HAL
open science

Nutritionnal regulation of hepatic metabolism of amino acids in growing ruminant: consequences on supply of nitrogenous nutrients to the muscle.

Guillaume Kraft

To cite this version:

Guillaume Kraft. Nutritionnal regulation of hepatic metabolism of amino acids in growing ruminant: consequences on supply of nitrogenous nutrients to the muscle.. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2009. English. NNT : 2009AGPT0001 . pastel-00004957

HAL Id: pastel-00004957

https://pastel.hal.science/pastel-00004957

Submitted on 23 Apr 2009

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

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

N°/__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)

Spécialité :

Sciences de la vie et santé

présentée et soutenue publiquement le 9 Janvier 2009

par

Guillaume KRAFT

RÉGULATION NUTRITIONNELLE DU MÉTABOLISME HEPATIQUE DES ACIDES AMINÉS CHEZ LE RUMINANT EN CROISSANCE

CONSÉQUENCES SUR L'APPORT DES NUTRIMENTS AZOTÉS AUX MUSCLES

Devant le jury :

M. Daniel SAUVANT, Professeur, AgroParisTech Paris	**Président**
Mme Sophie TESSERAUD, Directeur de Recherches, INRA Tours	**Rapporteur**
Mme Carole THIVIERGE, Chercheur, Rowett Institute Aberdeen (Ecosse)	**Rapporteur**
Mme Hélène FOUILLET, Chargée de Recherches, INRA Paris	**Examinateur**
M. Dominique BAUCHART, Directeur de Recherches, INRA Theix	**Examinateur**
Mme Isabelle ORTIGUES-MARTY, Chargée de Recherches, INRA Theix	**Examinateur**
Mme Isabelle SAVARY- AUZELOUX, Chargée de Recherches, INRA Theix	**Examinateur**

Directeur de thèse : **Dominique Bauchart et Isabelle Ortigues-Marty**
Encadrant de thèse : **Isabelle Savary-Auzeloux**

Laboratoire d'accueil :
INRA, UR 1213 Unité de Recherches sur les Herbivores,
Equipe Nutriments et Métabolismes,
F-63122 St Genès Champanelle

Remerciements

À Messieurs Jean-François Hoquette, Directeur de l'Unité de Recherches sur les Herbivores et Dominique Bauchart, Responsable de l'Equipe Nutriments Et Métabolismes pour m'avoir permis de réaliser mon travail de thèse au sein de l'INRA.

A Madame Isabelle Ortigues-Marty, nouvelle Responsable de l'Equipe Nutriments Et Métabolismes, pour avoir assuré l'encadrement scientifique de ce travail et pour ses conseils toujours pertinents.

A Madame Isabelle Savary-Auzeloux, Chargée de Recherches à l'INRA, pour avoir brillamment assuré l'encadrement scientifique et technique de ce travail, pour avoir fait grandir ce projet. Merci pour nos discussions scientifiques et pour ta présence au quotidien. Je t'exprime toute mon amitié et bravo pour m'avoir supporté.

A Monsieur Daniel Sauvant, Professeur de Zootechnie à AgroParisTech, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse

A Mesdames Carole Thivierge, Chercheur au Rowett Institute d'Aberdeen (Ecosse) et Sophie Tesseraud, Directeur de Recherches à l'INRA (Unité de Recherches Avicoles, Tours) pour avoir accepté d'assurer la fonction de rapporteur de cette thèse.

A Madame Hélène Fouillet, Chargée de Recherches à l'INRA (UMR Physiologie et Comportement de la Nutrition AgroParisTech-INRA, Paris) pour avoir accepté d'assurer la fonction d'examinatrice pour cette thèse.

A Mesdames Céline Cossoul, Anne-Sophie Bage pour leur précieuse aide technique tout au long de ma thèse. Elles ont toujours été présentes pour m'aider à préparer une expé, faire un dosage, analyser des résultats ou prendre un café.

A Mesdames Dominique Gruffat et Françoise Duboisset pour leur aide durant les expérimentations ex vivo. Mais comment faites-vous pour supporter de travailler dans la boite à gant ?

A Mesdames Cécile Bos, et Catherine Lapierre, ainsi que Messieurs Jaap Van Milgen, Dominique Dardevet et Didier Rémond pour avoir fait partie de mon comité de thèse. Nos discussions ont toujours contribué à faire avancer ce travail et me faire avancer personnellement.

A l'ensemble du personnel des Installations Expérimentales (l'Annexe, l'Abattoir Expérimental et les Intrabois) et en particulier à Messieurs Daniel Thomas et Philippe Gaydier pour leur réactivité et leur aide dans les décisions concernant l'alimentation des animaux. Ca n'a pas été facile tous les jours de gérer les changements de dernières minutes mais on est arrivé à quelque chose de bien au final.

A Messieurs Jean-Pierre Chaise et Joël Ferreira de l'Atelier de l'Unité de Recherches sur les Herbivores, les « Mac Gyver » des systèmes d'incubations. Vous avez toujours trouvé les meilleurs systèmes pour répondre à nos demandes plus ou moins farfelues.

A l'ensemble du personnel titulaire et des nombreux stagiaires qu'a comptée l'équipe NEM (et même l'ensemble du bâtiment Arche) durant ces trois années. Votre aide, vos conseils et les moments de détente partagés avec vous, ont été très importants à la réalisation de cette thèse.

A mes colocataires (d'appartement ou de laboratoire) qui ont supportés mon rangement et mon organisation…

A mes camarades de galères qui sont aussi en thèse ici où ailleurs, notamment aux membres du bureau ASICT de 2006-2007, mais aussi à tous les joueurs de Volley de l'équipe ADAS INRA (même l'équipe 1) pour m'avoir fait passer des super bons moments à Clermont (balades sur le Puy de Dôme, déplacement au fin fond de la Haute-Loire, terrasses ensoleillées de Clermont, sorties ski, matchs de rugby, de foot, concerts et autres réjouissances…).

A mes parents, mon frère et le reste de ma famille qui m'ont soutenu pendant ces années, ont accepté mon manque de disponibilité et le peu de nouvelles que j'ai pu donner par moments.

Listes des publications

Articles scientifiques

[1] Kraft G., Ortigues-Marty I., Durand D., Remond D., Jarde T., Bequette B., Savary-Auzeloux I.(2008) Role of the splanchnic tissues in the utilization of the nitrogenous nutrients in lambs fed a diet imbalanced in nitrogen or energy. Accepté avec modifications par *Animal*

[2] Savary-Auzeloux I., Kraft G., Bequette B., Papet I., Calder A.G., Ortigues-Marty I. (2008) Plasticity of the portal drained viscera and the liver amino acid metabolism in response to a nitrogen or energy deficiency in the diet of growing lambs. A Soumettre à *Journal of Animal Science*

[3] Kraft G., Gruffat D., Dardevet D., Rémond D., Ortigues-Marty I., Savary-Auzeloux I. (2008) Mise au point de la mesure de la synthèse protéique, de la néoglucogenèse et de l'oxydation des acides aminés dans des explants de foie incubés *ex vivo* en utilisant des concentrations physiologiques en nutriments dans le milieu d'incubation. A Soumettre au *Cahier des Techniques INRA*

[4] Kraft G., Gruffat D., Dardevet D., Rémond D., Ortigues-Marty I., Savary-Auzeloux I. (2008) Nitrogen and energy imbalanced diets differentially affected hepatic protein synthesis and gluconeogenesis in growing lambs. Accepté avec modifications à *Journal of Animal Science*

[5] Kraft G., Wester T.J., Dardevet D., Rémond D., Ortigues-Marty I., Savary-Auzeloux I. (2008) Nutritional regulation of the anabolic fate of amino acids with the liver (protein synthesis and neoglucogenesis): a cross-specie study. A Soumettre *Nutrition Research Review*.

Communications orales à des congrès

[6] Kraft G., Ortigues-Marty I., Savary-Auzeloux I. (2007) Métabolisme splanchnique des acides amines en réponse à un déséquilibre alimentaire chez l'agneau par infusion de traceurs. 2ème Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE, Tours, Octobre 2007

[7] Savary-Auzeloux I., Kraft G.,Ortigues-Marty I. (2007) Contribution of the digestive tract and the liver to the whole body metabolism of phenylalanine and leucine in growing lambs. In Proceedings of the 2nd International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Vichy, France. Septembre 2007.

[8] Kraft G., Gruffat D., Dardevet D., Rémond D., Ortigues-Marty I., Savary-Auzeloux I. Protein synthesis in the liver is differently altered by the dietary supply of nitrogen.energy ratio in lambs. In 59th Annual meeting of the European Association for Animal Production. Vilnius, Lithuanie. Août 2008.

Posters

[9] Kraft G., Ortigues-Marty I., Savary-Auzeloux I. (2007) Splanchnic net release and body retention of nitrogen in growing lambs fed diets unbalanced for energy and protein. In Proceedings of the 2nd International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, Vichy France, Septembre 2007.

[10] Savary-Auzeloux I., Kraft G., Dardevet D., Rémond D., Loncke C., Ortigues-Marty I. 2008. Liver protein synthesis regulation by energetic and nitrogenous nutrient supply. Amino Acid/Protein Metabolism in Health and Disease: mechanisms and pathways controlling protein expression and turnover, Padoue, Italie, Juillet 2008.

Abbréviations

4EBP1	Eukaryotic initiation factor 4E binding protein
A	Artère
AA	Acide aminé
AACR	Acide aminé à chaîne ramifiée
AAI	Acide aminé indispensable
AANI	Acide aminé non-indispensable
AAT	Acides aminés totaux
AGV	Acides gras volatils
AL	Arginosuccinate lyase
ARG	Arginase
ARN	Acide ribonucléique
ARN m	Acide ribonucléique messager
AS	Arginosuccinate synthase
ASAT	Aspartate Amino-Transférase
CPS-I	Carbamoyl-Phosphate Synthase
EIF2α	Eukaryotic initiation factor 2 α
F-1,6-biPase	Fructose 1-,6-bisphosphatase
G-6-Pase	Glucose-6-Phosphatase
GDH	Glutamate Deshydrogénase
GH	Growth hormone (Hormone de croissance)
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
mGCN2	Kinase phsophorylant eIF2a
mTOR	Mammalian target of rapamycin
OTC	Ornithine transcarbamylase
PC	Pyruvate carboxylase
PEPCK	Phosphoenol pyruvate carboxykinase
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase 1
T3	3.5.3'-triiodothyronine
T4	Thyroxine
VP	Veine Porte
VSH	Veine Sus-Hépatique

Sommaire

Remerciements 3
Listes des publications 5
Abbréviations 7
Sommaire 8
Liste des figures 11
Liste des tableaux 16
Liste des annexes 18
Introduction 21
Etude bibliographique 29
1. Méthodes d'étude du métabolisme des acides aminés 29
1.1. Méthodes de mesure de l'utilisation nette des acides aminés au niveau du corps entier, d'un tissu ou groupe de tissus. 29
1.1.1. Bilan azoté au niveau du corps entier 29
1.1.2. Bilan net en nutriments au niveau d'un tissu ou groupe de tissus 30
1.1.2.1. Préparations chirurgicales 32
1.1.2.2. Mesure des débits sanguins 32
1.1.2.3. Mesure des concentrations plasmatiques en AA 33
1.2. Méthodes de mesure de la synthèse/dégradation des protéines et oxydation des AA 34
1.2.1. Au niveau du corps entier 34
1.2.2. Au niveau d'un tissu ou groupe de tissus 37
1.2.2.1. Mesure indirecte de la synthèse et dégradation protéique et oxydation sur tissus cathétérisés 37
1.2.2.2. Mesure directe de la synthèse protéique par prélèvement tissulaire 37
1.2.2.3. Approches non quantitatives 40
1.3. Méthodes d'étude de la néoglucogenèse 41
1.3.1. Quantité de glucose néosynthétisé 43
1.3.2. Contribution des différents précurseurs à la néoglucogenèse 44
1.3.3. Approches non quantitatives 45
1.4. Méthodes d'étude de l'uréogenèse 45
1.4.1. Synthèse d'urée par le foie et recyclage 45
1.4.2. Méthodes non quantitatives 48
2. Absorption et métabolisme des acides aminés dans les tissus de l'aire splanchnique 49
2.1. Les tissus drainés par la veine porte 49
2.1.1. Digestion ruminale 49
2.1.1.1. Physiologie des estomacs du ruminant 49
2.1.1.2. Digestion des composés glucidiques 49
2.1.1.3. Digestion des composés azotés 51
2.1.1.4. Absorption ammoniacale et recyclage de l'urée 53
2.1.2. L'absorption intestinale : la disparition luminale 58
2.1.2.1. Particularités physiologiques de l'intestin 58
2.1.2.2. L'absorption intestinale : la disparition luminale des protéines et des AA 58
2.1.3. Résultante : apparition des nutriments azotés en veine porte 63

2.1.3.1. Ratio entre AA totaux et ammoniaque 63
2.1.3.2. Profil en AA apparaissant en veine porte 64
2.1.3.3. Apparition nette portale en peptides 65
2.1.3.4. Devenir de l'urée recyclée 65
2.1.4. Voies d'utilisation des nutriments azotés par le tube digestif 66
2.1.4.1. Oxydation complète ou partielle des AA 66
2.1.4.2. Synthèse des protéines dans les TDVP 69
2.2. Le foie 72
2.2.1. Anatomie et physiologie hépatique 72
2.2.2. Utilisation/émission nette hépatique des nutriments azotés 75
2.2.2.1. Aspects quantitatifs 75
2.2.2.2. Données qualitatives 76
2.2.3. Synthèse protéique hépatique 77
2.2.3.1. Synthèse des protéines totales 77
2.2.3.2. Les protéines particulières 78
2.2.4. Néoglucogenèse hépatique chez le Ruminant 79
2.2.4.1. Néoglucogenèse : spécificités du Ruminant 79
2.2.4.2. Utilisation des AA dans la néoglucogenèse 79
2.2.5. Catabolisme des AA et uréogenèse à partir des AA et de l'ammoniaque 80
2.2.5.1. Utilisation des AA et de l'ammoniaque pour l'uréogenèse 81
2.2.5.2. Oxydation des AA : devenir de la chaîne carbonée et spécificité entre AA 83
3. Régulation nutritionnelle de l'utilisation des acides aminés par l'aire splanchnique 85
3.1. Emission nette splanchnique d' AA, urée et ammoniaque 85
3.1.1. Niveau d'alimentation 85
3.1.2. Niveau d'apport protéique dans la ration 88
3.1.3. Impact de la nature du régime et dégradabilité de l'azote de la ration 90
3.1.3.1. Fourrage vs concentré 90
3.1.3.2. Impact de la dégradabilité de l'azote 91
3.1.4. Impact d'une supplémentation énergétique 92
3.2. Synthèse protéique par les tissus splanchniques 93
3.2.1. Tissus drainés par la veine porte 93
3.2.2. Foie 95
3.3. Oxydation des AA dans les tissus splanchniques 97
3.3.1. Tissus drainés par la veine porte 97
3.3.2. Foie 98
3.4. Néoglucogenèse hépatique 99
4. Régulation de l'utilisation des acides aminés dans l'aire splanchnique par la demande en nutriments des tissus périphériques (mamelle et muscle) 101
4.1. Emission nette et catabolisme splanchnique des AA 101
4.2. Synthèse protéique splanchnique 103
4.3. Néoglucogenèse 104
5. Mecanismes de régulation de l'impact des facteurs nutritionnels sur le métabolisme splanchnique des acides aminés 106
5.1. Régulations hormonales 106
5.1.1. Synthèse et prélèvement d'hormones par les tissus splanchniques, impact sur les bilans nets en AA 106
5.1.2. Impact sur le métabolisme protéique splanchnique 108
5.1.3. Impact sur la néoglucogenèse 110
5.2. Les nutriments « signaux » 111
5.2.1. Notion de nutriment signal 111

5.2.1.1. AA et transduction du signal 111
5.2.1.2. AA et hydratation cellulaire (« cell swelling » en anglais) : 113
5.2.2. Le signal porte 113
Conclusion de l'étude bibliographique 116
Publication de synthèse bibliographique 121
Objectifs et développement du travail de thèse 157
Publication n°1 164
Publication n° 2 201
Publication n° 3 229
Publication n° 4 261
Discussion générale 293
1. Impact des régimes sur la rétention azotée corporelle et l'adéquation entre émission nette splanchnique d'AA et utilisation supposée du muscle 293
1.1. Rétention azotée et croissance 293
1.2. Emission nette des AA particuliers par l'aire splanchnique 295
2. Devenir des AA dans les tissus splanchniques et en particulier dans le foie. 299
2.1. Absorption nette d'AA par les TDVP et prélèvement net d'AA par le foie 299
2.1.1. L'absorption nette portale d'AA est-elle fonction de l'apport d'azote dans la ration ? 299
2.1.2. Le prélèvement net hépatique d'AA est-il fonction de l'apparition nette portale d'AA ? 300
2.2. Voies métaboliques expliquant les prélèvements d'AA par les tissus drainés par la veine porte et par le foie 302
2.2.1. Tissus drainés par la veine porte 302
2.2.2. Foie 303
3. Quels mécanismes peuvent réguler les voies métaboliques d'utilisation des AA par le foie 305
3.1. Quels mécanismes de régulations sont mis en jeu pour expliquer la baisse de synthèse protéique hépatique dans le régime E ? 305
3.2. Quels mécanismes de régulations sont mis en jeu pour expliquer le maintien de synthèse protéique hépatique dans le régime N ? 306
Conclusions et perspectives 311
1. Quels apports adéquats en énergie et en azote pour les ruminants ? 311
2. Voies métaboliques d'utilisation des AA dans le foie 312
3. Facteurs de régulation impliqués dans les adaptations du métabolisme hépatique aux régimes expérimentaux 312
4. Autres concepts et perspectives soulevés par ce travail 313
Références bibliographiques 317
Annexe n° 1 341
Annexe n° 2 346
Annexe n° 3 350
Annexe n° 4 351

Liste des figures

Figure 1 Consommation mondiale de viandes de volailles, porcine, ovine, caprine et bovine pour les périodes 1964-1966, 1997-1999 et l'année 2000 (Rapport FAO 2006).

