ^a	-----	0.764 ± 0.209 ^a	-----
	22.0	1.0	-----	0.658 ± 0.106 ^a	-----	1.014 ± 0.321 ^a	-----	0.636 ± 0.038	-----
Proteinuria (mg/24 hrs)	13.2	0.5	-----	50.23 ± 7.46 ^a	-----	99.25 ± 20.49 ^a	-----	76.90 ± 28.32 ^a	-----
	22.0	1.0	NA	46.81 ± 3.71 ^a	-----	87.97 ± 12.10 ^a	-----	74.11 ± 15.57	-----
Creatininuria (mg/24 hrs)	13.2	0.5	-----	19.17 ± 0.55 ^a	-----	19.23 ± 1.76 ^a	-----	20.66 ± 1.23 ^a	-----
	22.0	1.0	NA	19.25 ± 0.74 ^a	-----	19.38 ± 0.42 ^a	-----	20.37 ± 1.20	-----
		0.5	NA					21.28 ± 1.18 ^a	
		1.0	-----	-----	-----	-----	-----	19.80 ± 0.49	-----

Values are means ± SEM, n= 8-13 rats.

^tp < 0.05 different from rats same age consuming 22.0% protein diet.

*P < 0.05 different from rats same age consuming 1.0% calcium diet.

^{a,b}In a row, groups with different letters are significantly different (p < 0.05).

**animals were fed until 3 months with chow diet.

Table 4. Effect of dietary protein and calcium on femoral anthropometric measures.

Parameters	Proteins (%)	Calcium (%)	3 months**	13 months	18 months	22 months
Length (cm)	13.2	0.5	-----	4.400 ± 0.031 ^{a†}	4.420 ± 0.066 ^a	4.368 ± 0.042 ^a
	22.0	1.0	-----	4.283 ± 0.034 ^b	4.363 ± 0.062 ^b	4.283 ± 0.059
Width (cm)	13.2	0.5	-----	0.675 ± 0.009 ^a	0.704 ± 0.012 ^a	0.677 ± 0.014 ^a
	22.0	1.0	-----	0.449 ± 0.015 ^a	0.690 ± 0.011 ^b	0.671 ± 0.012
Wet Weight (g)	13.2	0.5	-----	1.412 ± 0.030 ^a	1.264 ± 0.055 ^b	1.364 ± 0.039 ^a
	22.0	1.0	-----	0.647 ± 0.032 ^a	1.358 ± 0.025 ^b	1.342 ± 0.044
Dry fat-free weight (g)	13.2	0.5	-----	1.022 ± 0.023 ^a	0.937 ± 0.046 ^a	0.993 ± 0.029 ^a
	22.0	1.0	-----	0.434 ± 0.024 ^a	1.015 ± 0.024 ^b	0.918 ± 0.024
Ash weight (g)	13.2	0.5	-----	0.667 ± 0.016 ^a	0.608 ± 0.029 ^a	0.657 ± 0.019 ^{a*}
	22.0	1.0	-----	0.241 ± 0.015 ^a	0.662 ± 0.018 ^b	0.600 ± 0.014
		0.5	-----	0.626 ± 0.015 ^b	0.662 ± 0.018 ^b	0.629 ± 0.025 ^b
		1.0	-----	-----	-----	0.608 ± 0.019

Values are means ± SEM, n= 6-20 rats.

[†]P < 0.05 different from rats same age consuming 22.0% protein diet.

*P < 0.05 different from rats same age consuming 1.0% calcium diet.

^{a,b}In a row, groups with different letters are significantly different (p < 0.05).

**animals were fed until 3 months with chow diet.

Table 5. Effect of protein and calcium intakes on femoral calcium, phosphorus and magnesium contents.

Parameters	Proteins(%)	Calcium (%)	3 months**	13 months	18 months	22 months
Calcium (ug/mg ash weight)	13.2	0.5	-----	486.24 ± 11.76 ^a	429.51 ± 12.45 ^b	510.49 ± 7.51 ^{a*}
		1.0	-----	-----	-----	485.05 ± 4.62 [†]
Phosphorus (ug/mg ash weight)	22.0	0.5	427.20 ± 9.56 ^a	476.16 ± 10.70 ^{bc}	445.00 ± 23.19 ^{ab}	495.46 ± 5.49 ^c
		1.0	-----	-----	-----	507.86 ± 8.81
Phosphorus (ug/mg ash weight)	13.2	0.5	-----	172.21 ± 5.87 ^a	182.99 ± 4.95 ^a	186.29 ± 3.00 ^a
		1.0	-----	-----	-----	181.41 ± 2.56 [†]
Magnesium (ug/mg ash weight)	22.0	0.5	189.49 ± 4.73 ^a	171.30 ± 3.53 ^b	171.87 ± 1.83 ^b	186.06 ± 2.42 ^{ab}
		1.0	-----	-----	-----	192.46 ± 2.84
Magnesium (ug/mg ash weight)	13.2	0.5	-----	9.844 ± 0.271 ^a	7.059 ± 0.221 ^b	8.179 ± 0.197 ^{ct}
		1.0	-----	-----	-----	8.313 ± 0.206
Magnesium (ug/mg ash weight)	22.0	0.5	9.967 ± 0.219 ^a	9.141 ± 0.332 ^{ab}	7.039 ± 0.110 ^c	8.823 ± 0.207 ^b
		1.0	-----	-----	-----	8.721 ± 0.144

Values are means ± SEM, n= 6-20 rats.

[†]P < 0.05 different from rats same age consuming 22.0% protein diet.

*P < 0.05 different from rats same age consuming 1.0% calcium diet.

a,b,c In a row, groups with different letters are significantly different (p < 0.05).

**animals were fed until 3 months with chow diet.

IV. DISCUSSION

1. Discussion des résultats présentés dans l'article

1.1 Effet de l'âge

Calcémie. Dans la présente étude, la calcémie augmente généralement avec l'âge ($p < 0.05$ entre 3 et 18 mois et entre 3 et 22 mois, pour la diète contenant 22% de protéines et; $p < 0.05$ entre 13 mois et 18 et 22 mois, pour la diète contenant 22% de protéines). Toutefois, la plupart des études ont démontré que le niveau de calcium sérique n'était pas affecté au cours du vieillissement^{121,123-126}. Dans une étude impliquant des rats âgés de 6, 12 et 24 mois soumis à une diète contenant 23.5% de protéines et 1.2% de calcium, Kiebzak et al.¹²³ ont observé des calcémies de 2.28, 2.32 et 2.30 mM (91.2, 92.8 et 92.0 mg/L), respectivement. L'élévation du niveau de calcium sérique observée au cours du vieillissement dans la présente étude pourrait être associée à la présence de tumeurs à l'âge avancé. En effet, il a été proposé que l'hypercalcémie pouvait résulter d'une augmentation de la résorption osseuse systémique causée par des facteurs de résorption osseuse, telle la PTHrp (protéine reliée à l'hormone parathyroïdienne), produits par les cellules tumorales¹²⁷⁻¹²⁹. Dans la présente étude, 11.6% des rats présentaient des tumeurs mammaires et hypophysaires (fibroadénomes) au moment du décès. La PTHrp et la PTH agissent via un récepteur commun: les deux hormones élèvent la concentration de calcium sérique en stimulant la résorption osseuse et en augmentant la réabsorption tubulaire du calcium^{128,130}. Un autre mécanisme possible pourrait être relié à l'hyperparathyroïdisme primaire¹³¹. Toutefois, ces hypothèses peuvent difficilement être retenues sur la base de nos résultats, puisque ces derniers montrent une augmentation de la calciurie et peu de changement du contenu fémoral en calcium au cours du vieillissement.