Figure 2 Consommation de viande bovine en 1990 et en 2007 dans les 27 pays de l'Union Européenne (UE), aux Etats-Unis, au Brésil et en Chine. (Rapport Innoviande 2007)

Figure 3 Cycle de l'azote dans les exploitations agricoles produisant du lait et de la viande de ruminants. (Projet Européen REDNEX). Les composés entourés de rouge correspondent aux composés polluants.

Figure 4 Contribution de différents tissus à la synthèse protéique corporelle (MacRae, 1996)

Figure 5 Effet de l'énergie et de l'azote ingéré sur l'azote retenu par des ruminants (Balch 1967).

Figure 6 Principe du bilan azoté (d'après Miller, 1969)

Figure 7 Représentation schématique de la physiologie vasculaire de l'aire splanchnique chez les ruminants. (d'après Seal & Reynolds 1993).

Figure 8 Représentation schématique du modèle à deux compartiments et mesure du flux corporel (F) d'un acide aminé (Cayol, 1995).

Figure 9 Voie de la néoglucogenèse (d'après Nuttal et coll., 2008)

Figure 10 Mesure de la néoglucogenèse à partir d'infusion de $^{2}H_2O$ (d'après Landau et coll. 1995).

Figure 11 Pyruvate carboxylase (PC) hépatique : Relation entre son activité et sa quantité d'ARNm (d'après Greenfield et coll., 2000)

Figure 12 Cycle de l'urée et enzymes clés

Figure 13 Perfusion d'urée [$^{15}N^{15}N$] et analyse des isotopomères [$^{14}N^{14}N$], [$^{15}N^{14}N$] et [$^{15}N^{15}N$] dans l'urée urinaire pour quantifier le devenir de l'urée entrant dans le tube digestif (recyclage). (d'après Lapierre et Lobley, 2001) .

Figure 14 Dégradation ruminale et absorption intestinale des glucides. (d'après Russel & Hespell 1981 et Jarrige et coll., 1995)

Figure 15 Synthèse des acides aminés à partir de l'ammoniaque (NH_3) (Jarrige et coll., 1995).

Figure 16 Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jarrige et coll., 1995).

Figure 17 Dégradation ruminale et absorption intestinale des protéines, des peptides, des acides aminés et de l'ammoniaque (d'après Russel & Hespell 1981).

Figure 18 Profil en acides aminés indispensables (AAI) dans les bactéries du rumen (Storm & Orskov, 1983) comparé au profil des trois aliments utilisés dans l'alimentation animale : le maïs grain, le tourteau de soja et la farine de poisson (d'après Lapierre et coll. 2002) et aux profils d'apparition nette portale chez la vache laitière (Berthiaume et coll., 2001) (contribution en % de chaque AA à la somme des 9 AAI considérés, sauf pour l'apparition nette portale où il n'y a pas de valeur pour le tryptophane)

Figure 19 Flux intestinaux en azote (N) ou en acides aminés Explication du Tableau 1.

Figure 20 Etude comparée entre les acides aminés indispensables disparus de l'intestin (digestibilité apparente iléale) et ceux retrouvés au niveau de la veine porte. (a) Tagari & Bergman, 1978, brebis alimentées avec de la luzerne à haute teneur en protéines. (b) MacRae et coll., 1996, agneaux en croissance alimentés avec de la luzerne à un plus bas niveau d'ingestion que (a), (c) Berthiaume et coll., 2001 vaches laitières recevant du fourrage.

Figure 21 Emission nette d'acides aminés en veine porte exprimée en pourcentage du flux absorbé d'acides aminés. (Asx représente Asp+ Asn et Glx représente Glu + Gln) (Hanigan et coll., 2005).

Figure 22 Recyclage de l'azote chez les ruminants : devenir de l'urée produite par le foie. (Lapierre et Lobley, 2003)

Figure 23 Oxydation du glutamate dans la muqueuse intestinale (Le Floc'h et Sève, 2000).

Figure 24 Quantité d'acides aminés indispensables (mmol/j) séquestrés dans les tissus du tube digestif et les sécrétions endogènes issues de la fourniture artérielle (en blanc) et luminale (en gris) en AA. Les valeurs entre parenthèses correspondent au pourcentage provenant de l'artère) (MacRae et coll., 1997)

Figure 25 Contribution des tissus splanchniques et du muscle à la synthèse protéique du corps entier (exprimé en pourcent) chez l'agneau (1 semaine) et le mouton (8 mois) (MacRae, 1996).

Figure 26 Synthèse protéique fractionnaire (%/jour) dans l'aire digestive d'agneaux nourris au lait (pré-ruminants d'1 semaine,) ou sevrés (8 semaines et 8 mois) (Extrait de Attaix et al, 2005).

Figure 27 Anatomie microscopique du foie (d'après Marieb, 1999)

Figure 28 Efflux hépatique pour différents nutriments sanguins (concentration en nutriment dans la veine hépatique x débit en veine hépatique) comparé à l'influx hépatique ([concentration en veine porte + concentration en artère hépatique] x débit en veine hépatique) (d'après Hanigan, 2005).

Figure 29 Efflux hépatique (concentration en nutriment dans la veine hépatique x débit en veine hépatique) d'acides aminés individuels comparé à l'influx hépatique ([concentration en veine porte + concentration en artère hépatique] x débit en veine) (d'après Hanigan, 2005)

Figure 30 Cycle de l'urée et enzymes clés

Figure 31 Relation entre l'apparition nette en acides aminés (AA) au niveau des tissus drainés par la veine porte (TDVP) et l'ingestion de matière sèche par kg de poids métabolique ($kg^{0.75}$) (Lescoat et coll.1996)

Figure 32 Effet du niveau d'alimentation sur a) le bilan net en acides aminés libres totaux (mmol/h) au niveau splanchnique (Tissus Drainés par la Veine Porte (TDVP), Foie et Tissus Splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'acides aminés libres (mmol/h) (d'après Lapierre et coll., 2000). Pour des vaches laitières nourries à 0,6 fois l'entretien, à l'entretien ou à 1,6 fois l'entretien.

Figure 33 Effet d'une supplémentation protéique dans la caillette sur a) le bilan net en azote α-aminé (mmol/h) au niveau splanchnique (tissus drainés par la veine porte (TDVP), Foie et tissus splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'azote α-aminé (mmol/h) chez des bouvillons (d'après Guerino et coll. 1991).

Figure 34 Effet de la nature de l'azote dans la ration sur a) le bilan net en azote α-aminé (mmol/h) au niveau splanchnique (tissus drainés par la veine porte (TDVP), Foie et tissus splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'azote α-aminé (mmol/h) chez des moutons. (d'après Ferrell et coll., 2001).

Figure 35 Emission hépatique de glucose chez la vache laitière (●) et le bovin en croissance (■) en fonction de l'énergie métabolisable ingérée, n=49. La pente pour les deux groupes est similaire (Huntington et coll., 2006)

Figure 36 Effet de la demande des tissus périphériques sur a) le bilan net en azote α-aminé (mmol/h) au niveau splanchnique (tissus drainés par la veine porte (TDVP), foie et tissus splanchniques (TSP = TDVP + Foie)). b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'azote α-aminé (mmol/h) chez des bouvillons (d'après Bruckental et coll., 1997). L'infusion de hormone de croissance (GH) engendre une demande accrue des tissus périphériques en nutriments

Figure 37 Synthèse protéique fractionnaire (%/j) dans le foie de vaches Holstein à différents stades du cycle reproduction-lactation. (Bell, 1995)

Figure 38 Effet du jours pré ou post vêlage sur l'abondance des ARNm de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK ; ●) et de la pyruvate carboxylase (PC ; ■) (Greenfield et coll., 2000).

Figure 39 Modifications de concentrations circulantes en insuline et en glucagon 30 minutes après l'injection intra veineuse d'AA individuels à 1mmol/L chez le chien conscient (n= 4-5) (Nair et Short, 2005)

Figure 40 Voie de signalisation impliquée dans le mécanisme d'action des acides aminés (AA) sur la traduction protéique (Tesseraud et coll., 2007 ; Proud, 2002, Balage, Cours Master 2, Université Clermont-Ferrand 2)

Figure 41 Synthèse protéique fractionnaire d'albumine et de protéines constitutives au foie (%/j) en présence ou absence d'un gradient artério-portal en acides aminés (AA) (Dardevet et coll., 2008).

Figure 42 Sites d'insertion des cathéters et de la sonde débimétrique placés au niveau des différents vaisseaux chez les agneaux lors de l'Expérimentation 1.

Figure 43 Schéma récapitulatif des deux expérimentations

Figure 44 Effet de l'énergie et de l'azote ingéré par les Ruminants sur l'azote retenu (Balch 1967).

Figure 45 a, b et c Accrétion protéique potentielle calculée à partir de l'émission nette splanchnique pour la lysine, leucine, thréonine, méthionine, histidine et phénylalanine. Comparaison avec l'accrétion protéique musculaire mesurée à partir des bilans azotés corporels.

Figure 46 Bilans nets en leucine (mmol/h) au niveau des tissus drainés par la veine porte (TDVP), et flux de Leucine [1-^{13}C] (mmol/h) dans divers compartiments tissulaires (TDVP, Foie et autres tissus).

Figure 47 Synthèse des protéines plasmatiques et de l'albumine par la methode d'infusion de leucine [1-^{13}C] chez des agneaux cathétérisés nourris avec un régime témoin (T), un régime déficitaire en azote (N) ou un régime déficitaire en énergie (E)

Figure 48 Bilans nets hépatiques en phénylalanine (mmol/h), et flux de phénylalanine [$^{2}H_5$] (mmol/h) dans divers compartiments tissulaires (Tissus drainés par le veine porte (TDVP), Foie et autres tissus).

Figure 49 a) Proportion de phénylalanine (Phe) prélevée (sur une base nette) par le foie pour la synthèse des protéines totales exportées b) Incorporation de valine [U-^{14}C] dans les protéines exportées d'explant de voie (en nmol de Val incorporé / mg d'ADN de l'explants / h). Chez les agneaux nourris avec les régimes témoin (T), déficitaire en azote (N) et déficitaire en énergie (E).

Figure 50 Représentation schématique du modèle à deux compartiments et mesure du flux corporel d'un acide aminé (Cayol, 1995).

Figure 51 Représentation schématique de l'activité spécifique du traceur suivant l'administration d'une perfusion d'AA marqué (D'après Attaix et coll., 2005)

Figure 52 Représentation schématique de l'activité spécifique du traceur suivant l'administration d'une surcharge d'AA marqué (D'après Attaix et coll., 2005)

Figure 53 Exemple de chromatogramme obtenu en chromatographie gazeuse couplé à la spéctrométrie de masse (GC-MS) sur un échantillon de plasma ovin

Figure 54 Dilution isotopique : mesure du ratio entre l'ion m et m+1 exemple de l'alanine)

Figure 55 Droite de régression de gamme associant un enrichissement isotopique à une concentration en AA

Liste des tableaux

Tableau 1 Flux intestinaux d'acides aminés indispensables (g/j) à différents sites de mesures chez la vache laitière (Lapierre et coll., 2006, adapté de Berthiaume et coll., 2001).

Tableau 2 Proportion d'acides aminés ingérés apparaissant en veine porte pour les trois études ci-dessus (en pourcent de la disparition intestinale mesurée par digestibilité apparente iléale)

Tableau 3 Proportion d'acides aminés ingérés apparaissant en veine porte chez les porcs en croissance (d'après Le Floc'h et Sève, 2000).

Tableau 4 Apparition nette d'acides aminés (mmol/h) en veine mésentérique (TDVM) et en veine porte (TDVP) chez le mouton nourri avec 1200g de fourrage (d'après Lobley et coll., 2003).

Tableau 5 Apparition nette portale en nutriments azotés et ingestion d'azote digestible (mmol/h) : effet de l'espèce animale et du type d'alimentation (Lapierre et Lobley, 2001).

Tableau 6 Fonctions du foie (Hecketsweiler & Hecketsweiler, 2004)

Tableau 7 Prélèvement net hépatique d'acides aminés totaux (ou d'azote α-amino) en pourcent de l'apparition nette en veine porte chez les bovins.

Tableau 8 Composition en ingrédients et composition chimique des concentrés (1, 2 et 3) et du fourrage utilisés respectivement dans les régimes témoin (T), déséquilibrés en azote (N) et déséquilibré en énergie (E), lors des deux expérimentations : Expérimentation 1 *in vivo* (sur agneaux cathétérisés au niveau de l'aire splanchnique), Expérimentation 2 *ex vivo* (avec incubation d'explants de foie).

Tableau 9 Poids vifs, gain moyen quotidien (GMQ), quantités ingérées de matière sèche (MS), de matière azote totale (MAT), d'énergie métabolisable (EM), azote digéré, des agneaux recevant les régimes témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en énergie (E), lors des deux expérimentations : Expérimentation 1 *in vivo*, Expérimentation 2 *ex vivo*.

Tableau 10 Apparition nette portale en acides aminés totaux (AAT) et acides gras volatils totaux (AGV) (en mmol/h) chez les agneaux recevant les régimes témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en énergie (E) (Expérimentation 1, *in vivo*)

Tableau 11 Ratio azote digéré / énergie métabolisable ingéré (N digéré/ EM ingéré), Bilan d'azote (azote urinaire, fécal et retenu en g / j et en % du digéré) et métabolisme de l'urée (production nette hépatique, urée dans l'urine et urée recyclée vers les tissus drainés par la veine porte (TDVP)) pour les animaux nourris avec les régimes témoin (T), déséquilibré en azote (N) et

déséquilibré en énergie (E), lors des deux expérimentations : Expérimentation 1 *in vivo*, Expérimentation 2 *ex vivo*.

Tableau 12 Prélèvement net d'acides aminés (AA) par le foie exprimé en fonction de l'apparition nette portale ou de l'influx d'AA [veine porte + artère hépatique] x débit plasmatique, pour les AA totaux (AAT), AA non indispensables (AANI), AA indispensables (AAI) et AA à chaînes ramifiées (AACR)) ainsi que certains AAI individuels, chez des agneaux nourris avec trois régimes expérimentaux (témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en Energie (E)).

Tableau 13 Tableau d'apparition nette portale en acides aminés totaux (AAT) et en acides gras volatils totaux (AGV) (en mmol/h), concentration en insuline en artère et en veine porte (nUI/L) et synthèse protéique obtenu *in vivo* (résultats obtenus lors de l'expérimentation 1, *in vivo*)

Tableau 14 Liste des ions caractéristiques des différents acides aminés et des acides aminés [U-^{13}C] qui ont été quantifié par spectrométrie de masse.

Liste des annexes

Annexe 1 Mesure du flux d'un acide aminé traceur au niveau du corps entier

Annexe 2 Difficulté du choix du compartiment précurseur de la synthèse protéique lors de l'utilisation d'AA marqués perfusés à dose traceuse

Annexe 3 Calcul des bilans nets en acides aminés dans les tissus splanchniques : tissus drainés par la veine porte, foie et tissus splanchniques

Annexe 4 Détermination de la concentration en acides aminés dans le plasma par la technique de dilution isotopique

Introduction

Introduction

La consommation mondiale de viande (toutes espèces confondues) augmente de façon exponentielle entre les années 60, 90 et 2000 (Figure 1) et selon les prédictions de la FAO (Food and Agriculture Organization) et de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques), elle devrait doubler entre 2007 et 2050 du fait de l'accroissement de la population mais aussi de l'évolution des modes d'alimentation dans les pays émergents. L'augmentation attendue entre 2007 et 2016 est de 9,7 % pour le bœuf, de 18,5 % pour le porc et de 15,3 % pour le poulet (Le Monde, 22/07/08 ; FAO, 2006). Dans le cas de la viande bovine, bien que la consommation *per capita* soit en faible baisse en Europe (suite à la crise de l'ESB, aux changements du régime alimentaire, à la sensibilisation de la population aux risques pour la santé des produits carnés (maladies cardiovasculaires, obésité, diabète)), elle explose au Brésil et surtout en Chine (Figure 2, Rapport Innoviande, 2008). En effet, dans les pays émergents, l'augmentation de revenu se traduit par une augmentation de la consommation de produits laitiers et carnés.

Figure 1 Consommation mondiale de viandes de volailles, porcine, ovine, caprine et bovine pour les périodes 1964-1966, 1997-1999 et l'année 2000. (Rapport FAO 2006).

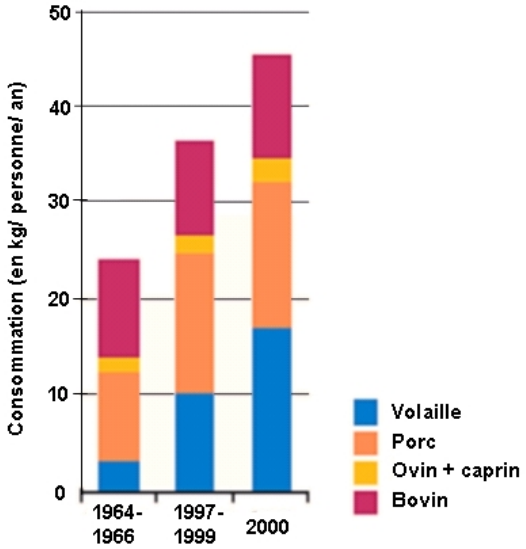
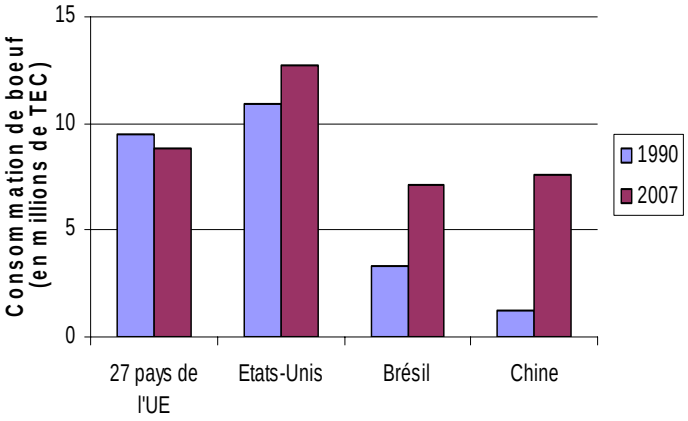


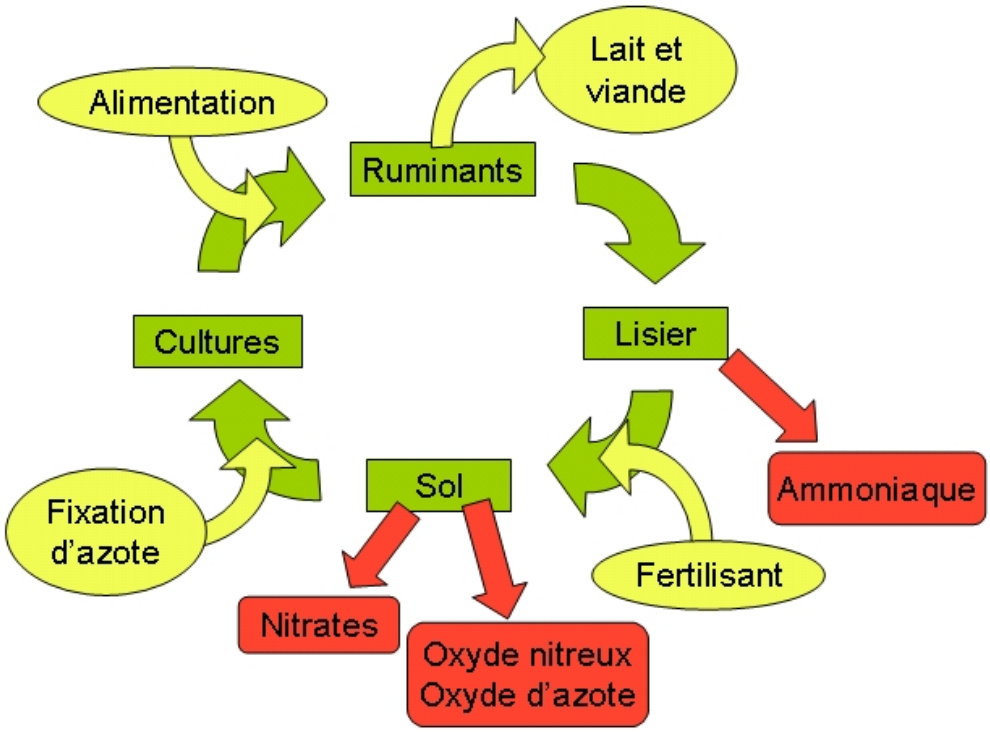
Figure 2 Consommation de viande bovine en 1990 et en 2007 dans les 27 pays de l'Union Européenne (UE), aux Etats-Unis, au Brésil et en Chine. (Rapport Innoviande 2007)



En Europe, pour endiguer la baisse de consommation de viande, les producteurs développent deux stratégies : la production de viande de qualité pour répondre à la demande de niche (en prenant

toutefois soin de ne pas pratiquer des prix prohibitifs) ; mais également en produisant une viande à des coûts plus abordables. Les producteurs cherchent la durabilité économique de leurs élevages à travers ces deux stratégies et ceci dépend principalement de l'efficacité de production des animaux pour gérer au mieux les intrants. Un autre critère important pour l'élevage, liée à l'augmentation de la consommation mondiale, est la prise en compte des enjeux environnementaux. En effet, l'élevage génère 18 % des émissions mondiales des gaz à effets de serre (Martin et coll., fiche de presse INRA 11/07/08). Un rapport de la FAO (2006) estime à 65 % les émissions d'hémioxyde d'azote (essentiellement liées au fumier) imputables au cycle de l'azote associé à l'élevage (Figure 3). Pour limiter ces pertes d'azote dans l'environnement dans un contexte d'augmentation de la production de viande au niveau mondial, des stratégies visant à améliorer l'efficacité de conversion de l'azote de l'aliment en produit (lait ou viande) sont à envisager pour limiter les intrants azotés dans les exploitations agricoles.

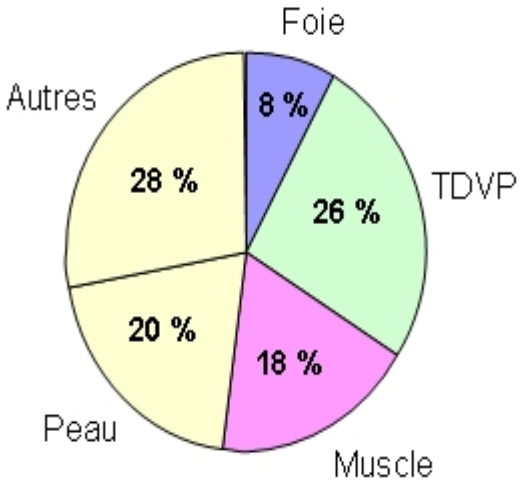
Figure 3 Cycle de l'azote dans les exploitations agricoles produisant du lait et de la viande de ruminants. (Projet Européen REDNEX). Les composés entourés de rouge correspondent aux composés polluants.



Dans ce contexte, l'efficacité de production est une question cruciale chez toutes les espèces d'intérêt zootechnique. Des gains d'efficacité peuvent être réalisés au niveau digestif mais ces aspects ont été déjà largement explorés (Petit & Vieira 1994 ; Valkeners et coll., 2006 ; Shroeder & Titgemeyer, 2008). L'amélioration de l'efficacité de production peut aussi être obtenue via une amélioration de l'efficacité d'utilisation métabolique des nutriments azotés. En effet, le ratio entre

l'accrétion protéique et la synthèse protéique corporelle est de 30-33 % pour le porc et la vache laitière mais chute à 6 % chez le bouvillon en finition (Lobley, 2003), montrant l'importance de la baisse d'efficacité d'utilisation de l'azote lorsque les animaux en croissance sont à un stade physiologique plus mature et déposent en majorité des lipides corporels. Ainsi, et en particulier dans le cas des animaux producteurs de viande, les tissus de l'aire splanchnique, composés des tissus drainés par la veine porte (**TDVP**) et du foie, sont des compétiteurs importants du muscle pour l'utilisation de nutriments azotés. En effet, ils représentent 26 % (TDVP) et 8 % (foie) de la synthèse protéique du corps entier (Figure 4) et 25 % chacun de l'utilisation d'O_2 du corps entier (Lobley, 2003) alors qu'ils ne représentent que 4,5 % (TDVP) et 2 % (foie) de la masse protéique du corps entier (MacRae et coll., 1993) tandis que les muscles représentent 48 % de cette masse protéique. Etant donnée l'importante activité métabolique des tissus splanchniques, la connaissance de l'efficacité d'utilisation des nutriments azotés par ces tissus est donc essentielle dans le cadre d'une stratégie visant à améliorer l'efficacité globale d'utilisation des nutriments azotés chez le ruminant en croissance.

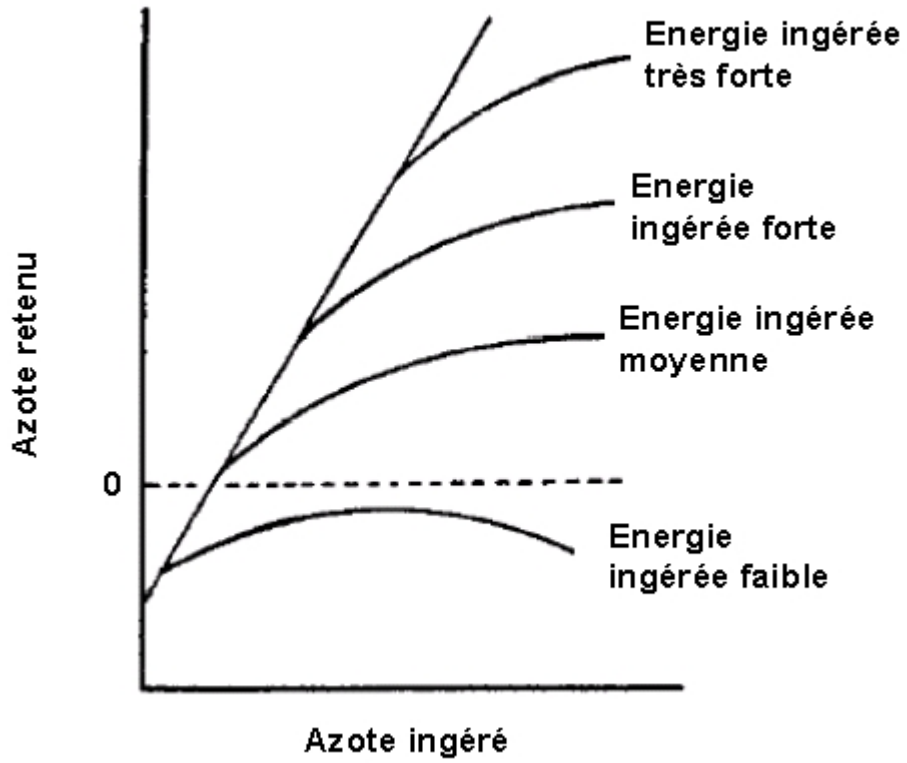
Figure 4 Contribution de différents tissus à la synthèse protéique corporelle (MacRae, 1996)



Un des axes de recherche de l'Unité de Recherche sur les Herbivores (URH, Directeur : J.F. Hocquette) de l'INRA de Clermont Ferrand-Theix et du Département Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage (PHASE, Directeur : P. Chemineau) est l'amélioration de l'efficacité de production des ruminants en croissance et à l'engraissement. Plus précisément, l'équipe Nutriments et Métabolismes de l'URH (équipe NEM, dirigée par I. Ortigues-Marty) dans laquelle ce travail de thèse a été réalisé, s'intéresse aux régulations nutritionnelles du métabolisme des nutriments et aux interactions entre tissus et organes pour l'utilisation de ces nutriments (en particulier foie et

muscles) chez ces animaux. Mon travail de thèse s'est focalisé plus particulièrement sur le métabolisme des acides aminés (**AA**) et des composés azotés absorbés par le ruminant en croissance dans l'aire splanchnique. De nombreuses études ont montré qu'une augmentation de production de protéines sous forme de viande et de lait était constatée lors d'une augmentation des quantités ingérées (Burrin et coll., 1991 ; Owens et coll., 1993 ; Lapierre et coll. 2000). Cependant, l'efficacité marginale de production baisse lorsque l'ingéré augmente (Lapierre et coll., 2005). Les supplémentations azotées dans la ration peuvent augmenter la croissance (Figure 5, Balch et coll., 1967, Chowdhury & Orskov, 1997), mais s'accompagnent d'une efficacité d'utilisation de l'azote réduite et d'un impact encore plus délétère sur l'environnement (Raggio et coll., 2004 ; Blouin et coll., 2002 ; Bruckental et coll., 1997). Les résultats de ces études nous ont soulevé deux questions principales : 1) l'animal peut-il s'adapter à une baisse des apports alimentaires d'azote sans pénaliser significativement la production, grâce à une amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'azote ? 2) Quel est l'effet d'une diminution des apports énergétiques sachant qu'il a été montré que l'efficacité d'utilisation de l'azote dépendait fortement des apports énergétiques (Figure 5, Balch, 1967). Cependant, peu de données existent sur le devenir métabolique des AA dans l'aire splanchnique lorsque le ratio entre apports alimentaires azotés et énergétiques varie.

Figure 5 Effet de l'énergie et de l'azote ingéré sur l'azote retenu par des ruminants (Balch 1967).



Ainsi, mon travail de thèse a porté sur les conséquences de modifications des apports énergétiques et azotés sur l'efficacité d'utilisation des AA au niveau splanchnique. Considérant comme niveau de référence, les apports alimentaires recommandés selon l'INRA (1978) (au delà desquels une augmentation d'apport s'accompagne d'une baisse d'efficacité), nous avons choisi une diminution des apports azotés seuls ou des apports énergétiques seuls. L'animal modèle choisi a été l'agneau en croissance modérée (150-200 g/jour) (car avec les contraintes expérimentales, les agneaux ne pouvaient pas exprimer tout leur potentiel).

Mon travail de thèse a ainsi été conduit de façon à répondre successivement aux trois points suivants :

1) Quel sont les effets d'un déséquilibre entre les apports énergétiques et azotés dans la ration d'agneaux sur la **rétention azotée et la croissance des animaux** ? et comment se répartit l'utilisation des acides aminés **entre tissus splanchniques et tissus périphériques selon les régimes** ?

2) Quelles sont les **voies métaboliques d'utilisation des AA qui ont une importance dans le foie** et qui pourraient expliquer les modifications de prélèvement hépatique d'AA induites par les régimes expérimentaux ?

3) Peut-on formuler des hypothèses sur les **facteurs de régulation** impliqués dans ces adaptations ?

Ce manuscrit de thèse débutera donc par un état des lieux des connaissances bibliographiques concernant l'utilisation des nutriments azotés dans l'aire splanchnique et leur régulation par l'apport alimentaire et les besoins des tissus périphériques (muscle, mamelle). Cette partie sera valorisée et complétée par une publication de synthèse bibliographique concernant le métabolisme hépatique des AA. L'ensemble des données obtenues au cours de mon travail de thèse sera ensuite présenté sous forme d'articles scientifiques puis discuté.

Etude bibliographique

Etude bibliographique

La première partie de cette revue bibliographique concerne la présentation des méthodologies disponibles pour l'étude du métabolisme des AA. En effet, de très nombreuses méthodes sont à la disposition de l'expérimentateur pour étudier l'utilisation ou le devenir métabolique des AA dans les différents tissus et organes. Chacune de ces méthodes présente des limites dans son utilisation et dans les concepts qu'elle peut générer. Ces techniques sont donc décrites de façon critique afin d'en connaître leurs avantages et leurs inconvénients. La suite de la revue bibliographique présente l'absorption et le métabolisme des AA au sein de l'aire splanchnique, puis l'influence de différents facteurs nutritionnels et des besoins des tissus périphériques (mamelle, muscle). Enfin, en dernière partie sont abordés les mécanismes majeurs qui participent à la régulation de l'utilisation des acides aminés par l'aire splanchnique.

1. Méthodes d'étude du métabolisme des acides aminés

1.1. Méthodes de mesure de l'utilisation nette des acides aminés au niveau du corps entier, d'un tissu ou groupe de tissus.

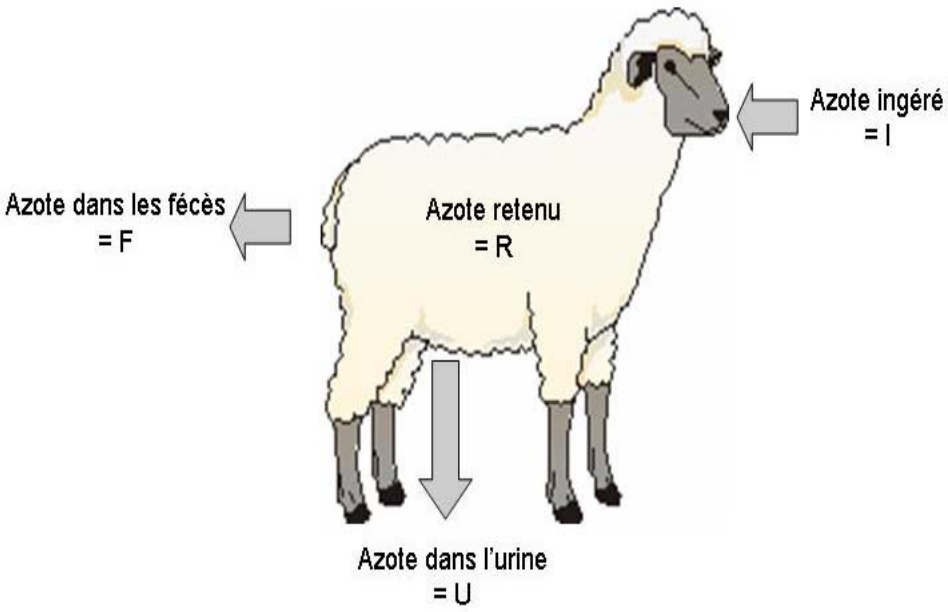
La différence (bilan net) entre l'azote sortant et entrant de l'animal, d'un tissu ou groupe de tissus permet d'estimer l'accrétion azotée. Un bilan net positif représente un gain net d'azote alors qu'un bilan net négatif représente une perte nette.

1.1.1. Bilan azoté au niveau du corps entier

Le bilan azoté au niveau du corps entier est utilisé pour décrire l'évolution nette de la masse protéique de l'organisme (muscles, peau …). Le calcul de ce bilan implique que le compartiment non protéique (AA libres et surtout urée) reste stable durant la période de mesure (Miller, 1969). Pour être fiable, un bilan azoté doit être réalisé, chez les ruminants, sur une période suffisamment longue (5-6 jours au minimum). Sur toute la période de mesure, la quantité d'azote dans l'ingéré, les fécès et les urines est ainsi dosée et le bilan est calculé selon l'équation présentée en Figure 6. La différence entre la quantité d'azote ingéré et d'azote excrété dans les fécès correspond à l'azote digéré par l'animal (également appelé digestibilité apparente car ne prend pas en compte les secrétions protéiques endogènes). L'azote urinaire représentant une majorité de l'excrétion azotée, le recueil précis des urines et leur traîtement à l'acide sont donc nécessaires pour éviter les pertes

d'azote ammoniacal (Martin, 1966). En supplément de l'absence de prise en compte des pertes en protéines endogènes digestives, les pertes éventuelles d'ammoniaque issues des fécès et de l'urine ainsi que les pertes insensibles (sueur, desquamation, poils …) (Martin, 1966) sont souvent négligées dans le calcul du bilan net car elles sont difficiles à mesurer. Le bilan azoté est donc relativement facile à mesurer et n'est pas invasif mais reste peu précis.