Paramètres urinaires. Bien que les changements ne soient pas significatifs, la calciurie, la protéinurie et la créatininurie augmentent graduellement avec l'âge. Les données d'autres études ont démontré que l'excrétion quotidienne de calcium dans l'urine de rats sénescents (âgés de 24, 25 et 30 mois) était 2.5 à 3 fois plus élevée que celle de jeunes rats (âgés de 6 mois)¹²⁶ et de rats adultes (âgés de 12 et 13 mois)^{132,133}. Dans le cas de la présente étude, la calciurie était 1.5-2.4 et 1.2-2.2 fois plus élevée chez les rats âgés de 18 et 22 mois, respectivement, lorsque comparée aux rats de 13 mois. Par ailleurs, plusieurs travaux antérieurs ont démontré une élévation de l'excrétion urinaire des protéines¹³⁴⁻¹³⁷ et de la créatinine¹³⁵ avec l'avancement en âge. Il a été suggéré que le développement de la protéinurie au cours du vieillissement pourrait s'expliquer par une diminution de la fonction rénale et par la présence de lésions^{134,135}.

Anthropométrie. Dans la présente étude, les paramètres anthropométriques augmentent de façon significative après l'âge de 3 mois, reflétant la croissance normale. Ces résultats corroborent ceux rapportés par d'autres chercheurs^{121,123,138}. Par ailleurs, aucune augmentation significative de la longueur des fémurs n'a été observée après l'âge de 13 mois et ce, pour les deux diètes. Nos résultats sont en accord avec une étude réalisée par Kalu et al.¹²¹, où la longueur maximale des fémurs et des tibias a été atteinte à l'âge de 12 mois (ces mesures ont été effectuées aux âges de 1.5, 6, 12, 18, 24 et 27 mois), précédant la fermeture des plaques de croissance épiphysaire (responsables de la croissance linéaire) observée à l'âge de 18 mois. Une autre étude rapporte également l'absence de croissance osseuse après l'âge de 14 mois¹³⁹. Par ailleurs, des augmentations de l'épaisseur et du poids humide des fémurs ont été rapportées entre 12 et 24 mois d'âge, suggérant des ajustements architecturaux continus plutôt qu'une simple croissance linéaire¹²³.

Contenu minéral osseux. De manière générale, nos résultats montrent que les contenus osseux en calcium et en phosphore ne sont pas affectés au cours du vieillissement. Les résultats obtenus à partir d'autres travaux réalisés chez des rats âgés de 12 à 30 mois ont démontré peu ou pas de changement de la concentration du calcium osseux^{121,140,141}, ce qui appuie nos résultats. D'autres études ont rapporté une diminution du calcium osseux entre 12 et 30 mois¹³², entre 12 et 24 mois¹²³ et entre 7 et 19 mois¹³⁹, chez des rats soumis à des diètes contenant entre 18 et 23.5% de protéines. Dans certaines de ces études, aucun changement significatif du contenu en phosphore de l'os n'a été observé entre 14 et 19 mois¹³⁹ et entre 12 et 24 mois¹²³, en accord avec nos résultats. De façon inattendue, une réduction significative du contenu en calcium du fémur a également été observée dans la présente étude entre les âges de 13 et 18 mois chez les rats consommant 13.2% de protéines, ce qui pourrait être dû à un effet de cohorte, puisque cette tendance ne se confirme pas chez les rats âgés de 22 mois. Aussi, on observe une augmentation de la protéinurie chez les animaux âgés de 18 mois, avec un retour à la normale chez ceux âgés de 22 mois. L'élévation de l'excrétion urinaire de protéines reflète une diminution de la fonction rénale qui pourrait entraîner une réduction de la réabsorption du calcium et ainsi une diminution du contenu osseux en calcium, telle qu'observée à 18 mois.

Environ deux tiers du magnésium de l'organisme se situe dans l'os, ce minéral étant localisé sur la surface du cristal d'hydroxyapatite¹⁴². Selon plusieurs travaux effectués chez le rat, le contenu osseux en magnésium diminuerait avec l'avancement en âge^{139,143-146}. La réduction avec l'âge de la concentration en magnésium du fémur observée dans notre étude appuie ces travaux. Alfrey et al.¹⁴⁶ ont postulé que la diminution du magnésium osseux résulterait d'une réduction de la taille du réservoir de l'os en magnésium librement échangeable. Cependant, ces auteurs ont rapporté que la taille du réservoir du magnésium osseux non échangeable n'était pas modifiée au cours du vieillissement.

1.2 Effet des protéines et du calcium alimentaires

Calcémie. Nos résultats montrent que la calcémie n'est pas affectée par le niveau de protéines alimentaires, sauf à l'âge de 22 mois, où les rats soumis à la diète contenant 22% de protéines (0.5% calcium) ont présenté des concentrations de calcium plasmatique plus élevées ($p < 0.05$). Dans une étude de Kalu et al.¹²¹, le calcium sérique des rats consommant 12.6% et 21% de protéines a été comparé, et aucune différence significative n'a été observée entre les groupes aux âges suivants : 1.5, 6, 12, 18, 24, 27 et 30 mois. Toutefois, Howe et Beecher²¹ ont observé que des rats âgés de 19 semaines (environ 4.5 mois) consommant 25% protéines présentaient une concentration de calcium sanguin total significativement plus faible que ceux recevant une diète contenant 45% de protéines. Quarante à 45% du calcium est lié aux protéines plasmatiques^{53,54}, et ces dernières ont tendance à augmenter en fonction des apports protéiques¹⁴⁷. Il a donc été suggéré que l'élévation du calcium sanguin pourrait être reliée à l'augmentation des protéines alimentaires²¹.