Figure 6 Principe du bilan azoté (d'après Miller, 1969)



Azote retenu par l'animal (g/j) = I - F - U

Azote Digéré par l'animal (g/j) = I - F

Digestibilité de l'azote (%) = (I – F)/ I

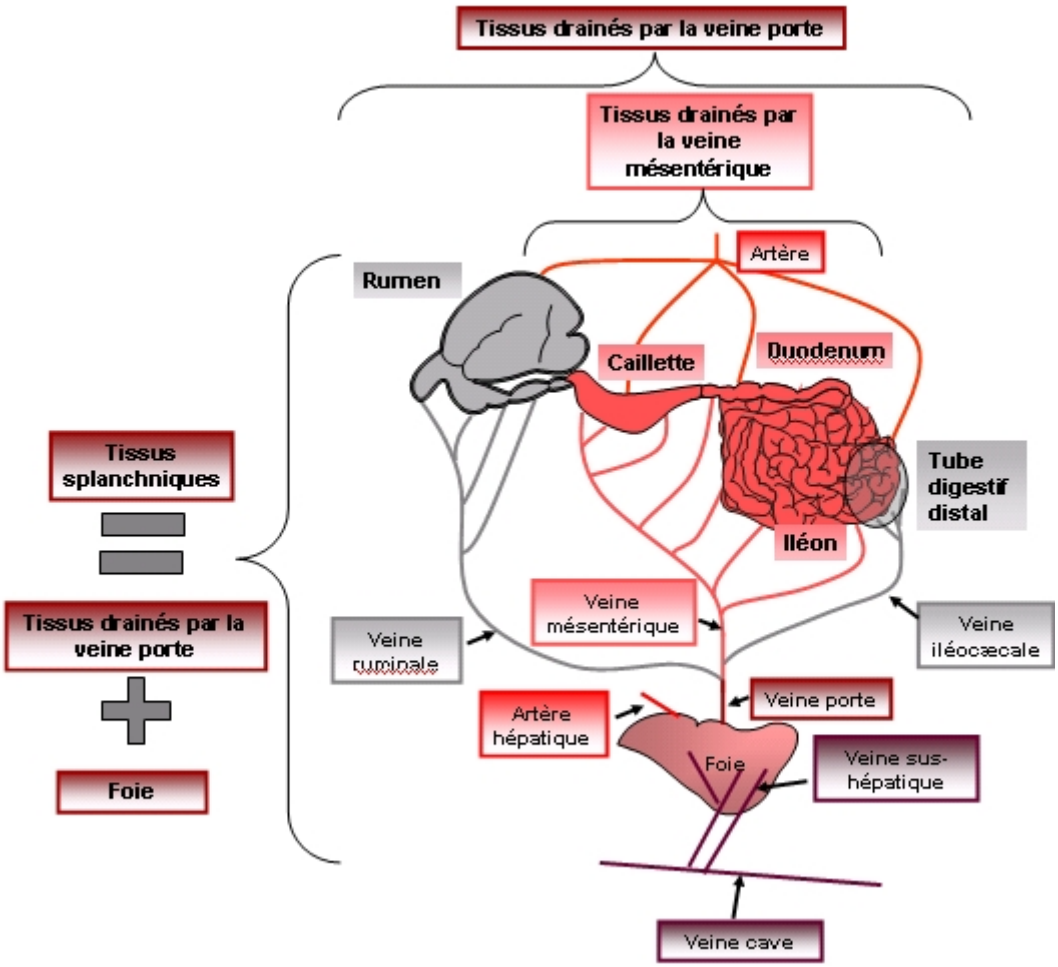
Avec I, F et U en g d'azote/j

1.1.2. Bilan net en nutriments au niveau d'un tissu ou groupe de tissus

Comme dans le cas des études de bilans azotés au niveau du corps entier, la différence entre la quantité de nutriments azotés présente en sortie et entrée d'un tissu ou groupe de tissus peut être mesurée *in vivo* grâce à la pose de cathéters en amont et en aval du ou des tissus d'intérêt. Ces bilans nets en nutriments sont calculés en tenant compte de la loi de Fick (Visscher & Johnson, 1953) et nécessitent 1) des animaux opérés chirurgicalement (implantation en chronique de

cathéters), 2) la mesure des concentrations en nutriments dans les vaisseaux afférents et efférents au(x) tissu(s) d'intérêt 3) la mesure des débits sanguins afférents et efférents au(x) tissu(s) d'intérêt.

Figure 7 Représentation schématique de la physiologie vasculaire de l'aire splanchnique chez les ruminants. (d'après Seal & Reynolds 1993).



Les différents tissus et organes splanchniques : rumen, caillette, dudodénum, iléon, rate, pancréas, tissus adipeux, tube digestif distal et foie.
Les différents vaisseaux irrigant ou drainant ces tissus: artères, veine ruminale, veine mésentérique, veine porte, veine hépatique, veine sus-hépatique.

Les tissus drainés par la veine mésentérique regroupent la caillette, le duodénum et l'iléon. Ils sont alimentés par le sang artériel et le sang efférent s'écoule dans la veine mésentérique.

Les tissus drainés par la veine porte (TDVP) regroupent les tissus drainés par la veine mésentérique plus le rumen et le tube digestif distal. D'autres organes, non présent sur la figure, comme le pancréas, la rate et le tissu adipeux mésentérique et omental font également partie des tissus drainés par la veine porte.

Le sang efférent du rumen est drainé par la veine ruminale et le sang efférent du tube digestif distal est drainé par la veine iléocæcale. Ces deux vaisseaux se regroupent avec la veine mésentérique pour former la veine porte. La veine porte chez les ruminants a la particularité d'être très courte (4-5 cm chez le mouton).

Enfin **les tissus splanchniques (TS)** regroupent les tissus drainés par la veine porte et le foie. Le sang afférent est artériel et le sang efférent s'écoule par les veines sus-hépatiques qui ne sont pas externalisées au niveau du foie et qui se jettent séparément dans la veine cave.

1.1.2.1. Préparations chirurgicales

La pose des cathéters en amont et en aval d'un compartiment tissulaire est fortement dépendante de la physiologie vasculaire et est spécifique à chaque espèce. La physiologie vasculaire splanchnique chez le ruminant est présentée en Figure 7. En préalable, la concentration artérielle en nutriments étant identique quelle que soit l'artère considérée, le choix du site artériel à cathétériser est indépendant des tissus d'intérêt. Une cathétérisation de l'aorte (ou d'une artère mésentérique) (Ortigues-Marty et coll., 1994) est généralement pratiquée.

Concernant le tube digestif, la physiologie vasculaire permet de différencier deux groupes tissulaires : les tissus drainés par la veine mésentérique et les tissus drainés par la veine porte (TDVP). Les tissus drainés par la veine mésentérique sont composés de la caillette, du duodénum, de l'iléon et du tissu adipeux mésentérique. Les TDVP sont composés des tissus drainés par la veine mésentérique plus le rumen, l'aire distale du tube digestif, le pancréas, la rate, des tissus adipeux (Seal & Reynolds, 1993). Des études comparatives au niveau des TDVP et des tissus drainés par la veine mésentérique (MacRae et coll., 1997b ; Rémond et coll., 2003) permettent de mieux comprendre l'utilisation et l'absorption des nutriments par les différentes parties du tube digestif, et en particulier le rumen et le tube digestif distal.

Le foie a la particularité de recevoir deux sources sanguines afférentes : la veine porte (**VP**) et l'artère hépatique (**A**) alors que les veines sus-hépatiques (**VSH**) sont les seules voies efférentes du foie. La compartimentalisation du métabolisme hépatique entre les différents lobes est supposée ne pas influencer la composition du sang drainé par les différentes VSH. Par conséquent, seule la pose de trois cathéters est nécessaire pour mesurer le bilan net en nutriment au niveau hépatique : A, VP et VSH.

1.1.2.2. Mesure des débits sanguins

Deux techniques sont principalement utilisées pour la mesure des débits sanguins dans un vaisseau (Huntington et coll., 1990).

La première est une méthode de dilution. Elle consiste à perfuser un marqueur non métabolisé par les tissus d'intérêt et de mesurer la concentration de ce marqueur (acide para-amino hippurique: PAH (Katz & Bergman, 1969, Ortigues-Marty et coll. 1994), ou vert d'indocyanine (Cherrick et coll., 1960; Leevy et coll., 1962, Wester et coll. 2000)) au niveau afférent et efférent. Pour mesurer les débits au niveau splanchnique, le marqueur est infusé au niveau d'une (ou deux) veines mésentériques et les prélèvements sont réalisés en amont (artère) et en aval (veine porte et

veine sus-hépatique) du site de perfusion (Huntington, 1984 ; Isserty & Ortigues, 1994 ; Blouin et coll., 2002).

La seconde méthode est basée sur la débitmétrie ultrasonique. Elle nécessite la pose par chirurgie d'une sonde ultrasonique placée autour du vaisseau dont on veut mesurer le débit (Huntington et coll., 1990). Cette méthode a prouvé sa fiabilité pour mesurer les débits de sang en veine porte (Rémond et coll., 1998) et est donc très utilisée lors de l'étude des bilans TDVP chez le mouton. Chez les bovins, la taille de l'animal rend la pose de ce type de sondes délicate. En l'absence d'une artère hépatique bien individualisée chez le ruminant, la pose d'une sonde débitmétrique sur l'artère hépatique est impossible. Dans ce cas, le débit artériel peut être estimé à partir du débit en veine porte (ex : 5,3% du débit porte pour Barnes et coll., 1986 ; Majdoub et coll., 2003). Cette contribution est supérieure (10% environ) chez les bovins (Reynolds, 2006). Une étude bibliographique exhaustive et quantitative (réalisée par méta-analyse) a montré que la contribution du débit de l'artère hépatique au débit hépatique global n'était pas modifiée avec l'ingéré (Vernet et coll., 2005).

1.1.2.3. Mesure des concentrations plasmatiques en AA

Etant donné que le bilan net en nutriments est obtenu par différence entre au moins deux concentrations multipliée par un débit numériquement élevé, une précision dans les mesures de concentrations en nutriments est nécessaire afin d'obtenir des bilans les plus précis possibles.

Les méthodes classiques utilisant la séparation des AA en chromatographie liquide et la détection des AA à la ninhydrine (Qureshi & Qureshi 1989) ont habituellement une reproductibilité de la méthode de 1 à 4%. Dans le cas de ces techniques, un seul standard interne (la norleucine par exemple) est utilisé pour l'ensemble des AA du chromatogramme, ce qui suppose que l'ensemble des AA a un comportement identique à celui de la norleucine lors de l'extraction des AA de l'échantillon et de la réaction à la ninhydrine. Plus récemment, des méthodes de dilution isotopique ont été développées (dosages des AA par spectrométrie de masse) et ont permis d'améliorer la reproductibilité de la méthode (Calder et coll., 1999) (de l'ordre de 0,5 à 1% selon les AA considérés) (Annexe 4). Un grand avantage de cette technique est que chaque AA dosé possède son propre standard interne. Aucune donnée sur la répétabilité et la justesse concernant ces deux méthodes n'est détaillée dans la littérature et ces valeurs mériteraient d'être déterminées.

Les méthodes de bilans artério-veineux permettent donc de mesurer l'utilisation nette d'un certain nombre de nutriments dans l'organisme au niveau d'un tissu ou groupe de tissus.

Cependant, un bilan ne sera fiable que si une différence de concentrations en nutriments obtenue entre la sortie et l'entrée d'un tissu est supérieure à l'incertitude associée à la mesure. Par exemple, le calcul du bilan net hépatique en protéines plasmatiques est difficile à mesurer car les concentrations en protéines sont très élevées dans le plasma relativement à la différence de concentration observée entre la veine porte et l'artère d'une part et la veine sus hépatique d'autre part.

De plus, les données obtenues par bilans nets ne donnent aucune indication directe sur le devenir des composés azotés, et en particulier les AA, c'est-à-dire leur utilisation dans le métabolisme protéique (synthèse et dégradation), le catabolisme ou d'autres voies métaboliques. Pour décrire les différentes voies d'utilisation des AA au sein de l'organisme entier ou d'un tissu ou groupe de tissus, des méthodes d'exploration du métabolisme des AA alternatives ou complémentaires aux bilans nets sont nécessaires.

1.2. Méthodes de mesure de la synthèse/dégradation des protéines et oxydation des AA

Ces approches nécessitent l'utilisation d'AA marqués à l'aide d'isotopes stables (^{13}C, ^{2}H, ^{15}N) ou d'isotopes radioactifs (^{3}H, ^{14}C, ^{35}S). Ces molécules marquées sont administrées au préalable puis leur radioactivité spécifique (**AS**, pour les isotopes radioactifs), ou enrichissement isotopique (**E**, pour les isotopes stables) sont mesurés au niveau des différents compartiments d'AA (Cayol, 1995 ; Savary, 1997).

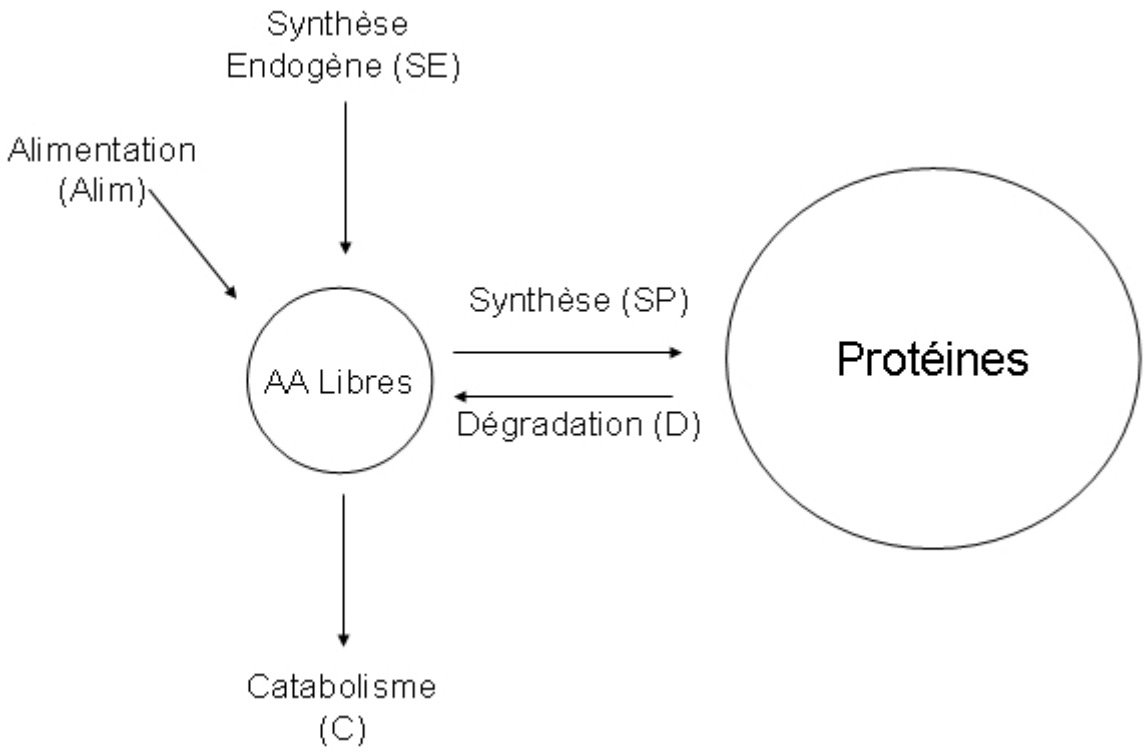
1.2.1. Au niveau du corps entier

Plusieurs méthodes permettent d'étudier le métabolisme des AA au niveau du corps entier (revues Waterlow et coll., 1978 ; Garlick & Fern, 1985 ; Reeds et coll., 1992). Cependant, la mesure des flux d'AA traceur au niveau du corps entier reste la méthode la plus utilisée dans de nombreuses espèces (Cayol, 1995). Le flux d'AA traceur est un débit métabolique, c'est-à-dire la quantité d'une substance donnée métabolisée par unité de temps. Dans le cas des AA, il s'agit de leur utilisation dans les principales voies du métabolisme protéique : synthèse et la dégradation protéique, catabolisme oxydatif.

La détermination des flux métaboliques est réalisée à partir d'une perfusion d'un AA marqué par un isotope à dose traceuse suivie de prélèvements de plasma, en général artériel. Les échanges corporels et tissulaires d'AA se situant en très grande majorité dans le compartiment plasmatique, les mesures au niveau sanguin sont très rarement réalisées (Lobley et coll., 1996a).

Lorsque l'AA traceur est administré par perfusion, son AS ou E augmente avec le temps jusqu'à l'obtention d'un plateau en quelques heures. Pour déterminer la synthèse, dégradation protéiques et le catabolisme oxydatif à partir de la mesure du flux traceur d'AA, un modèle à deux compartiments est utilisé : Le flux d'un AA traceur correspond à sa disparition du compartiment plasmatique. Dans ce modèle à deux compartiments, les AA sont considérés comme étant sous forme libres ou liés à des protéines (Figure 8). Le flux total F est égal à la somme des pertes : incorporation dans les protéines (SP) et catabolisme oxydatif (C). A l'état stationnaire, la somme des pertes est égale à la somme des apports : alimentation (Alim), dégradation des protéines (D) et, pour les AA non indispensables (**AANI**), synthèse endogène des ces AA (SE).

Figure 8 Représentation schématique du modèle à deux compartiments et mesure du flux corporel (F) d'un acide aminé (Cayol, 1995).



$$F = SP + C = D + A\lim + SE$$

Pour que ce modèle soit valide et que cette équation soit applicable, il faut :

1) que l'animal soit dans des états métabolique et nutritionnel stables pendant la durée de mesure (ce qui implique, pour les Ruminants à l'état nourri, un apport alimentaire régulier (toutes les heures))

2) que la molécule traceuse et la molécule tracée soient utilisées de la même manière dans les diverses voies métaboliques

3) que le compartiment précurseur soit un mélange parfait « molécule traceuse-molécule tracée »

4) que le traceur ne soit pas recyclé, c'est-à-dire qu'il ne revienne pas dans le compartiment initial au cours de la période de mesure. Ce dernier point est en grande partie résolu par l'emploi d'un AA indispensable (**AAI**) comme traceur.

Lorsqu'un AAI traceur est utilisé, le calcul est simplifié car SE est nul. F et C peuvent être mesurés et S est déduit par différence. Dans le cas des Monogastriques, le jeûne permet d'avoir A=0, ce qui implique F = D mais ceci est difficile à réaliser chez un Ruminant et dans ce cas A est délicat à estimer (Attaix et coll. 2005) (Annexe 1).

La phenylalanine et surtout la leucine (marqués au ^{13}C) sont les deux AAI les plus souvent utilisés pour les études de flux traceurs d'AA au niveau du corps entier. A partir de l'utilisation d'un seul AA traceur, de nombreux auteurs ont tendance à extrapoler les résultats de synthèse protéique et d'oxydation à l'ensemble des AA. Cependant, les valeurs de flux traceur et de ses composantes (synthèse protéique et oxydation) peuvent être différentes d'un AA à l'autre (Obled et coll., 1989, Lobley et coll., 1996a). Le choix de l'AA traceur est donc essentiel. Le site de prélèvement du traceur et le choix du compartiment précurseur de la synthèse protéique sont également importants lors de la détermination du flux traceur et de ses composantes (Cayol, 1995). Les calculs associés aux mesures des flux traceurs corporels d'AA sont détaillés en Annexe 1.

Cette mesure des flux traceurs d'AA présente cependant trois limitations majeures (Attaix et coll., 2005): 1) Les flux corporels sont difficiles à interpréter et aggrègent des modulations de synthèse, dégradation protéiques et oxydation en AA de divers tissus et organes 2) La technique sous-estime le turnover protéique et l'oxydation puisque l'enrichissement isotopique dans le plasma est très supérieur à celui dans les tissus (voir Annexe 2). 3) Il y a un recyclage du traceur dans les tissus à fort turnover (tube digestif et foie qui présentent une protéolyse importante). De plus, le taux et la durée de perfusion influencent le recyclage. Ce recyclage peut engendrer une sous-estimation du flux traceur.

1.2.2. Au niveau d'un tissu ou groupe de tissus

1.2.2.1. Mesure indirecte de la synthèse et dégradation protéique et oxydation sur tissus cathétérisés

Comme dans le cas des flux d'AA traceur mesurés au niveau du corps entier, la technique des bilans artério-veineux (décrits dans la **partie 1.1.2.**) associée à des perfusions de traceurs permet de suivre le devenir métabolique d'un nutriment au sein d'un tissu ou d'un groupe de tissus. En particulier, il est possible, dans le cas d'une perfusion d'un AA marqué, de mesurer la synthèse et dégradation protéique ainsi que l'oxydation (si utilisation d'un AA ^{13}C) au sein d'un tissu cathétérisé. Les limites de ce type d'approche restent les mêmes que celles détaillées pour les flux d'AA traceurs au niveau du corps entier (voir partie **1.2.1.**) auxquelles s'ajoutent les limites des techniques des bilans artério-veineux. Cette approche est très utilisée chez l'homme (avant bras) (Barrett & Gelfand, 1989; Hoskin et coll., 2001), chez le porc (aire splanchnique et en particulier TDVP) (Stoll & Burrin, 2006) et les ruminants (aire splanchnique, mamelle, patte arrière) (Lobley et coll., 1996a ; Connell et coll., 1997 ; Lapierre et coll., 1999 ; Savary et coll., 2001b) car elle permet de mesurer simultanément *in vivo* accrétion, synthèse et dégradation protéique (voire l'oxydation selon le tissu et le traceur utilisé) au niveau d'un tissu ou d'un groupe de tissus.

Enfin, dans le cas du tube digestif, si une perfusion intraveineuse d'un AA marqué est associée à une perfusion du même AA par voie entérale (avec un marquage différent s'il s'agit de co-infusion) chez des animaux cathétérisés au niveau des TDVP, l'utilisation de l'AA provenant de l'influx artériel peut être discriminée d'une utilisation entérale par ces tissus (ex : utilisation de la lysine par les TDVP chez le porcelet, Bos et coll., 2003 ; utilisation du glucose, glutamate et glutamine par les TDVP chez le porc, Van der Schoor et coll., 2001 ; utilisation d'un mélange d'AAI par les TDVP du mouton, MacRae et coll., 1997a). La perfusion intragastrique d'AA marqués permet de déterminer également, sur animaux cathétérisés au niveau hépatique, l'utilisation préférentielle d'AA provenant directement de l'absorption digestive (1er passage) ou d'AA d'origine systémique (Stoll et coll., 1997 et 1999b). Enfin, même sans avoir recours à des cathétérisations, les flux traceurs d'AA au niveau du corps entier mesurés suite une infusion par voie entérale et intraveineuse d'AA marqués, permettent de calculer l'extraction splanchnique globale (au 1er passage) des AA alimentaires (Fouillet et coll., 2002).

1.2.2.2. Mesure directe de la synthèse protéique par prélèvement tissulaire

- In vivo

La méthode de perfusion continue de traceur, précédemment décrite pour la mesure du flux d'AA traceur au niveau du corps entier ou des tissus cathétérisés peut également être utilisée directement sur un tissu prélevé sur l'animal. Les calculs sont toujours basés sur le modèle à deux compartiments (Figure 8). En revanche, la synthèse protéique n'est pas déduite de l'oxydation mais mesurée directement dans les protéines du tissu d'intérêt. Ainsi, l'enrichissement des protéines tissulaires est mesuré sur le tissu désiré après biopsie (Lobley et coll., 1990 ; Wester et coll., 2004) ou abattage (Garlick et coll., 1980). La vitesse fractionnaire (% / jour) ou absolue (g de protéines synthétisées / jour) de synthèse protéique tissulaire est ainsi mesurée. Chez des animaux en croissance, par différence entre le gain protéique du tissu d'intérêt (lorsqu'il peut être mesuré sur plusieurs jours) et la synthèse protéique, la dégradation protéique peut également être calculée (Attaix et coll., 2005).

Le prélèvement tissulaire par biopsie présente l'avantage (chez les Ruminants ou Monogastriques de grande taille) de pouvoir utiliser un même animal pour différents traitements et de réduire ainsi la variabilité liée aux animaux (Lobley et coll., 1990). Cependant, elle est limitée à certains tissus (muscle, peau ou tissu adipeux essentiellement) et se doit d'être représentative du tissu étudié (tissu homogène).

Lorsque la méthode de perfusion continue de traceur est utilisée, la difficulté réside dans le choix du compartiment précurseur de la synthèse protéique, surtout pour les tissus à turnover rapide (Annexes 2A et 2B). Une méthode alternative à la méthode de perfusion, la méthode de surcharge, permet de résoudre cette question car elle consiste à injecter rapidement une grande quantité d'AA en dose unique à un enrichissement connu qui inonde les compartiments précurseurs de la synthèse protéique. Cette méthode particulière d'injection de l'AA marqué permet à l'AS ou l'E d'atteindre rapidement le plateau voulu et d'obtenir des AS ou E au niveau plasmatique et tissulaire quasiment similaires et proches du compartiment précurseur « vrai » (acides aminés liés aux ARN de transfert : aminoacyl-ARNt) (Attaix et coll., 2005) (Annexes 2 et 3).

Le choix de l'une ou l'autre de ces deux méthodes d'administration de l'AA marqué (perfusion ou surcharge) n'est pas anodin. En effet, Obled et coll. (1989) ont montré que les vitesses de synthèse corporelle et tissulaires peuvent être différentes selon la méthodologie employée. De plus, le choix de la méthode employée peut dépendre de ce que l'on veut mesurer. En effet, le foie est, par exemple, un tissu métaboliquement très actif qui secrète 30 à 50 % de ses protéines néosynthétisées dans la circulation sanguine. Par conséquent, la méthode de surcharge *in vivo* appliquée sur un animal abattu avant que celui-ci n'ait eu le temps de relarguer les protéines

néosynthétisées (c'est-à-dire avant 20-30 minutes après l'injection du traceur) (Savary, 1997), permet la mesure de la synthèse de l'ensemble des protéines constitutives et exportées. Par contre, lorsque la méthode de perfusion d'un AA à dose traceuse (plusieurs heures de perfusion) est employée pour mesurer la synthèse protéique hépatique, il est possible de mesurer la synthèse des protéines exportées dans le plasma (mesure de l'E ou AS de l'AA marqué dans les protéines plasmatiques, essentiellement d'origine hépatique) ou la synthèse des protéines constitutives hépatiques (mesure de l'E ou AS de l'AA marqué dans les protéines hépatiques constitutives; la part des protéines néosynthétisées et destinées à l'export présentes dans le foie étant négligeable) (Savary, 1997 ; Savary et coll., 1998).

- *In vitro*

Les systèmes d'incubation *in vitro* sont également beaucoup utilisés dans la littérature pour étudier le devenir des AA dans le muscle (Bonen et coll., 1994) et le foie (Berry & Friend 1969 ; Forsell et coll., 1985 ; Ali et coll., 2000). Ils sont en effet relativement faciles à mettre en place, ont un coût moindre, et permettent un contrôle de l'environnement en nutriments et hormones des cellules étudiées (via une maîtrise du milieu d'incubation qui, à l'inverse, est souvent complexe et difficile à maîtriser *in vivo*). Des cellules ou explants tissulaires provenant du tube digestif, du foie et du muscle ont été ainsi utilisés. Dans tous les cas, l'incorporation d'un AA marqué dans les protéines tissulaires par ajout à dose traceuse (Skjaerlund et coll., 1988) ou par surcharge (Dardevet et coll., 1994) est mesurée et la vitesse de synthèse protéique est calculée (Annexe 3). Dans le cas des études *in vitro*, les AA radiomarqués (AA [^{14}C], méthionine [^{35}S]) sont plus souvent utilisés que les AA marqués par des isotopes stables en raison de leur coût relativement moindre et du dosage rapide de leur incorporation dans les protéines (un compteur béta suffit et le matériel de spectrométrie de masse n'est pas nécessaire). Enfin, alors que la protéolyse dans des muscles incubés *in vitro* peut être estimée par relargage de tyrosine dans le milieu d'incubation (Dardevet et coll., 1996), aucune méthode ne semble largement utilisée pour la mesure de la protéolyse dans les tissus hépatiques ou digestifs en culture.

La sensibilité et la réponse des cellules ou tissus incubés *in vitro* aux nutriments et hormones peuvent cependant être différents de ce qui est obtenu *in vivo*. Ainsi, dans les études *in vitro*, les cellules ou explants expriment un potentiel qu'il convient de confronter aux données obtenues *in vivo*.

1.2.2.3. Approches non quantitatives

Dans le cas de la synthèse protéique, bien qu'une partie de la régulation de la synthèse de protéines particulières ait lieu au niveau transcriptionnel, beaucoup d'ARN messager (**ARNm**) sont également sujet à des régulations traductionnelles. De plus, la quantité d'ARNm dépend de la transcription mais aussi de la dégradation des ARNm (Attaix et coll., 2005). Par conséquent, il existe un décallage important entre l'expression les ARNm et les protéines (et activités) correspondantes. Il n'existe donc pas d'index simple reconnu comme fiable de l'activité de synthèse des protéines *per se* au niveau corporel ou tissulaire. Seule la capacité ribosomale (c'est-à-dire le rapport entre les ARN totaux (essentiellement ribosomaux) et les protéines d'un tissu) donne une indication des la capacité de traduction au sein des cellules (Mosoni et coll., 1993 a et b ; Savary, 1997) mais ne présage pas de l'activité réelle et régulée des ribosomes. Le processus de traduction des ARNm en protéines est en effet régulé par des interactions complexes entre facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison.

Dans la cellule, plusieurs voies protéolytiques cohabitent : voie lysosomale, calcium dépendante et ubiquitine-protéasome dépendante (Attaix et coll., 1999). Le rôle de chacun de ces systèmes protéolytiques est variable selon les tissus et organes (voie lysosomale prédominante dans le foie, voie ubiquitine-protéasome dépendante prédominante dans le muscle). A la différence de la synthèse protéique, une corrélation plus forte existe entre l'expression de certains gènes impliqués dans ces voies protéolytiques et l'activité réelle de cette voie (Attaix & Taillandier, 1998) même si ce n'est pas toujours le cas (Combaret et coll., 2002). L'expression de nombreux gènes impliqués dans ces voies (ubiquitine, enzymes d'ubiquitination, m-calpaïne, μ calpaïne par exemple) est donc fréquemment mesurée dans la littérature chez le monogastrique (Attaix & Taillandier, 1998) et le ruminant (Larbaud et coll., 1996). La quantification des ARNm de gènes impliqués dans les voies protéolytiques peut être complétée par la quantification de certaines enzymes d'ubiquitination ou sous unités du protéasome, le taux d'ubiquitination des substrats à dégrader ou l'activité de certaines unités du protéasome (Attaix et coll., 2005). L'étude de la protéolyse par ces approches non quantitatives est fréquemment utilisée car il n'existe pas de méthode réellement fiable de mesure de la protéolyse *in vivo* utilisant ou non des AA marqués. Enfin, l'activité de certaines enzymes intervenant dans le catabolisme de certains AA (comme les AACR) ont été étudiés chez les ruminants (Papet et coll., 1988).

Bien que présentant des limites (les taux d'ARNm de gènes ne sont qu'un index de l'activité de voies métaboliques et non une mesure directe et quantitative de l'activité de la voie), ces approches non quantitatives sont intéressantes, en particulier chez les animaux de grande taille,

car ils apportent une méthode alternative à l'utilisation des traceurs qui peuvent représenter un coût prohibitif.

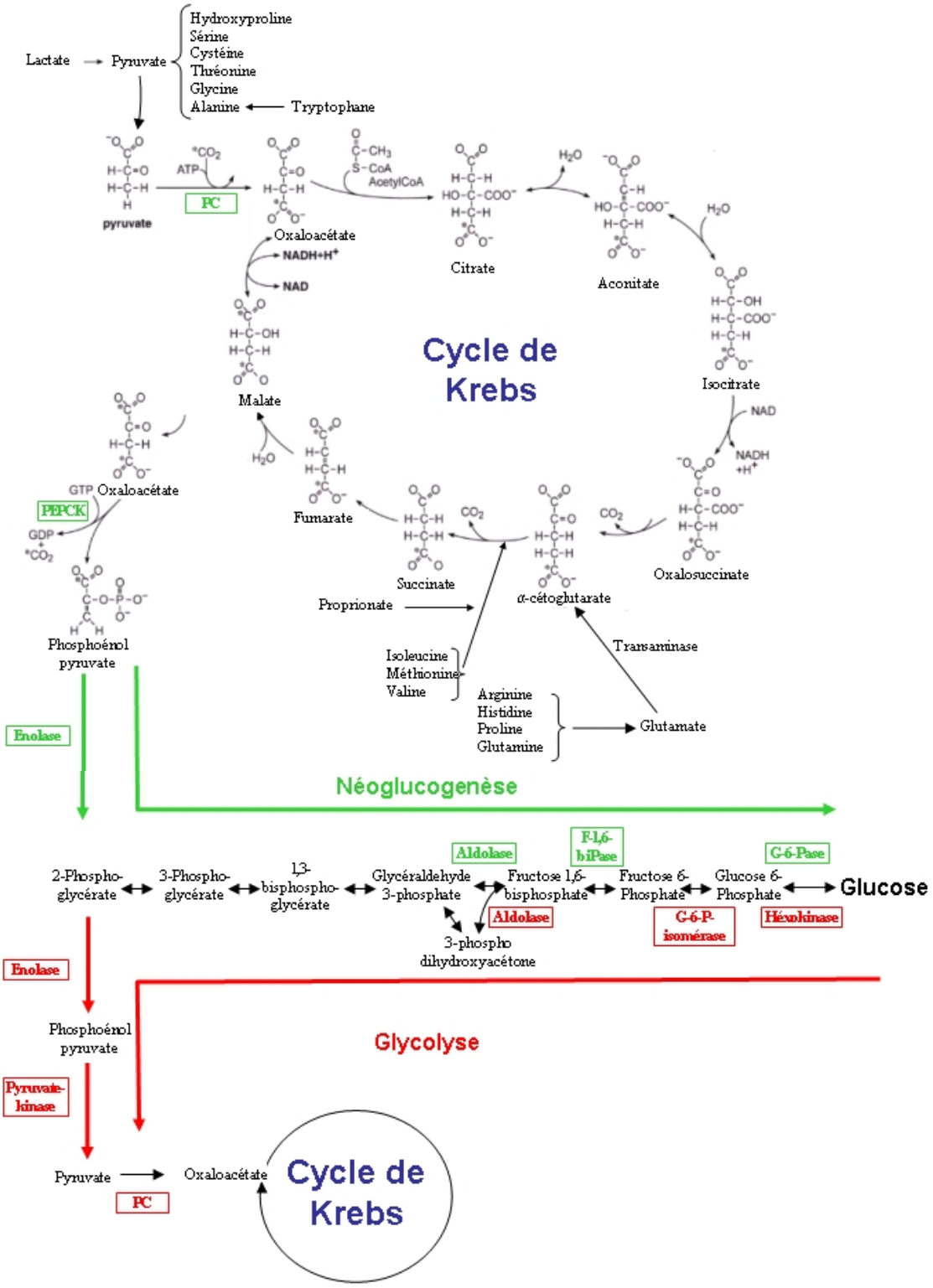
De nombreuses méthodes directes ou indirectes de mesure de l'utilisation des AA vers la protéosynthèse, la protéolyse et l'oxydation sont à disposition des expérimentateurs. Il faut cependant être conscient que si ces techniques sont plus informatives que les bilans nets en terme de devenir métabolique des AA, elles présentent certaines limites (comme développé plus haut) et nécessitent surtout une réflexion préalable concernant le choix : de la molécule marquée employée (AAI ou AA non indispensables (AANI)), de la position de marquage, du type de marquage (^{13}C vs ^{2}H en particulier), du site d'injection et de prélèvement pour les mesures d'AS ou E, du type d'injection employé (perfusion vs surcharge), du moment de prélèvement relativement au début de la perfusion ou injection, des conditions de validité des modèles compartimentaux employés pour estimer les flux traceur (comme les états physiologique et nutritionnel stables de l'animal). Une erreur dans ces choix a des répercussions sur la validité de mesure (voire même la possibilité de calculer) l'activité des voies métaboliques d'intérêt.