Dans la présente étude, la calcémie diminue en fonction de l'apport en calcium chez les rats âgés de 22 mois, l'effet étant statistiquement significatif chez ceux consommant 22% de protéines ($p = 0.11$ pour les rats soumis à la diète contenant 13.2% de protéines). Nos résultats appuient ceux de Newell et Beauchene¹⁴⁸, chez qui des rats âgés de 13 et 25 mois recevant une diète contenant 1.2% de calcium présentaient des niveaux sériques de calcium significativement plus faibles que ceux des rats consommant 0.5% de calcium. Étant donné que des quantités élevées de phosphore alimentaire entraîne l'hypocalcémie^{47,80}, ces auteurs ont proposé que le niveau plus élevé de phosphore (1%) contenu dans la diète élevée en calcium pourrait être responsable de la réduction de la concentration de calcium sérique. Dans l'étude de Newell et Beauchene¹⁴⁸, les ratios calcium : phosphore pour les deux diètes étaient semblables (1.25 :1 pour la diète contenant 0.5% de calcium et 1.2 :1 pour la diète contenant 1.2% de calcium). Ceci était également le cas dans notre étude, où le ratio calcium : phosphore était de 1.3 :1, pour *toutes* les diètes. D'autres chercheurs n'ont

observé aucun changement de la calcémie en présence d'une diète élevée en calcium^{81,149,150}, mais dans toutes ces études, le ratio calcium : phosphore de la diète normale en calcium différait de celui de la diète élevée en calcium. Sur la base de nos résultats, la réduction de la calcémie observée en présence d'un apport élevé en calcium pourrait s'expliquer par un contenu plus élevé de phosphore dans cette diète.

Paramètres urinaires. Il est maintenant bien établi que des apports élevés en protéines résultent en une augmentation de la calciurie chez les rats^{7,8,14-16,20,99,101} et les humains^{5,6,11-13,30,90-98}. Cependant, dans la plupart de ces travaux, les protéines de la diète étaient consommées en très grandes quantités, contrairement à notre étude. Malgré que les changements ne soient pas significatifs, l'excrétion urinaire de calcium tend à être plus élevée chez les rats consommant 22% de protéines ($p = 0.13$ pour les rats âgés de 13 mois) lorsque comparés aux rats recevant la diète contenant 13.2% de protéines, mais cet effet des protéines s'estompe graduellement avec l'âge. Utilisant des rats femelles âgées d'environ 3-4 mois, Graves et Wolinsky²⁴ ont toutefois observé que la calciurie était significativement plus élevée dans le groupe consommant 24% de protéines que dans le groupe consommant 16% de protéines. Cependant, dans la présente étude, l'excrétion urinaire de calcium n'a pas été mesurée à l'âge de 3 mois pour les deux niveaux d'apports protéiques. Aussi, il est d'intérêt de souligner la grande variabilité inter-rats en regard des valeurs de la calciurie.

Dans la présente étude, les excrétions urinaires de protéines et de créatinine n'ont pas été affectées par l'apport protéique. Toutefois, dans une étude d'intervention d'une durée de 20 mois débutée à l'âge de 2 mois, des rats âgés entre 18 et 20 mois soumis à une diète contenant 35% de protéines ont, de façon significative, excrété plus de protéines dans leurs urines lorsque comparés aux rats recevant 20% de protéines¹³⁵. Puisqu'il a été suggéré qu'une augmentation de l'apport protéique élevait l'incidence des lésions rénales¹³⁴, les divergences observées entre cette étude et la nôtre pourrait s'expliquer par des apports protéiques différents. L'effet protéinurique d'une diète élevée en protéines pourrait être associé à l'action des acides aminés ou du phosphate

au niveau des reins¹³⁴. Dans la présente étude, les protéines alimentaires n'ont pas affecté l'excrétion urinaire de créatinine chez les rats âgés de 13, 18 et 22 mois, confirmant des résultats similaires rapportés par Whiting et Draper⁸. Par ailleurs, aucun effet significatif n'a été observé en fonction du calcium alimentaire en regard des excréctions urinaires de calcium, de créatinine et des protéines.

Anthropométrie. De manière générale, on observe peu d'effets de la diète sur les mesures anthropométriques, au cours du vieillissement. En regard des protéines, une augmentation de la longueur des fémurs ($p < 0.05$), du poids sec ($p = 0.06$) et du poids des cendres ($p = 0.06$) est observé chez les rats âgés de 13 mois consommant 13.2% de protéines, en comparaison de ceux soumis à la diète contenant 22% de protéines. Cet effet s'estompe graduellement avec l'avancement en âge. Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude de Howe et Beecher²¹, où la consommation d'une diète contenant 45% de protéines chez des rats âgés de 19 semaines (environ 4.5 mois) a été associée à une diminution de la longueur des fémurs lorsque comparé aux rats soumis à la diète contenant 25% de protéines, sans toutefois affecter le poids sec des os. Nos résultats pour les rats âgés de 18 et 22 mois (et non pour ceux de 13 mois) s'accordent avec ceux de Kalu et al.¹²¹, où aucun effet significatif de l'apport protéique (12.6% vs 21%) sur la longueur et le poids sec dégraissé des fémurs n'a été observé (12, 18 et 24 mois). L'absence d'impact de l'apport protéique a été confirmé dans d'autres études réalisées chez le rat et la souris en regard des paramètres suivants : longueur, poids humide, poids sec, poids sec dégraissé et poids des cendres des fémurs^{8,16,20}.

En ce qui concerne le calcium alimentaire, le poids des cendres des rats âgés de 22 mois recevant une diète contenant 0.5% de calcium (13.2% de protéines) était significativement plus élevé et le poids sec tendait à être plus élevé ($p = 0.065$), lorsque comparés aux rats consommant 1% de calcium. Dans une étude de Peterson et al.¹⁵¹ impliquant des rats âgés de 37 semaines (environ 9 mois), un apport élevé en calcium (1% vs 0.5%) n'a eu aucun effet sur le poids sec dégraissé et le poids des cendres.

Utilisant des rats d'âges variables (de 4 à 24 mois), Shapira et al.⁸¹ n'ont observé aucun impact significatif du calcium (0.6% vs 1.2%) sur le poids des vertèbres (le poids sec et le poids des cendres n'ayant cependant pas été mesurés). Toutefois, compte tenu que les vertèbres sont surtout constituées d'os spongieux par rapport au fémur (os cortical prédominant), ces os pourraient réagir différemment à l'augmentation de l'apport calcique. Dans la présente étude, les poids élevés (sec et des cendres) observés en présence de la diète contenant 0.5% de calcium pourraient être dus à un effet de cohorte, la longueur et l'épaisseur des fémurs de ces animaux étant plus élevées (n. s.).

Contenu minéral osseux. Dans la présente étude, aucun effet délétère d'un apport protéique de 22% n'a été observé en regard du contenu minéral osseux en fin de vie. En effet, nos résultats montrent qu'à 22 mois d'âge, les contenus fémoraux en calcium et en phosphore des rats soumis à la diète contenant 22% protéines (1% calcium) étaient significativement plus élevés en comparaison de ceux des rats consommant 13.2% protéines. La même tendance a été observée pour le contenu osseux en magnésium ($p=0.12$). Aussi, un apport protéique modérément élevé (22% protéines, en présence de 0.5% de calcium) a été associé à une concentration osseuse en magnésium plus élevée ($p<0.05$). Sur la base de nos résultats, un niveau modérément élevé de protéines alimentaires (22%), particulièrement lorsque l'apport en calcium est modérément élevé (1%), semblerait avoir des effets bénéfiques au niveau de l'os chez les rats de 22 mois. Ainsi, malgré un effet calciurétique observé à l'âge de 13 mois, la consommation prolongée d'une diète modérément élevée en protéines ne semble pas comporter d'effet délétère quant au contenu minéral osseux à un âge avancé. Ces résultats sont en partie en accord avec ceux de Graves et Wolinsky²⁴, où des rats âgés d'environ 4 mois recevant une diète contenant 24% de protéines présentaient une concentration osseuse en calcium significativement plus élevée que celle de rats soumis à une diète contenant 16% de protéines, sans toutefois affecter le contenu en phosphore de l'os. Cependant, la plupart des études ne montrent pas d'effet significatif des protéines alimentaires sur le calcium^{8,121,152,153}, le phosphore^{8,152,153} et le magnésium^{8,152} osseux chez le rat, quel que soit l'âge.

Par ailleurs, une diète légèrement élevée en calcium (1%) a été associée à des contenus osseux en calcium ($p= 0.23$) et en phosphore ($p= 0.12$) plus élevés en présence d'une diète modérément élevée en protéines (22%). De manière générale, des apports élevés en calcium (0.8, 1.0 et 1.2% vs 0.4, 0.5 et 0.6%, respectivement) ont été associés à des contenus en calcium^{81,151,154} et en phosphore¹⁵⁴ significativement plus élevés (fémur, tibia et vertèbres). Dans tous ces travaux, le niveau de protéines alimentaires se situait entre 20 et 21%. De manière inattendue, les concentrations osseuses en calcium ($p<0.05$) et en phosphore ($p=0.23$) des animaux qui recevaient une diète contenant 13.2% protéines et 0.5% calcium étaient supérieurs à ceux recevant une diète de 1% calcium. Une façon d'expliquer ce résultat serait de considérer les diètes sous la forme d'un ratio calcium :protéines.

Ces dernières années, il a été proposé d'établir les recommandations en fonction d'un ratio. En effet, selon le Food and Nutrition Board (1997)¹⁵⁵, un ratio calcium : protéines $\geq 20 : 1$ (mg : g) fournirait probablement une protection adéquate pour le squelette. Le fait que les contenus osseux en calcium et en phosphore les plus élevés ont été observés en présence des diètes contenant 13.2% protéines, 0.5% calcium et 22% protéines, 1% calcium, correspondant à des ratios calcium :protéines (mg :g) de 38 :1 et 45.5 :1, respectivement, tendent à appuyer cette proposition. Cependant, les concentrations fémorales en calcium et en phosphore tendaient à être inférieures lorsqu'un ratio plus faible (23 : 1, pour la diète contenant 22% de protéines et 0.5% de calcium) ou surtout plus élevé (76 : 1, pour la diète contenant 13.2% de protéines et 1% de calcium) était soumis aux animaux. En somme, plutôt que de considérer ces deux nutriments de manière individuelle, les résultats de la présente étude nous indiquent qu'il serait peut-être plus utile de les considérer ensemble, sous la forme d'un ratio.

CONCLUSION

En conclusion, la calciurie telle qu'observée chez les animaux âgés de 13 mois et, de façon moins marquée, chez ceux âgés de 18 mois soumis à la diète modérément élevée en protéines, n'a pas comporté d'effet délétère au niveau du contenu minéral osseux. Par ailleurs, il semble que les protéines de la diète aient un impact sur l'intégrité osseuse, telle qu'évaluée par les mesures anthropométriques et par le contenu minéral osseux, à un âge avancé. Toutefois, cet effet semble intimement lié au niveau de calcium alimentaire. En effet, nos résultats confirment la relation qui existe entre le calcium et les protéines de la diète et l'importance du ratio calcium : protéines, lorsque ces deux nutriments sont consommés à des doses physiologiques. Les contenus minéral osseux les plus élevés ont été associés aux ratios calcium : protéines (mg : g) de 38 : 1 et de 45.5 : 1. Ces ratios sont plus élevés que celui de $\geq 20 : 1$ (Food and Board Nutrition, 1997)¹⁵⁵ proposé chez l'humain. Précisons toutefois que ce dernier a été établi sur une base théorique.

Des études ultérieures utilisant des marqueurs plus sensibles du remodelage osseux ou faisant appel à des mesures histomorphométriques permettront de préciser le ratio calcium : protéines le plus susceptible d'assurer la santé osseuse au grand âge. Enfin, d'autres éléments nutritifs tels le magnésium et le potassium ont récemment été impliqués dans le métabolisme osseux, mais les besoins de l'os en regard de ces nutriments au cours du vieillissement restent toutefois à déterminer.

RÉFÉRENCES

1. Baron, E.B. (1996) Anatomy and ultrastructure of bone. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp3-10.
2. Heaney, R.P. (1998) Excess dietary protein may not adversely affect bone. *J Nutr.* 128 : 1054-1057.
3. Bonjour, J.-P., Schürch, M.-A., Chevalley, T., Ammann, P. et Rizzoli, R. (1997) Protein intake, IGF-1 and osteoporosis. *Osteoporos Int.* 7 (Suppl. 3) : S36-S42.
4. Wachman, A. et Bernstein, D.S. (1968) Diet and osteoporosis. *Lancet.* 1 : 958-959.
5. Johnson, N.E., Alcantara, E.N. et Linkswiler, H. (1970) Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium retention of young adult males. *J Nutr.* 100 : 1425-1430.
6. Schuette, S.A., Zemel, M.B. et Linkswiler, H.M. (1980) Studies on the mechanism of protein-induced hypercalciuria in older men and women. *J Nutr.* 110 : 305-315.
7. Bell, R.R., Engelmann, D.T., Sie, T.-L. et Draper, H.H. (1975) Effect of a high protein intake on calcium metabolism in the rat. *J Nutr.* 105 : 475-483.
8. Whiting, S.J. et Draper, H.H. (1981) Effect of chronic high protein feeding on bone composition in the adult rat. *J Nutr.* 111 : 178-183.
9. Shapses, S.A., Robins, S.P., Schwartz, E.I. et Chowdhury, H. (1995) Short-term changes in calcium but not protein intake alter the rate of bone resorption in healthy subjects as assessed by urinary pyridinium cross-link excretion. *J Nutr.* 125 : 2814-2821.
10. Kerstetter, J.E., Mitnick, M.E., Gundberg, C.M., Caseria, D.M., Ellison, A.F., Carpenter, T.O. et Insogna, K.L. (1999) Changes in bone turnover in young women consuming different levels of dietary protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 84 : 1052-1055.
11. Margen, S., Chu, J.-Y., Kaufmann, N.A. et Calloway, D.H. (1974) Studies in calcium metabolism. I. The calciuretic effect of dietary protein. *Am J Clin Nutr.* 27 : 584-589.