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction, cette revue bibliographique se concentre essentiellement sur l'utilisation splanchnique des nutriments azotés, et en particulier des AA. Or, si la synthèse protéique, la protéolyse et l'oxydation des AA sont des phénomènes métaboliques constatés dans de nombreux tissus et organes, deux autres voies métaboliques sont plus spécifiques à certains tissus splanchniques et notamment au foie comme la néoglucogenèse (essentiellement dans le foie mais aussi dans le rein) et l'uréogenèse (exclusivement dans le foie). L'étude de ces deux voies a fait l'objet de nombreux travaux *in vivo* et *in vitro*. Les méthodes utilisées pour mesurer l'activité de ces deux voies sont donc présentées.

1.3. Méthodes d'étude de la néoglucogenèse

La néoglucogenèse chez les ruminants est un utilisateur potentiel d'AA important. En effet, les ruminants ont des besoins en glucose proches de ceux du monogastriques mais en absorbent peu (Majdoub, 2002). La synthèse *de novo* de glucose chez le ruminants a lieu essentiellement dans le foie (environ 75-90%) (Ortigues-Marty et coll., 2003a) à partir de précurseurs variés : propionate, AA, lactate, pyruvate, glycérol (Figure 9).

Figure 9 Voie de la néoglucogenèse (d'après Nuttal et coll., 2008)



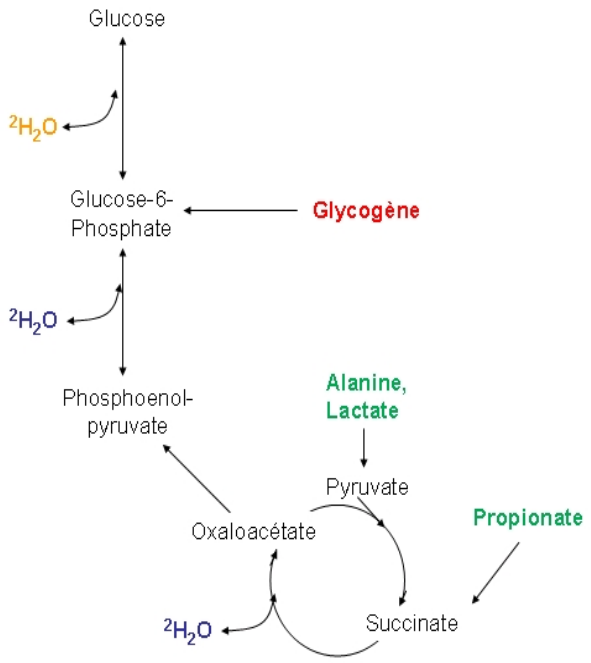
PC : Pyruvate carboxylase
PEPCK : Phosphoénol pyruvate carboxykinase
F-1,6-biPase = Fructose 1,6 bisphosphatase
G-6-Pase : Glucose 6 phosphatase

1.3.1. Quantité de glucose néosynthétisé

La production nette de glucose par le foie est estimée par la méthode des bilans artério-veineux (Goetsch et coll., 1994 ; Maltby et coll., 2005). Cependant, le bilan net en glucose est la résultante de la néoglucogénèse, de l'utilisation du glucose par les hépatocytes, notamment son incorporation dans le glycogène, et de l'émission de glucose par glycogénolyse. Chez l'humain, le jeûne peut limiter la contributions de la glycogénolyse hépatique et donc d'affiner la mesure de la néoglucogenèse (Wahren et coll., 1977) mais ce n'est pas réalisable chez le Ruminant.

Pour estimer plus précisément la quantité de glucose néosynthétisé, l'utilisation de molécules marquées est nécessaire (Halliday & Bodamer, 1997). L'infusion d'eau deutérée (**^2H_2O**) (Chandramouli et coll., 1997) peut permette de connaître la contribution de la néoglucogenèse à la production totale de glucose en comparant l'enrichissement du glucose plasmatique sur l'hydrogène du carbone 5 avec l'enrichissement sur le carbone 2. En effet, la présence de ^2H sur le carbone 5 ne peut être due qu'à la néoglucogenèse alors que la présence de ^2H sur le carbone 2 peut être liée à l'incorporation de ^2H_2O via la néoglucogenèse ou la glycogénolyse (Landau et coll., 1995 ; Chandramouli et coll., 1997) (Figure 10).

Figure 10 Mesure de la néoglucogenèse à partir d'infusion de ^2H_2O (d'après Landau et coll. 1995).



Les précurseurs de la néoglucogenèse (en vert) empruntent tous la voie de néoglucogenèse via l'oxaloacetate.
Le glycogène (en rouge) est scindé en glucose-6-P pour donner du glucose.

En orange est présentée la voie d'incorporation du deutérium sur le carbone 2 du glucose : toutes les molécules de glucose produites (issues du glycogène ou de la néoglucogenèse) seront marquées sur le carbone 2.

En bleu sont les différents sites d'incorporation du deutérium sur le carbone 5 du glucose : seules les molécules de glucose issues de la néoglucogenèse seront marquées sur l'hydrogène lié à ce carbone.

^2H_2O : eau deuterée

La perfusion de glucose marqué et la mesure de l'enrichissement en différents isotopomères qui en résulte permettent également d'accéder à la mesure de la néoglucogenèse hépatique. Une technique utilisée chez l'Homme consiste à infuser du glucose uniformément marqué sur les carbones (U-^{13}C) et de mesurer, après équilibre des enrichissements dans les divers compartiments,

l'enrichissement en ^{13}C des différents carbones du glucose (isotopomères M+3 et M+6 en particuliers) (Tayek & Katz 1996 ; Landau et coll., 1998 ; Kelleher, 1999). Cette méthode fait appel à de nombreux calculs de probabilités et suppose que le glucose plasmatique peut être utilisé pour la glycogénogenèse ou subir une dégradation via la glycolyse ou la voie des pentoses phosphate aboutissant à la formation de lactate (Reeds et coll., 1997). Ce lactate est ensuite transformé en phosphoenol pyruvate puis en glucose.

Ces méthodologies, utilisées *in vivo* et *in vitro*, présentent chacune des limites méthodologiques qui font encore actuellement l'objet de débats (Nuttall et coll., 2008 ; Wahren & Ekberg, 2007 ; Reeds et coll., 1997). Ces limites concernent principalement la mesure précise de l'enrichissement du (ou des) précurseur(s) de la néoglucogenèse et de la perte de carbones dans le métabolisme intermédiaire (cycle de Krebs). Les études sur Ruminants utilisent principalement la méthode des bilans nets et les méthodologies utilisant les molécules marquées sont actuellement peu utilisées pour mesurer la néoglucogenèse chez ces espèces (Bequette et coll., 2006), probablement à cause d'un manque de consensus concernant une méthode de référence pour étudier, avec des molécules marquées, la néoglucogenèse hépatique.

1.3.2. Contribution des différents précurseurs à la néoglucogenèse

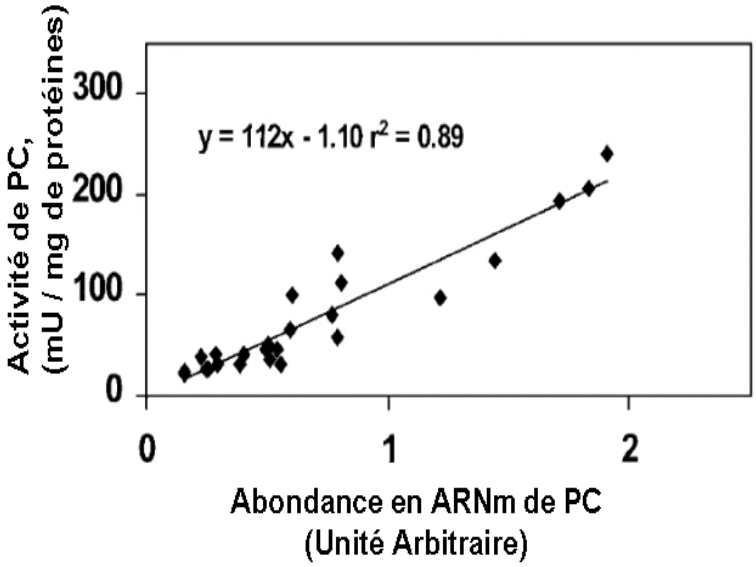
La production nette de glucose mesurée par bilan artério-veineux, associée à la mesure de l'utilisation nette hépatique de ses divers précurseurs (propionate, AA, lactate, pyruvate, glycérol) permet le calcul de la contribution potentielle maximale de chaque précurseur à la production nette de glucose (Wahren et coll., 1977 et 1981 chez l'Humain, Goetsch et coll., 1994 et 1997; Reynolds et coll., 1992a et 1994a; Majdoub et coll., 2003 chez les Ruminants). Toute contribution potentielle d'un précurseur est sur-estimée par rapport à sa contribution réelle car elle ne tient pas compte de l'utilisation de ce précurseur dans d'autres voies métaboliques. La détermination de la contribution réelle de chaque précurseur nécessite l'utilisation de précurseurs marqués. Le choix de la molécule perfusée et de la position du marquage est essentiel (Overton et coll., 1999). Des perfusions de U-^{13}C glucose (suivies de l'analyse des isotopomères) ou de précurseurs du glucose (AA, glycerol, lactate) ont été utilisées *in vivo* et *in vitro*. Ces méthodes, consistant à suivre un précurseur particulier, s'approchent de l'estimation de la contribution réelle de ce précurseur à la synthèse de glucose sont plus précises que les méthodes de bilans nets. Cependant, pour des raisons similaires et liées à la mesure du métabolisme du glucose avec des traceurs, ces méthode sont toutes sujettes à limitations et très peu utilisées chez le Ruminant (mesure de l'enrichissement du précurseur délicate, recyclage de molécules marquées dans les cellules et des carbones marqués dans les molécules tracées, randomisation isotopique dans le cycle de Krebs au niveau du passage fumarate-

malate) Ces pertes sont aussi variables selon les quantités perfusées et le temps de perfusion ainsi qu'au marquage de traceur utilisé (Reeds et coll., 1997 ; Wahren & Ekberg, 2007 ; Nuttall et coll., 2008 ; Danfaer et coll., 1995).

1.3.3. Approches non quantitatives

Etant donnée la difficulté de quantifier précisément la néoglucogenèse *in vivo*, de nombreux auteurs ont mesuré les taux d'ARNm, de protéines ou les activités d'enzymes limitantes de la néoglucogenèse hépatique. La Phosphoenolpyruvate carboxykinase (**PEPCK**), la Glucose-6-phosphatase (**G6Pase**), la Fructose 1-,6-bisphosphatase (**F-1,6-biPase**) et la Pyruvate carboxylase (**PC**) ont été particulièrement étudiées (Postic et coll., 2004; Velez & Donkin, 2005; Burgess et coll., 2007). L'activité de ces enzymes est considérée comme un bon indicateur de l'activité néoglucogénique (Velez & Donkin, 2005) et dans le cas de certaines de ces enzymes, l'activité est fortement corrélée à la quantité d'ARNm (exemple : PC : Figure 11).

Figure 11 Pyruvate carboxylase (PC) hépatique : Relation entre son activité et sa quantité d'ARNm (d'après Greenfield et coll., 2000)



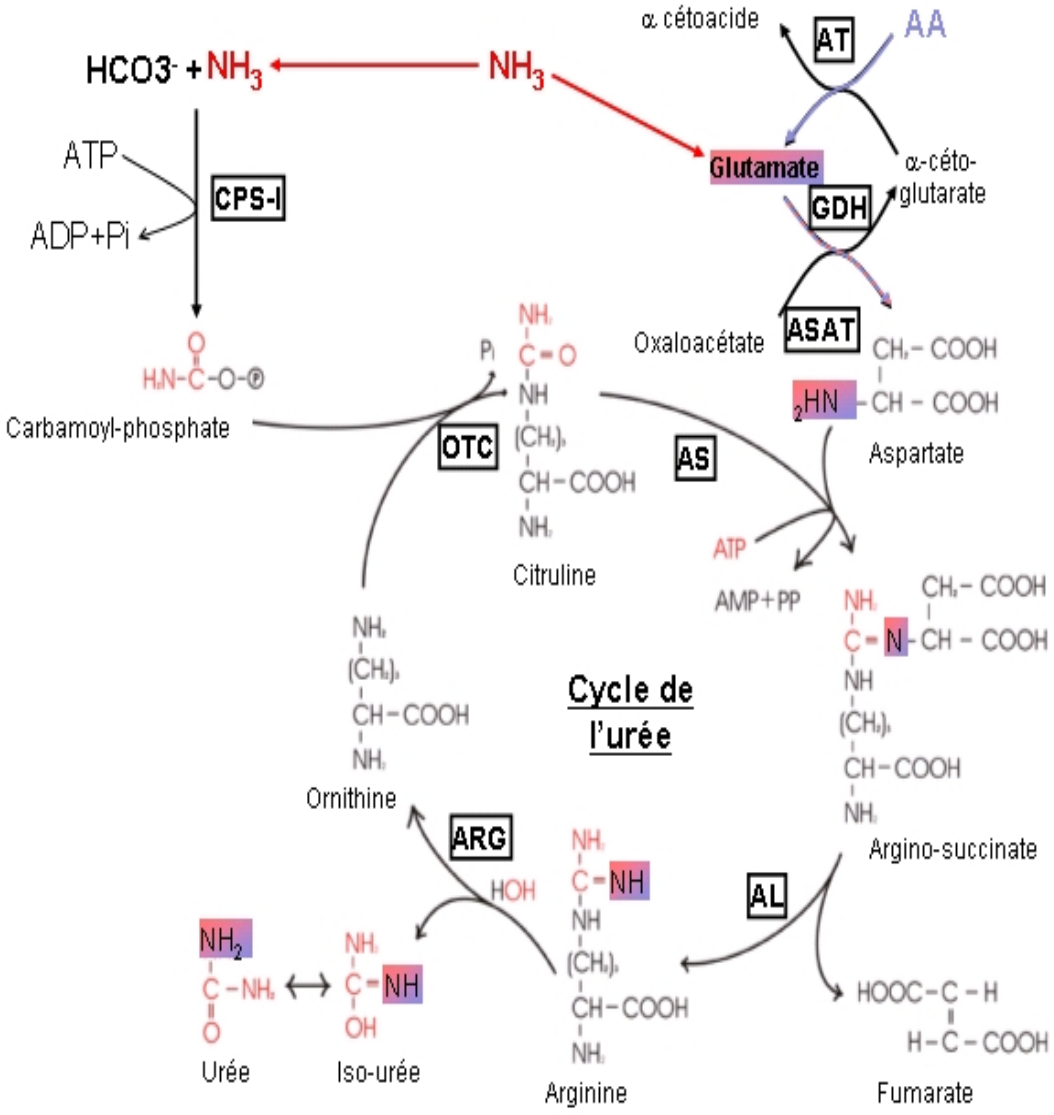
1.4. Méthodes d'étude de l'uréogenèse

1.4.1. Synthèse d'urée par le foie et recyclage

L'uréogenése hépatique est associée à la détoxification de l'ammoniaque et à l'oxydation des AA. Le cycle de l'urée est présenté en Figure 12. Le captage de l'azote (sous forme d'AA et d'ammoniaque) et sa conversion en urée se font à partir du carbamoyl phosphate ou de l'aspartate, comme cela a été montré dans des études utilisant des molécules marquées au ^{15}N (Jahoor et coll., 1988 ; Geissler et coll., 1996 cités par Milano, 1997). Grâce à l'utilisation d'animaux cathétérisés au niveau hépatique, les bilans nets en urée et en ses précurseurs (ammoniaque, AA) peuvent être

mesurés (Lapierre & Lobley, 2001 ; Lapierre et coll., 2005). La quasi totalité de l'ammoniaque prélevé par le foie étant théoriquement transformée en urée, l'azote uréique émis en excès par le foie provient des AA et la contribution potentielle de l'azote provenant des AA à la synthèse d'urée peut être calculée.

Figure 12 Cycle de l'urée et enzymes clés

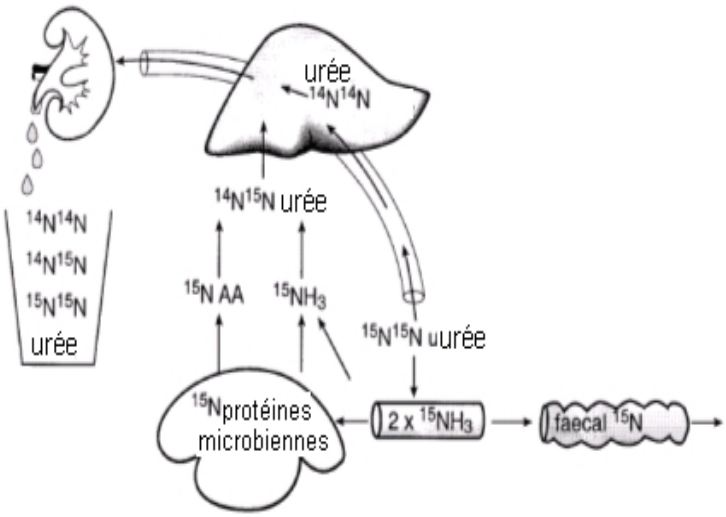


Enzymes associés au cycle de l'urée.

- Carbamoyl-Phosphate Synthase (CPS I)
- Ornithine transcarbamylase (OTC)
- Arginosuccinate synthase (AS)
- Arginosuccinate lyase (AL)
- Arginase (ARG)
- Glutamate Deshydrogénase (GDH)
- Aspartate Amino Transférase (ASAT)
- Amino Transférase (AT)

Pour mesurer directement la synthèse d'urée, l'emploi de traceurs s'est également développé ces dix dernières années. Les premières études ont consisté en la perfusion en veine jugulaire d'urée marquée (urée [^{15}N]) qui ont permis d'estimer l'activité d'uréogenèse ainsi que l'urée transférée dans l'ensemble du tube digestif ou le rumen (Nolan & Leng, 1972). Les flux traceurs d'urée au niveau du corps entier peuvent également être déterminés par perfusion d'urée [^{14}C] en veine jugulaire (Milano et coll., 2000). Enfin, l'infusion en veine jugulaire d'urée uniformément marquée sur les deux azotes ([$^{15}N^{15}N$] urée) associée à l'analyse des différents isotopomères de l'urée ([$^{15}N^{15}N$], [$^{15}N^{14}N$] et [$^{14}N^{14}N$]-urée) formés et l'ammoniaque [^{15}N] éliminé dans l'urine et les fécès s'est développée pour quantifier la production et le recyclage de l'urée (Sarraseca et coll., 1998 ; Lapierre & Lobley, 2001). Cette dernière méthodologie est simple (perfusion d'urée marquée et collecte des excrétats) et présente l'avantage de donner des informations sur le devenir de l'urée recyclée dans le tube digestif (Figure 13).