12. Allen, L.H., Oddoye, E.A. et Margen, S. (1979) Protein-induced hypercalciuria : a longer term study. *Am J Clin Nutr.* 32 : 741-749.
13. Hegsted, M., Schuette, S.A., Zemel, M.B. et Linkswiler, H.M. (1981) Urinary calcium and calcium balance in young men as affected by level of protein and phosphorus intake. *J Nutr.* 111 : 553-562.
14. Allen, L.H. et Hall, T.E. (1978) Calcium metabolism, intestinal calcium-binding protein, and bone growth of rats fed high protein diets. *J Nutr.* 108 : 967-972.
15. Howe, J.C. et Beecher, G.R. (1981) Effect of dietary protein and phosphorus levels on calcium and phosphorus metabolism of the young, fast growing rat. *J Nutr.* 111 : 708-720.
16. Calvo, M.S., Bell, R.R. et Forbes, R.M. (1982) Effect of protein-induced calciuria on calcium metabolism and bone status in adult rats. *J Nutr.* 112 : 1401-1413.
17. Kerstetter, J.E. et Allen, L.H. (1994) Protein intake and calcium homeostasis. *Adv Nutr Res.* 9 : 167-181.
18. Barzel, U.S. et Massey, L.K. (1998) Excess dietary protein can adversely affect bone. *J Nutr.* 128 : 1051-1053.
19. Lemann, J., Litzow, J.R. et Lennon, E.J. (1966) The effects of chronic acid loads in normal man : further evidence for participation of bone mineral in the defense against chronic metabolic acidosis. *J Clin Invest.* 45 : 1608-1614.
20. Yuen, D.E. et Draper, H.H. (1983) Long-term effects of excess protein and phosphorus on bone homeostasis in adult mice. *J Nutr.* 113 : 1374-1380.
21. Howe, J.C. et Beecher, G.R. (1983) Dietary protein and phosphorus metabolism in bone, blood and muscle of the rat. *J Nutr.* 113 : 2185-2195.
22. Funaba, M., Kawashima, T., Yano, H. et Kawashima, R. (1990) Effects of a high protein diet on bone formation and calcium metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 36 : 559-567.
23. Weiss, R.E., Gorn, A., Dux, S. et Nimni, M.E. (1981) Influence of high protein diets on cartilage and bone formation in rats. *J Nutr.* 111 : 804-816.
24. Graves, K.L. et Wolinsky, I. (1980) Calcium and phosphorus metabolism in pregnant rats ingesting a high protein diet. *J Nutr.* 110 : 2420-2432.

25. Teegarden, D., Lyle, R.M., McCabe, G.P., McCabe, L.D., Proulx, W.R, Michon, K., Knight, A.P., Johnston, C.C. et Weaver, C.M. (1998) Dietary calcium, protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *Am J Clin Nutr.* 68 : 749-754.
26. Metz, J.A., Anderson, J.J.B. et Gallagher Jr, P.N. (1993) Intakes of calcium, phosphorus, and protein, and physical-activity level are related to radial bone mass in young adult women. *Am J Clin Nutr.* 58 : 537-542.
27. Recker, R.R., Davies, K.M., Hinders, S.M., Heaney, R.P., Stegman, M.R. et Kimmell, D.B. (1992) Bone gain in young adult women. *JAMA.* 268 : 2403-2408.
28. Freudenheim, J.L., Johnson, N.E. et Smith, E.L. (1986) Relationships between usual nutrient intake and bone-mineral content of women 35-65 years of age : longitudinal and cross-sectional analysis. *Am J Clin Nutr.* 44 : 863-876.
29. Cooper, C., Atkinson, E.J., Hensrud, D.D., Wahner, H.W., O'Fallon, W.M., Riggs, B.L. et Melton, L.J. (1996) Dietary protein intake and bone mass in women. *Calcif Tissue Int.* 58 : 320-325.
30. Kim, Y. et Linkswiler, H.M. (1979) Effect of level of protein intake on calcium metabolism and on parathyroid and renal function in the adult human male. *J Nutr.* 109 : 1399-1404.
31. Schuette, S.A., Hegsted, M., Zemel, M.B. et Linkswiler, H.M. (1981) Renal acid, urinary cyclic AMP, and hydroxyproline excretion as affected by level of protein, sulfur amino acid, and phosphorus intake. *J Nutr.* 111 : 2106-2116.
32. Abelow, B.J., Holford, T.R. et Insogna, K.L. (1992) Cross-cultural association between dietary animal protein and hip fracture : a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 50 : 14-18.
33. Hegsted, D.M. (1986) Calcium and osteoporosis. *J Nutr.* 116 : 2316-2319.
34. Feskanich, D., Willett, W.C., Stampfer, M.J. et Colditz, G.A.. (1996) Protein consumption and bone fractures in women. *Am J Epidemiol.* 143 : 472-479.
35. Ellis, F.R., Holish, S. et Sanders, T.A.B. (1974) Osteoporosis in British vegetarians and omnivores. *Am J Clin Nutr.* 27: 769-770.
36. Heaney, R.P. (1996) Nutrition and osteoporosis. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp29-34.

37. Heaney, R.P. (1993) Nutritional factors in osteoporosis. *Annu Rev Nutr.* 13 : 287-316.
38. Einhorn, T.A., Levine, B. et Michel, P. (1990) Nutrition and bone. *Orthop Clin North Am.* 1 : 43-50.
39. Avioli, L.V. et Heaney, R.P. (1991) Calcium intake and bone health. *Calcif Tissue Int.* 48 : 221-223.
40. Reid, D.M. et New, S.A. (1997) Nutritional influences on bone mass. *Proc Nutr Soc.* 56 : 977-987.
41. Reeves, P.G., Nielsen, F.H. et Fahey, G.C. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents : final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123 : 1939-1951.
42. Calvo, M.S., Eyre, D.R. et Gundberg, C.M. (1996) Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev.* 17 : 333-368.
43. Christenson, R.H. (1997) Biochemical markers of bone metabolism : an overview. *Clin Biochem.* 30 : 573-593.
44. Vernejoul, M.-C. et Marie, P. (1996) Remodelage osseux et cellules osseuses. D. Kuntz (Ed.) *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp3-16.
45. Huffer, W.E. (1988) Morphology and biochemistry of bone remodeling : possible control by vitamin D, parathyroid hormone, and other substances. *Lab Invest.* 59 : 418-442.
46. Puzas, J.E. (1996) Osteoblast cell biology - lineage and functions. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp11-16.
47. Robins, S.P. et New, S.A. (1997) Symposium on nutritional aspects of bone (markers of bone turnover in relation to bone health). *Proc Nutr Soc.* 56 : 903-914.
48. Mundy, G.R. (1996) Bone-resorbing cells. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp16-24.

49. Termine, J.D. et Robey, P.G. (1996) Bone matrix proteins and the mineralization process. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp24-28.
50. Malaval, L., Chenu, C. et Delmas, P.D. (1996) Protéines de l'os. D. Kuntz (Ed.) Maladies métaboliques osseuses de l'adulte, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp17-35.
51. Canalis, E. (1996) Regulation of bone remodeling. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp29-34.
52. Marie, P. et Vernejoul, M.-C. (1996) Facteurs systémiques et locaux du remodelage osseux. D. Kuntz (Ed.) Maladies métaboliques osseuses de l'adulte, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp49-68.
53. Broadus, A.E. (1996) Mineral balance and homeostasis. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp57-63.
54. Drüeke, T.B. et Lacour, B. (1996) Homéostasie du calcium et du phosphore. D. Kuntz (Ed.) Maladies métaboliques osseuses de l'adulte, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp115-138.
55. Garnero, P. et Delmas, P.D. (1996) Marqueurs biochimiques du remodelage osseux. D. Kuntz (Ed.) Maladies métaboliques osseuses de l'adulte, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, pp99-111.
56. Eyre, D.R. (1996) Biochemical markers of bone turnover. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp114-119.
57. Blumsohn, A. et Eastell, R. (1997) The performance and utility of biochemical markers of bone turnover : do we know enough to use them in clinical practice? *Ann Clin Biochem.* 34 : 449-459.
58. Whitney, E.N. et Rolfes, S.R. (1996) Water and the major minerals. (7^e édition). *Understanding nutrition*, West Publishing Company, St-Paul, Minneapolis, MN, pp429-471.
59. Chan, G.M., Hess, M., Hollis, J. et Book, L.S. (1984) Bone mineral status in childhood accidental fractures. *Am J Dis Child.* 138 : 569-570.

60. Riggs, B.L. et Melton, L.J. (1986) Involutional osteoporosis. *N Engl J Med.* 314 : 1676-1686.
61. Marcus, R. (1987) Calcium intake and skeletal integrity : is there a critical relationship? *J Nutr.* 117 : 631-635.
62. Bullamore, J.R., Gallagher, J.C., Wilkinson, R., Nordin, B.E.C. et Marshall, D.H. (1970) Effect of age on calcium absorption. *Lancet.* 2 : 535-537.
63. Heaney, R.P., Recker, R.R., Stegman, M.R. et Moy, A.J. (1989) Calcium absorption in women : relationship to calcium intake, estrogen status, and age. *J Bone Miner Res.* 4 : 469-475.
64. Nordin, B.E.C., Need, A.G., Morris, H.A., Horowitz, M. et Robertson, W.G. (1991) Evidence for a renal calcium leak in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 72 : 401-407.
65. McKane, W.R., Khosla, S., Burritt, M.F., Kao, P.C., Wilson, D.M., Ory, S.J. et Riggs, B.L. (1995) Mechanism of renal calcium conservation with estrogen replacement therapy in women in early postmenopause : A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 80 : 3458-3464.
66. Ledger, G.A., Burritt, M.F., Kao, P.C., O'Fallon, W.M., Riggs, B.L. et Khosla, S. (1995) Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age-related increases in bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 80 : 3304-3310.
67. Eastell, R., Simmons, P.S., Colwell, A., et al. (1992) Nyctohemeral changes in bone turnover assessed by serum bone Gla-protein concentration and urinary deoxypyridinoline excretion : effects of growth and ageing. *Clin Sci.* 83 : 375-382.
68. Riggs, B.L., O'Fallon, W.M., Muhs, J., O'Connor, M.K., Kumar, R. et Melton III, L.J. (1998) Long-term effects of calcium supplementation on serum parathyroid hormone level, bone turnover, and bone loss in elderly women. *J Bone Miner Res.* 13 : 168-174.
69. Reid, I.R., Ames, R.W., Evans, M.C., Gamble, G.D. et Sharpe, S.J. (1995) Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women : A randomized controlled trial. *Am J Med.* 98 : 331-335.
70. Recker, R., Hinders, S., Davies, K.M., Heaney, R.P., Stegman, M.R., Lappe, J.M. et Kimmell, D.B. (1996) Correcting calcium nutritional deficiency prevents spine fractures in elderly women. *J Bone Miner Res.* 11 : 1961-1966.

71. Shearer, M.J. (1997) The roles of vitamins D and K in bone health and osteoporosis prevention. *Proc Nutr Soc.* 56 : 915-937.
72. Holick, M.F. (1996) Vitamin D : photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. M. Favus, S. Christakos et al. (Eds.) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, pp74-81.
73. Whitney, E.N. et Rolfes, S.R. (1996) *The fat-soluble vitamins : A, D, E, and K. (7^e édition)*. Understanding nutrition, West Publishing Company, St-Paul, Minneapolis, MN, pp393-420.
74. Ooms, M.E., Roos, J.C., Bezemer, P.D., Van der Vijgh, W.J.F., Bouter, L.M. et Lips, P. (1995) Prevention of bone loss by vitamin D supplementation in elderly women : a randomized double-blind trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 80 : 1052-1058.
75. Heaney, R.P. et Recker, R.R. (1982) Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. *J Lab Clin Med.* 99 : 46-55.
76. Zemel, M.B. et Linkswiler, H.M. (1981) Calcium metabolism in the young adult male as affected by level and form of phosphorus intake and level of calcium intake. *J Nutr.* 111: 315-324.
77. Krishnarao, G.V.G. et Draper, H.H. (1972) Influence of dietary phosphate on bone resorption in senescent mice. *J Nutr.* 102: 1143-1146.
78. Shah, B.G., Krishnarao, G.V.G. and Draper, H.H. (1967) The relationship of Ca and P nutrition during adult life and osteoporosis in aged mice. *J Nutr.* 92 : 30-42.
79. Draper, H.H., Sie, T-L. et Bergan, J.G. (1972) Osteoporosis in aging rats induced by high phosphorus diets. *J Nutr.* 102: 1133-1142.
80. Calvo, M.S. (1993) Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *J Nutr.* 123 : 1627-1633.
81. Shapira, D., Linn, S., Sarid, M., Mokadi, S., Kabala, A. et Silbermann, M. (1995) Calcium and vitamin D enriched diets increase and preserve vertebral mineral content in aging laboratory rats. *Bone.* 16 : 575-582.
82. Weaver, C.M., Peacock, M. et Johnston, C.C. (1999) Adolescent nutrition in the prevention of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 84 : 1839-1843.