Figure 13 Perfusion d'urée [$^{15}N^{15}N$] et analyse des isotopomères [$^{14}N^{14}N$], [$^{15}N^{14}N$] et [$^{15}N^{15}N$] dans l'urée urinaire pour quantifier le devenir de l'urée entrant dans le tube digestif (recyclage). (d'après Lapierre & Lobley, 2001) .



Une partie de l'urée [$^{15}N^{15}N$] infusée entre dans le tube digestif et est hydrolysée en ammoniaque [^{15}N]. Cet ammoniaque peut être utilisé par les bactéries pour leur synthèse de proteines (qui seront ensuite absorbées sous forme d'acides aminés [^{15}N]) ou être directement absorbé sous forme d'ammoniaque [^{15}N].
Ce dernier est détoxifié par le foie pour donner de l'urée [$^{15}N^{14}N$]. Le ratio entre l'urée [^{15}N :^{14}N] et l'urée [$^{15}N^{15}N$] dans l'urine reflète donc la proportion du flux d'urée qui est recyclé dans le tube digestif, convertie en ammoniaque et qui retourne vers le foie pour être détoxifiée à nouveau en urée.

1.4.2. Méthodes non quantitatives

L'urée est synthétisée dans un cycle composé de cinq enzymes (lcycle de l'urée : Figure 12). Les deux premières enzymes : carbamoyl phosphate synthase 1 (**CPS-I**) et ornithine transcarbamoylase (**OTC**) sont situées dans la matrice mitochondriale alors que les trois autres enzymes : arginosuccinate synthase (**AS**), arginosuccinate lyase (**AL**) et arginase (**ARG**) sont présentes dans le cytosol (Takiguchi & Mori, 1995 ; Milano, 1997). La production d'urée est souvent corrélée avec l'activité et l'expression des ARNm de ces enzymes (Takiguchi & Mori, 1995 ; Tillman et coll., 1996). Cependant, il existe parfois un décallage entre l'activité des enzymes et leur expression (ARNm) (Tagaki et coll., 2008). De plus, l'AS est considérée comme l'enzyme la moins active (et donc limitante) du cycle chez la chèvre (Ide & Shimbayashi, 1968) alors que la CPS-I est l'enzyme la moins active chez le veau (Tagaki et coll., 2008). Par conséquent, comme aucune enzyme ne semble clairement limitante dans le cycle de l'urée, l'ensemble des enzymes (activité, quantité et ARNm) est en général étudié (Tagaki et coll., 2008 ; Bush et coll., 2003).

L'uréogenése et le recyclage de l'urée sont actuellement bien connus chez les Ruminants et les méthodologies pour les mesurer bien maîtrisées (bilans artério-veineux, perfusion d'urée [^{15}N-^{15}N]). Par contre, concernant la néoglucogenèse, à part la détermination de la contribution des précurseurs à la production nette de glucose hépatique par bilans artério-veineux (très utilisé chez les Ruminants), aucune méthodologies plus précise n'est utilisée chez le Ruminant et les méthodes utilisant les traceurs pour mesurer directement la néoglucogenèse sont encore en cours d'optimisation chez les Monogastriques.

2. Absorption et métabolisme des acides aminés dans les tissus de l'aire splanchnique

2.1. Les tissus drainés par la veine porte

2.1.1. Digestion ruminale

Les deux premières parties de ce chapitre, bien que non directement liés à la digestion ruminale des composés azotés ont pour objectif de donner quelques clés de compréhension (très simplifiées) sur les particularités digestives et la digestion des composés glucidiques de la ration chez les Ruminants. Les parties suivantes se sont focalisées sur la digestion de l'azote de la ration et du phénomène d'absorption d'ammoniaque et de recyclage de l'urée.

2.1.1.1. Physiologie des estomacs du ruminant

L'anatomie et la physiologie du système digestif des Ruminants sont différentes de celles des autres Mammifères et permettent, via le processus de rumination, la digestion d'aliments comme les fourrages qui sont très riches en cellulose et lignine difficilement digestibles (Jarrige et coll., 1995). Les estomacs des Ruminants sont au nombre de quatre : le rumen, le réseau, le feuillet et la caillette (la caillette possédant une fonction similaire à celle de l'estomac des Monogastriques). Cet ensemble représente plus des ¾ de la capacité du système digestif (Sauvant, 2002). La digestion des particules fibreuses est un processus lent qui dure entre 20 et 48 heures. Les aliments sont séquestrés dans la première partie (le rumen et le réticulum) et, subissent le processus de rumination avant de passer dans le feuillet lorsque la taille des particules est assez petite.

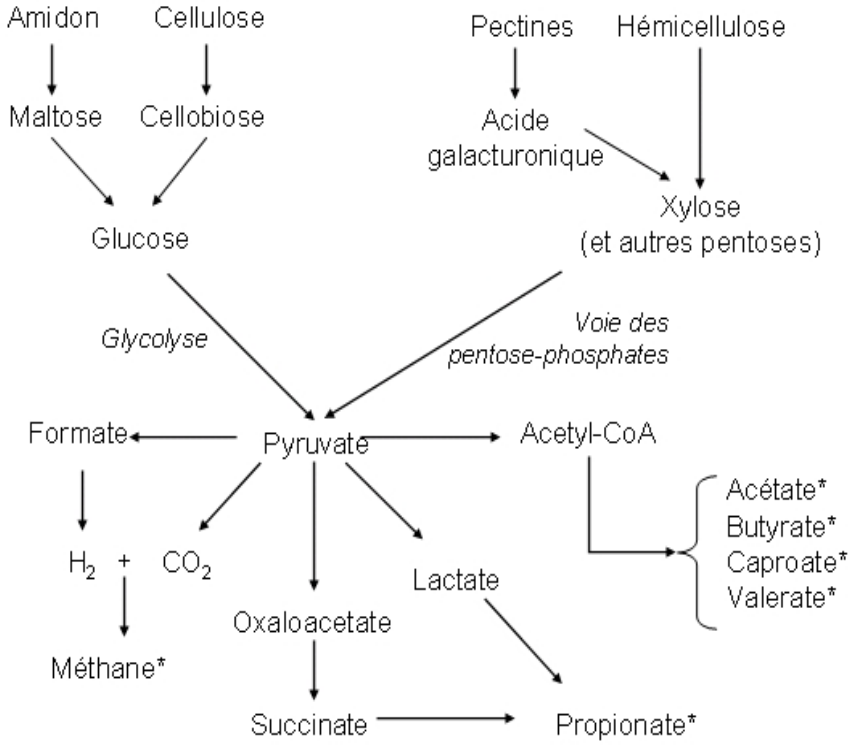
Le rumen est un écosystème anaérobie strict où la plupart des composants ligno-cellulosiques sont dégradés et fermentés par une microflore (10^{10}-10^{11} cellules / ml) et une microfaune (essentiellement des ciliés : 10^6 /ml) très abondante et diversifiée (Jarrige et coll., 1995). Il existe aussi dans le rumen des champignons anaérobies cellulolytiques (Jarrige et coll., 1995). Ainsi, chaque millilitre de contenu de rumen contient des milliards de microorganismes (20% de la matière sèche du contenu). La fonction essentielle des microorganismes du rumen (et en particulier des bactéries cellulolytiques) est de permettre la dégradation et fermentation des polyosides des parois végétales en composés assimilables par le Ruminant.

2.1.1.2. Digestion des composés glucidiques

L'apport de glucides alimentaires provient de sucres simples, d'amidon mais également, et surtout, de cellulose et autres composés cellulosiques de la paroi des végétaux présents dans

l'aliment (Russel & Hespell 1981 ; Russel et coll., 1992, Jarrige et coll., 1995, Figure 14). Ces composés glucidiques, digérés par les microbes du rumen, produisent des acides gras volatils (**AGV**), c'est-à-dire majoritairement de l'acétate, du propionate et du butyrate (Seal & Reynolds, 1993). Selon les espèces bactériennes majoritaires dans le rumen et selon l'alimentation, la part relative de chaque AGV est variable (Jarrige et coll., 1995). Si l'alimentation est riche en fourrages comparé à du concentré (céréales par exemple), le produit majoritaire de la fermentation sera l'acétate (65 %) suivi du propionate et du butyrate (20 et 15 % respectivement). En revanche si la ration est riche en concentrés relativement aux fourrages, le pourcentage d'acetate peut chuter en dessous de 40 % alors que le pourcentage de propionate augmente au delà de 40 %.

Figure 14 Dégradation ruminale et absorption intestinale des glucides. (d'après Russel & Hespell 1981 et Jarrige et coll., 1995)



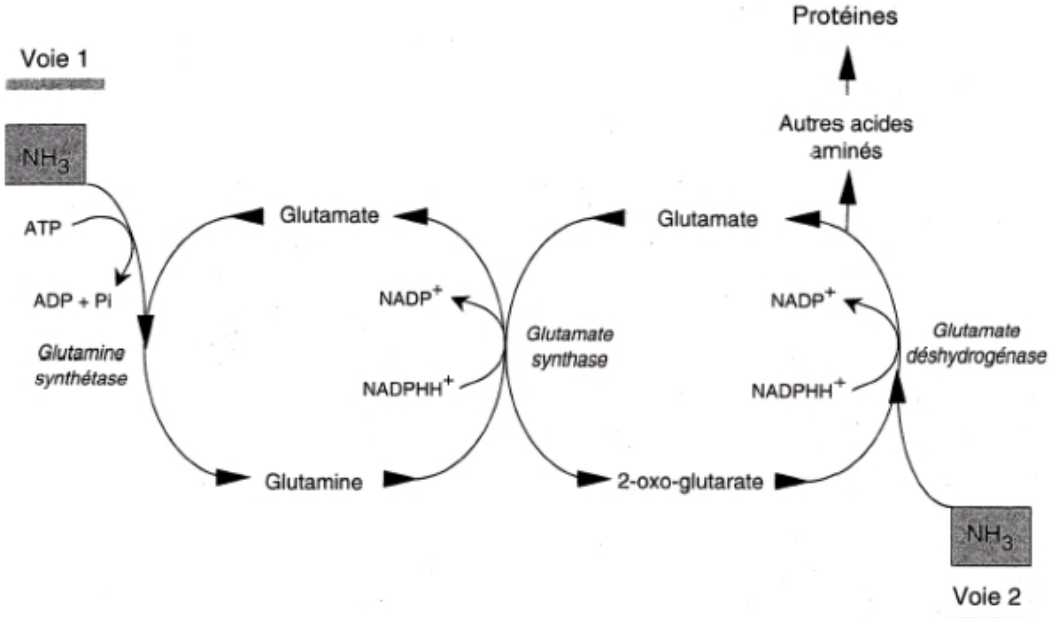
Les produits marqués par une * représentent les produits terminaux s'accumulant dans le rumen.

Une partie de l'amidon ingéré peut ne pas être dégradé dans le rumen (amidon by-pass). La part de cet amidon non dégradé pouvant être plus tard absorbé sous forme de glucose au niveau du tube digestif varie selon les sources alimentaires (INRA, 1978 et Jarrige et coll., 1995). La quantité de glucose représenterait moins de 1 % de l'énergie des nutriments absorbés avec des fourrages seuls mais devient notable dans le cas de rations mixtes contenant du maïs ou du sorgho (jusque 16 % de l'énergie absorbée dans ce cas) (INRA, 1978).

2.1.1.3. Digestion des composés azotés

Les nombreux microorganismes présents dans le rumen ont besoin d'azote pour la synthèse de leurs protéines cellulaires. L'azote utilisé peut être sous forme protéique ou non. Les protéines alimentaires sont dégradées par les protéases des microorganismes pour libérer des AA (Bach et coll., 2005). L'azote non protéique ammoniacal (issu de l'urée) peut également être utilisé pour la synthèse des protéines des microorganismes (Huber & Kung, 1981, Figure 15). Les bactéries cellulolytiques utilisent principalement l'azote ammoniacal alors que les bactéries amylolytiques utilisent toutes sortes de composés azotés (ammoniaque, AA, peptides) (Russell et coll., 1992). En principe, aucun AA n'est indispensable pour la croissance bactérienne car les microorganismes peuvent synthétiser l'ensemble des AA, mais un déficit en certains AA (tout comme un déficit en énergie) dans l'aliment peut engendrer une modification de l'activité des bactéries présentes dans le rumen. Une fraction des protéines alimentaires n'est pas dégradée dans le rumen et sera digérée telle quelle dans l'intestin grêle des ruminants ; cette partie peut représenter jusque 20 à 50 % des protéines absorbées (Storm & Orskov, 1983). Le degré de dégradation dépend du traitement de l'aliment (thermique, mécanique, chaleur humide …), de la nature et de la dégradabilité des protéines, du pH, des espèces de microorganismes présents dans le rumen et du temps de séjour des protéines dans le rumen.

Figure 15 Synthèse des acides aminés à partir de l'ammoniaque (NH_3) (Jarrige et coll., 1995).



La voie 1 dite de la glutamine synthétase-glutamate synthase commence par la formation de glutamine à partir de glutamate avec l'hydrolyse d'un ATP, puis le groupement amide est transféré à une molécule de 2-oxoglutarate et aboutit à la formation de deux molécules de glutamate. Ce couple d'enzymes a une grande affinité pour l'ammoniaque (le Km de la glutamate synthétase est égale à 1.8mM) mais, comme cette voie consomme de l'ATP, elle n'est avantageuse qu'aux faibles concentrations d'ammoniaque.
Aux concentrations normales, la voie la plus fréquente met en œuvre des glutamate-désyhrogénases couplées au NAD+ ou au NADP+ (voie 2).
Enfin l'alanine deshydrogénase (Km de 70mM) exige des concentrations en ammoniaque élevées.

La digestion des protéines aboutit à la formation d'ammoniaque, d'AA libres et de peptides (Figure 16 et 17). Les AA, lorsqu'ils sont ingérés sous forme libre, sont rapidement dégradés dans l'environnement du rumen (Velle et coll., 1997). Toutefois certains AA, lorsqu'ils sont apportés dans l'alimentation sous forme protégée, peuvent échapper à la dégradation ruminale (méthionine ou la lysine protégées par exemple : Berthiaume et coll., 2001 ; Broderick et coll., 2008). Ces AA protégés sont absorbés à travers la paroi ruminale et surtout intestinale (Lapierre et coll., 2006). L'azote microbien représente ainsi plus de la moitié de l'azote qui entre dans le duodénum (45-65 % pour des fourrages verts ou séchés et 55-70 % pour les rations mixtes sans urée ni produits tannés) (INRA, 1978). Quatre-vingt pourcents de l'azote microbien est sous forme de protéines vraies et le reste est sous forme d'acides nucléiques (INRA, 1978).

Figure 16 Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jarrige et coll., 1995).