83. Schwartz, R. et Reddi, A.H. (1979) Influence of magnesium depletion on matrix-induced endochondral bone formation. *Calcif Tissue Int.* 29 : 15-20.
84. Whitney, E.N. et Rolfes, S.R. (1996) *The water-soluble vitamins : B vitamins and vitamin C.* (7^e édition). Understanding nutrition, West Publishing Company, St-Paul, Minneapolis, MN, pp344-392.
85. Ferland, G. (1998) The vitamin K-dependent proteins : an update. *Nutr Rev.* 56 : 223-230
86. Knapen, M.H.J., Hamulyak, K. et Vermeer, C. (1989) The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann Intern Med.* 111 : 1001-1005.
87. Santé et Bien-être social Canada. (1990) *Recommandations sur la nutrition. Rapport du Comité scientifique de révision.* Ottawa. Ministre des Approvisionnementnements et Services Canada.
88. Heaney, R.P. (1996) Age considerations in nutrient needs for bone health : older adults. *J Am Coll Nutr.* 15 : 575-578.
89. Sherman, H.C. (1920) Calcium requirement of maintenance in man. *J Biol Chem.* 44 :21-27.
90. Walker, R.M. et Linkswiler, H.M. (1972) Calcium retention in the adult human male as affected by protein intake. *J Nutr.* 102 : 1297-1302.
91. Schwartz, R., Woodcock, N.A., Blakely, J.D. et MacKellar, I. (1973) Metabolic responses of adolescent boys to two levels of dietary magnesium and protein. II. Effect of magnesium and protein level on calcium balance. *Am J Clin Nutr.* 26 : 519-523.
92. Anand, C.R. et Linkswiler, H.M. (1974) Effect of protein intake on calcium balance of young men given 500 mg calcium daily. *J Nutr.* 104 : 695-700.
93. Linkswiler, H.M., Joyce, C.L. et Anand, C.R. (1974) Calcium retention of young adult males as affected by level of protein and of calcium intake. *Trans NY Acad Sci.* 36 (series II) : 333-340.
94. Chu, J.-Y., Margen, S. et Costa, F.M. (1975) Studies in calcium metabolism. II. Effects of low calcium and variable protein intake on human calcium metabolism. *Am J Clin Nutr.* 28 : 1028-1035.

95. Allen, L.H., Bartlett, R.S. et Block, G.D. (1979) Reduction of renal calcium reabsorption in man by consumption of dietary protein. *J Nutr.* 109 : 1345-1350.
96. Licata, A.A., Bou, E., Bartter, F.C. et West, F. (1979) Acute effects of dietary protein on calcium metabolism in patients with osteoporosis. *J Gerontol.* 36 :14-19.
97. Hegsted, M. et Linkswiler, H.M. (1981) Long-term effects of level of protein intake on calcium metabolism in young adult women. *J Nutr.* 111 : 244-251.
98. Lutz, J. (1984) Calcium balance and acid-base status of women as affected by increased protein intake and by sodium bicarbonate ingestion. *Am J Clin Nutr.* 39 : 281-288.
99. Engstrom, G.W. et DeLuca, H.F. (1963) Effect of egg white diets on calcium metabolism in the rat. *J Nutr.* 81 : 218-222.
100. Whiting, S.J. et Draper, H.H. (1980) The role of sulfate in the calciuria of high protein diets in adult rats. *J Nutr.* 110 : 212-222.
101. Petito, S.L. et Evans, J.I. (1984) Calcium status of the growing rat as affected by diet acidity from ammonium chloride, phosphate and protein. *J Nutr.* 114 : 1049-1059.
102. Kerstetter, J.E. et Allen, L.H. (1990) Dietary protein increases urinary calcium. *J Nutr.* 120 : 134-136.
103. Linkswiler, H.M., Zemel, M.B., Hegsted, M. et Schuette, S. (1981) Protein-induced hypercalciuria. *Fed Proc.* 40 : 2429-2433.
104. Spencer, H., Kramer, L., DeBartolo, M., Norris, C. et Osis, D. (1983) Further studies of the effect of a high protein diet as meat on calcium metabolism. *Am J Clin Nutr.* 37 : 924-929.
105. Cummings, J.H., Hill, M.J., Jivraj, T., Houston, H., Branch, W.J. et Jenkins, D.J.A. (1979) The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. I. Change in bowel habit, bile acid excretion and calcium absorption. *Am J Clin Nutr.* 32 : 2086-2093.
106. Zemel, M.B. (1988) Calcium utilization : effect of varying level and source of dietary protein. *Am J Clin Nutr.* 48 : 880-883.

107. Draper, H.H., Piché, L.A. et Gibson, R.S. (1991) Effects of a high protein intake from common foods on calcium metabolism in a cohort of postmenopausal women. *Nutr Res.* 11 : 273-281.
108. Heaney, R.P. et Recker, R.R. (1994) Determinants of endogenous fecal calcium in healthy women. *J Bone Miner Res.* 9 : 1621-1627.
109. Orwoll, E.S. (1992) The effects of dietary protein insufficiency and excess on skeletal health. *Bone.* 13 : 343-350.
110. Whiting, S.J. et McNally, M.E. (1989) Calciuric effects of diets high in soy, beef or lactalbumin protein in the rat. *Nutr Rep Int.* 40 : 199-205.
111. Zemel, M.B., Schuette, S.A., Hegsted, M. et Linkswiler, H.M. (1981) Role of the sulfur-containing amino acids in protein-induced hypercalciuria in men. *J Nutr.* 111 : 545-552.
112. Barzel, U.S. (1995) The skeleton as an ion exchange system : implications for the role of acid-base imbalance in the genesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 10 : 1431-1436.
113. Remer, T. et Manz, F. (1994) Estimation of the renal net acid excretion by adults consuming diets containing variable amounts of protein. *Am J Clin Nutr.* 59 : 1356-1361.
114. Remer, T. et Manz, F. (1995) Potential renal acid load of foods and its influence on urine pH. *J Am Diet Assoc.* 95 : 791-797.
115. Appel, L.J., Moore, T.J., Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Svetkey, L.P., Sacks, F.M., Bray, G.A., Vogt, T.M., Cutler, J.A., Windhauser, M.M., Lin, P-H. et Karanja, N. (1997) A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med.* 336 : 1117-1124.
116. Trilok, G. et Draper, H.H. (1989) Sources of protein-induced endogenous acid production and excretion by human adults. *Calcif Tissue Int.* 44 : 335-338.
117. Allen, L.H., Block, G.D., Wood, R.J. et Bryce, G.F. (1981) The role of insulin and parathyroid hormone in the protein-induced calciuria of man. *Nutr Res.* 1 : 3-11.
118. Arnett, T.R. et Spowage, M. (1996) Modulation of the resorptive activity of rat osteoclasts by small changes in extracellular pH near the physiological range. *Bone.* 18 : 277-279.

119. Green, J. et Kleeman, C.R. (1991) Role of bone in regulation of systemic acid-base balance. *Kidney Int.* 39 : 9-26.
120. Van Beresteijn, E.C.H., Brussaard, J.H. et van Schaik, M. (1990) Relationship between the calcium-to-protein ratio in milk and the urinary calcium excretion in healthy adults—a controlled crossover study. *Am J Clin Nutr.* 52 : 142-146.
121. Kalu, D.N., Hardin, R.H., Cockerham, R. and Yu, B.P. (1984) Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 115 : 1239-1247.
122. Whiting, S.J. et Draper, H.H. (1981) Effect of a chronic acid load as sulfate or sulfur amino acids on bone metabolism in adult rats. *J Nutr.* 111 : 1721-1726.
123. Kiebzak, G.M., Smith, R., Gundberg, C.C., Howe, J.C. et Sacktor, B. (1988) Bone status of senescent male rats : chemical, morphometric, and mechanical analysis. *J Bone Miner Res.* 3 : 37-45.
124. Kiebzak, G.M. and Sacktor, B. (1986) Effect of age on renal conservation of phosphate in the rat. *Am J Physiol.* 251 : F399-F407.
125. Kalu, D.N., Cockerham, R., Yu, B.P. and Roos, B.A. (1983) Lifelong dietary modulation of calcitonin levels in rats. *Endocrinology.* 113 : 2010-2016.
126. Prasad, R., Kinsella, J. and Sacktor, B. (1986) Renal adaptation in metabolic acidosis : effect of age (abstract 2062). *Fed Proc.* 45 : 508.
127. Ng, K.W. and Martin, T.J. (1990) Humoral hypercalcemia of malignancy. *Clin Biochem.* 23 : 11-16.
128. Rankin, W., Grill, V. and Martin, T.J. (1997) Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia. *Cancer.* 80 : 1564-1571.
129. Takahashi, K., Shirahata, A., Fukushima, S., Kokubo, S., Teramura, K. and Usuda, S. (1998) Effects of YM175, a new-generation bisphosphonate, on hypercalcemia induced by tumor-derived bone resorbing factors in rats. *Jpn J Pharmacol.* 76 : 155-163.
130. Rizzoli, R., Caverzasio, J., Chapuy, M.C., Martin, T.J. and Bonjour, J.P. (1989) Role of bone and kidney in parathyroid hormone-related peptide-induced hypercalcemia in rats. *J Bone Miner Res.* 4 : 759-765.
131. Mundy, G.R. and Martin, T.J. (1982) The hypercalcemia of malignancy : pathogenesis and management. *Metabolism.* 31 : 1247-1277.

132. Gaumet, N., Seibel, M.J., Coxam, V., Davicco, M.J., Lebecque, P. and Barlet, J.P. (1997) Influence of ovariectomy and estradiol treatment on calcium homeostasis during aging in rats. *Arch Physiol Biochem.* 105 : 435-444.
133. Armbrecht, H.J., Forte, L.R. and Halloran, B.P. (1984) Effect of age and dietary calcium on renal 25(OH)D metabolism, serum 1,25(OH)₂D, and PTH. *Am J Physiol.* 246: E266-E270.
134. Everitt, A.V., Porter, B.D. and Wyndham, J.R. (1982) Effects of caloric intake and dietary composition on the development of proteinuria, age-associated renal disease and longevity in the male rat. *Gerontology.* 28 : 168-175.
135. Bertani, T., Zoja, C., Abbate, M., Rossini, M. and Remuzzi, G. (1989) Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content. *Lab Invest.* 60 : 196-204.
136. Neuhaus, O.W. and Flory, W. (1978) Age-dependent changes in the excretion of urinary proteins by the rats. *Nephron.* 22 : 570-576.
137. Beauchene, R.E., Roeder, L.M. and Barrows Jr., C.H. (1970) The interrelationship of age, tissue protein synthesis, and proteinuria. *J Gerontol.* 25 : 359-363.
138. Blanuša, M., Bogunovic, M. and Matkovic, V. (1978) Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. I. Influence of sex and age. *Pflügers Arch.* 375 : 233-238.
139. McDonald, R., Hegenauer, J. and Saltman, P. (1986) Age-related differences in the bone mineralization pattern of rats following exercise. *J Gerontol.* 41 : 445-452.
140. Beyer, R.E., Huang, J.C. and Wilshire, G.B. (1985) The effect of endurance exercise on bone dimensions, collagen, and calcium in the aged male rat. *Exp Gerontol.* 20 : 315-323.
141. Weiss, A.K., McBroom, M.J. and Cornelison, R.L. (1969) Bone electrolytes in the aging rat. *J Gerontol.* 24 : 438-443.
142. Martini, L.A. and Mayer, J. (1999) Magnesium supplementation and bone turnover. *Nutr Rev.* 57 : 227-229.
143. Wallach, S. (1990) Effects of magnesium on skeletal metabolism. *Magnes Trace Elem.* 9 : 1-14.

144. Nishimoto, S.K. and Padilla, S.M. (1989) Age-related changes in organic and inorganic bone matrix constituents : the effect of environment and diet. Snyder (Ed.) Dietary restriction and aging. Liss., New York, NY, pp. 87-94.
145. Smith, B.S.W. and Field, A.C. (1963) Effect of age on magnesium deficiency in rats. *Br J Nutr.* 17 : 591-600.
146. Alfrey, A.C., Miller, N.L. and Trow, R. (1974) Effect of age and magnesium depletion on bone magnesium pools in rat. *J Clin Invest.* 54 : 1074-1081.
147. El-Maraghi, N.R.H., Platt, B.S. and Stewart, R.J.C. (1965) The effect of the interaction of dietary protein and calcium on the growth and maintenance of the bones of young, adult and aged rats. *Brit J Nutr.* 19 : 491-508.
148. Newell, G.C. and Beauchene, R.E. (1975) Effects of dietary calcium level, acid stress, and age on renal, serum, and bone responses of rats. *J Nutr.* 105 : 1039-1047.
149. Blanuša, M., Matkovic, V. and Kostial, K. (1978) Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. II. Influence of ovariectomy and dietary calcium. *Pflügers Arch.* 375 : 239-244.
150. Boyce, R.W. and Weisbrode, S.E. (1983) Effect of dietary calcium on the response of bone to 1,25(OH)₂D₃. *Lab Invest.* 48 : 683-689.
151. Peterson, C.A., Eurell, J.O.C. and Erdman Jr., J.W. (1995) Alterations in calcium intake on peak bone mass in the female rat. *J Bone Miner Res.* 10 : 81-95.
152. Takeda, T., Kimura, M., Yokoi, K. and Itokawa, Y. (1996) Effect of age and dietary protein level on tissue mineral levels in female rats. *Biol Trace Elem Res.* 54 : 55-74.
153. Roughead, Z.K., Hoover, J.L.B. and Kunkel, M.E. (1988) Effects of dietary protein on bone composition of rats determined by biochemical and absorptiometric methods. *Nutr Rep Int.* 37 : 653-664.
154. Kunkel, M.E., Powers, D.L. and Hord, N.G. (1990) Comparison of chemical, histomorphometric, and absorptiometric analyses of bones of growing rats subjected to dietary calcium stress. *J Am Coll Nutr.* 9 : 633-640.
155. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (1997) Dietary reference intakes for calcium, magnesium, phosphorus, vitamin D and fluoride. National Academy Press, Washington, DC.