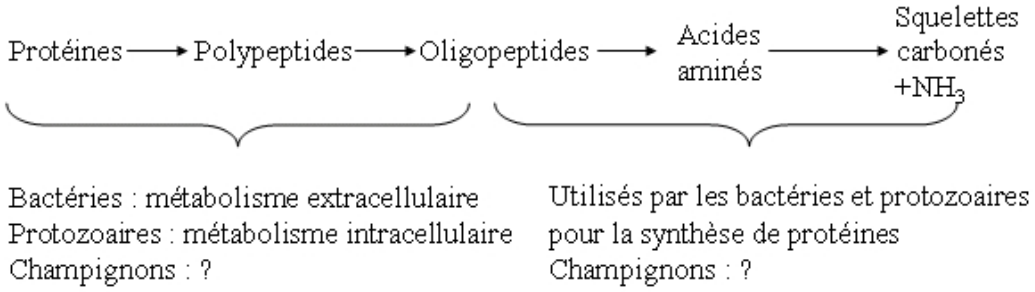
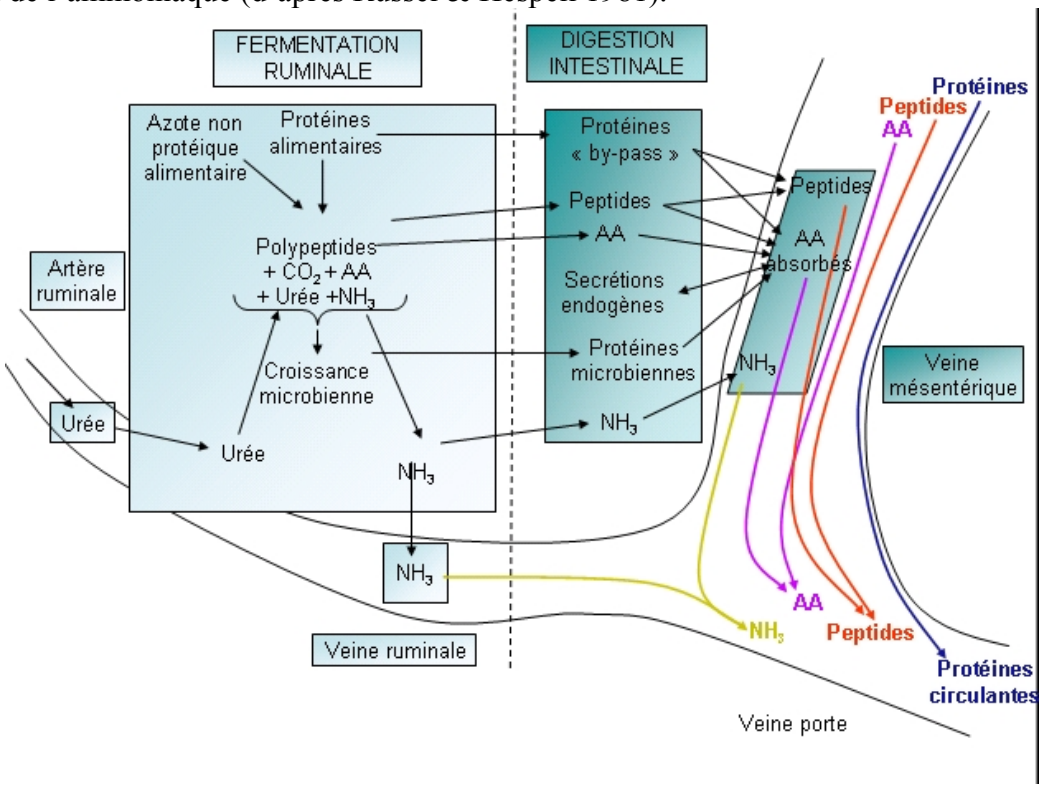
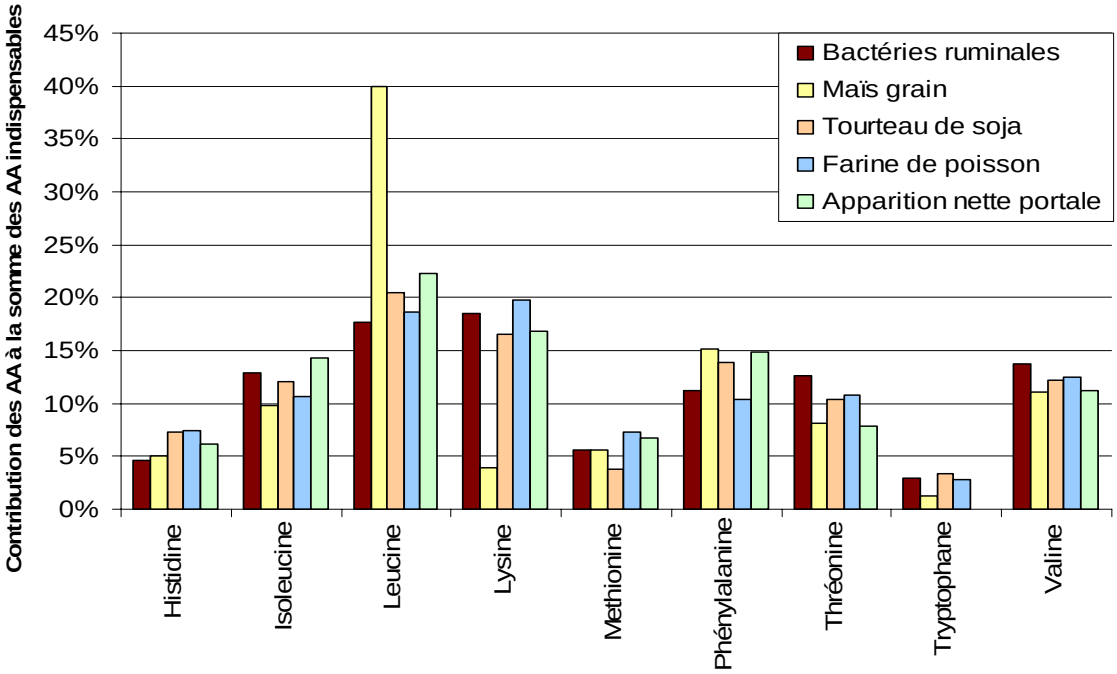


Figure 17 Dégradation ruminale et absorption intestinale des protéines, des peptides, des acides aminés et de l'ammoniaque (d'après Russel & Hespell 1981).



Du fait du fort remaniement des protéines et AA au sein du rumen, les protéines atteignant le lumen intestinal présentent un profil en AA généralement éloigné de la composition en AA des protéines alimentaires et plus proche de la composition moyenne en AA des bactéries du rumen. (Figure 18) (INRA, 1978). Cependant, les profils en AA des protéines atteignant le duodénum peuvent être modulés dans le cas d'apport d'aliments à faible dégradabilité d'azote et à teneur élevée en certains AA comme la lysine et la méthionine (INRA, 1978). En effet, les protéines de maïs présentent un déficit relatif en lysine, alors que les protéines de soja présentent un déficit relatif en méthionine ; ces deux AA sont connus être limitants pour la croissance de l'animal (Rulquin et coll., 2001 ; Figure 18).

Figure 18 Profil en acides aminés indispensables (AAI) dans les bactéries du rumen (Storm & Orskov, 1983) comparé au profil de trois aliments utilisés dans l'alimentation animale : le maïs grain, le tourteau de soja et la farine de poisson (d'après Lapierre et coll., 2002) et aux profils d'apparition nette portale chez la vache laitière (Berthiaume et coll., 2001) (contribution exprimée en % de chaque AA à la somme des 9 AAI considérés, sauf pour l'apparition nette portale où il n'y a pas de valeur pour le tryptophane)



2.1.1.4. Absorption ammoniacale et recyclage de l'urée

L'ammoniaque présent dans le rumen dérive essentiellement de la déamination des AA lors de l'hydrolyse des protéines de l'aliment, des microorganismes et des protéines endogènes (revue Rémond et coll., 1996). Vingt pourcents du flux ruminal d'ammoniaque chez des moutons nourris avec un régime fourrage/concentré (Koenig et coll., 2000) ou des granulés d'herbe sèche (Newbold et coll., 2000) provient d'urée recyclée (voir paragraphe suivant). Une part importante de

l'ammoniaque présent dans le rumen est incorporé dans les microorganismes du rumen ou absorbé dans la paroi digestive (35 à 65 % de la disparition de l'ammoniaque ruminal) et dans les protéines exportées (10 % de la disparition) (Rémond et coll., 1996). L'ammoniaque peut directement passer à travers la paroi ruminale et se retrouve dans la circulation via la veine ruminale (Rémond et coll., 1993) (Figure 17).

L'urée présente dans le rumen peut provenir de la ration (lorsque l'urée est utilisée comme apport d'azote non protéique) mais surtout de la salive et du transfert d'urée artérielle à travers la paroi ruminale (revues Rémond et coll., 1996 ; Lapierre & Lobley, 2001). Dans le rumen, l'urée est hydrolysée en ammoniaque. Ce recyclage de l'urée a été mis en évidence par l'étude de l'émission nette d'azote au niveau des TDVP. Comme l'apparition nette portale en azote est supérieure à celle fournie par la ration, un apport supplémentaire d'azote dans l'aire digestive est nécessaire pour expliquer ce phénomène (revue Rémond et coll., 1996). Le recyclage de l'urée contribue de manière importante au flux d'azote disponible pour le tube digestif et près de 2/3 de l'urée produite par le foie peut être recyclée vers les TDVP alors que le 1/3 restant est éliminé dans l'urine (revue Lapierre & Lobley, 2001). En effet, même en ne tenant pas compte de la part salivaire dans l'entrée d'urée dans les TDVP, la part de l'azote uréique entrant dans les TDVP représente respectivement 34 %, 38 % et 77 % de l'azote digéré chez les bovins en croissance, les vaches laitières et les moutons (revue Lapierre & Lobley, 2001). En l'absence d'apport d'urée dans la ration, la contribution de la salive à l'entrée d'urée dans le rumen est très variable : de 15 % à presque 100 % et dépend de la nature du régime avec une contribution de la salive supérieure lors de régimes riches en fourrages (revue Lapierre & Lobley, 2001). Le rumen et les estomacs ne sont pas les seuls sites, dans le tube digestif, par lequel l'urée artérielle produite par le foie peut entrer. Les tissus digestifs situés en aval des estomacs peuvent présenter jusque 70 % de l'entrée d'urée dans les TDVP. Parmi ces tissus, le tube digestif distal et surtout l'intestin grêle sont des sites d'entrée d'azote uréique (revue Lapierre & Lobley, 2001). Cependant, la part de l'urée recyclée dans les tissus autres que les estomacs semble, chez les Ruminants, être peu utilisée pour des processus anaboliques, c'est-à-dire en AA utilisable pour le métabolisme de l'animal (revue Lapierre & Lobley, 2001).

Alors que les nutriments transitant vers l'intestin chez les Monogastriques se composent essentiellement de sucres simples et d'AA provenant directement de l'aliment, les microorganismes présents dans le rumen des Ruminants modifient fortement le profil en nutriments énergétiques et, dans le cas nous concernant, en nutriments azotés. Seule une faible partie des protéines alimentaires (protéines by pass : moins de la moitié des protéines ingérées même dans le cas d'apport de protéines très protégées dans la ration) atteint l'intestin grêle sans

être dégradée par les microorganismes ruminaux. La digestion des aliments par les microorganismes du rumen, tout en étant indispensable à la digestion des composés cellulosiques de l'aliment chez les Ruminants, a un impact sur l'apport à la fois quantitatif de protéines au tube digestif et qualitatif en terme de profil en AA disponibles. La digestion ruminale se caractérise aussi par une production d'ammoniaque (essentiellement ruminale) et un recyclage de l'azote uréique substantiels. Le phénomène de recyclage de l'urée est crucial chez les Ruminants car il permet l'utilisation d'une quantité importante d'urée produite par le foie vers la synthèse d'AA par les microorganismes ruminaux.

Figure 19 Flux intestinaux en azote (N) ou en acides aminés Explication du Tableau 1.

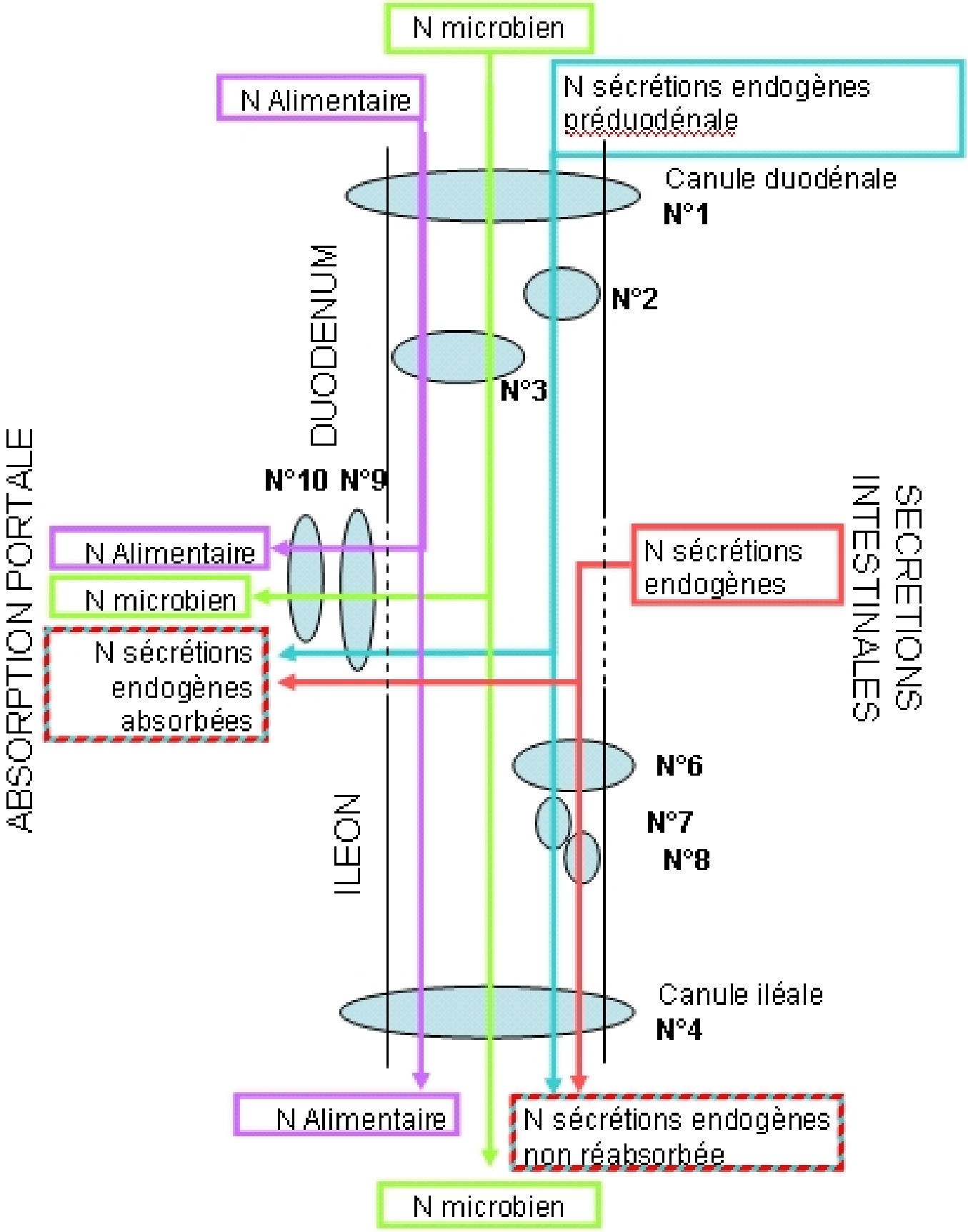


Tableau 1 Flux intestinaux d'acides aminés indispensables (g/j) à différents sites de mesures chez la vache laitière (Lapierre et coll., 2006, adapté de Berthiaume et coll., 2001).

Site	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Val
Cannule Duodénale[1]	53	120	189	144	55	111	109	133
Sécrétions endogènes duodenales[2]	15	19	20	30	6	19	27	25
Bilan net duodenal[3]	39	101	169	114	49	92	82	108
Cannule Iléale[4]	24	38	61	37	19	42	44	55
Digestibilité iléale apparente[5]	30	82	128	107	36	70	65	78
Sécrétions endogènes iléales								
- totales[6]	7	11	14	16	4	15	18	15
- provenant des sécrétions préduodénales[7]	5	6	6	9	2	6	8	8
- provenant des sécrétions intestinales[8]	3	5	8	7	3	9	10	8
Digestibilité iléale vraie[9]	32	87	136	114	39	79	75	85
Digestibilité iléale vraie provenant de l'alimentation[10]	22	73	122	93	35	65	56	68
Disponible, en comptant les sécrétions endogènes[11]	15	63	108	77	30	51	38	53
Absorbé en veine porte	22	51	80	60	24	53	28	40
Dans le lait	15	33	54	45	15	27	26	37

[1] Présent au niveau duodenal : **n°1** : correspond aux AA arrivant sous forme de protéines microbiennes, de protéines alimentaires by-pass et de sécretions endogènes en amont du duodénum
[2]**n°2** : En supposant qu'elles correspondent à 4,3g d'azote par kg de matière sèche ingérée (Ouellet et coll., 2002), et en tenant compte de la composition en AA d'un isolat de caillette.
[3] **n°3** : Différence entre 1 et 2 : flux entrant dans le duodenum provenant uniquement de l'alimentation
[4] Présent au niveau duodenal : **n°4**
[5] Différence entre **n°1** et **n°4**
[6]**n°6** : Estimé comme 28 % du flux en protéines de l'iléon (**n°4**) avec la composition des protéines endogènes intestinale estimée par Jansman et coll., 2002.
[7]**n°7**
8 **n°8** : avec 7 et 8 représentant la moitié de n°6 (les sécrétions endogènes iléales totales).
[9] **n°9** : pour ne pas compter les sécrétions endogènes intestinales. Soit **n°1**-(**n°4-n°8**) ou **n°5** + **n°8**
[10] **n°10** : pour prendre en compte l'absorption qui est uniquement issue des sources alimentaires.
(**n°1** – **n°2**) – (**n°4** – **n°6**) ou **n°9**-(**n°2-n°8**)
[11] Pour enlever la part des AA absorbés mais resynthétisés en sécrétions endogènes : **n°10 - n°6**

Ce tableau est à lire avec la Figure 19.

2.1.2. L'absorption intestinale: la disparition luminale

2.1.2.1. Particularités physiologiques de l'intestin

L'intestin est constitué de l'intestin grêle (duodénum, le jéjunum (portion la plus longue), iléon) et le gros intestin (Caecum, colon et rectum). Caecum et colon constituent, après le rumino-réticulum, une deuxième chambre de fermentation distale (Jarrige et coll., 1995). La muqueuse de l'intestin est un tissu sécréteur et fortement proliferatif. Ceci a deux conséquences : 1) il est difficile de quantifier l'importance et la composition des secrétions recyclées (qui affectent la détermination de la digestibilité) (Fuller & Reeds, 1998) et 2) ces protéines secrétées à différents niveaux de l'intestin n'étant pas toutes recyclées, le tube digestif est un producteur net de protéines (Reeds et coll., 1999).

Les besoins en AA de l'intestin limitent donc la biodisponibilité en AA (comme la cystéine et la thréonine) pour les autres tissus et organes. La muqueuse étant également composée de nombreux types cellulaires différents (cellules épithéliales, cellules immunitaires, cellules microbiennes adhérentes …), l'étude du devenir des AA au sein du tube digestif et l'interprétation des données d'apparition nette en veine porte des AA sont particulièrement complexes.

Enfin, l'intestin présente la particularité de recevoir des nutriments via le lumen ou via les artères. Par conséquent, l'identification de la source (artérielle ou luminale) ainsi que le devenir au sein des cellules des AA d'origine artérielle ou luminale est cruciale pour comprendre le fonctionnement du tube digestif mais aussi les conséquences en terme de biodisponibilité en nutriments (Reeds et coll., 1999 ; Hanigan, 2005).

2.1.2.2. L'absorption intestinale : la disparition luminale des protéines et des AA

- Flux duodénal

Compte tenu de la complexité de la digestion ruminale, le flux protéique duodénal est composé de protéines alimentaires non dégradées dans le rumen (protéines by-pass), de protéines microbiennes et de protéines endogènes (Sauvant et coll., 2004 ; INRA, 1978, Figure 19). Même si la majorité des protéines présentes reste d'origine microbienne, la composition de chacune de ces fractions varie et dépend de la nature du régime et des quantités ingérées (Clark et coll., 1992; Lapierre et coll., 2006). Les protéines endogènes ont diverses origines : mucoprotéines, salive, cellules épithéliales desquamées, enzymes secrétées dans la caillette … (Tamminga et coll., 1995) et ne peuvent être considérées comme un apport d'AA en tant que tel mais plutôt comme un

recyclage d'AA préalablement absorbés et qui sont réorientés vers le tube digestif en amont du duodénum. Une partie de ces protéines endogènes est hydrolysée puis réabsorbée sous forme d'AA. Le reste est excrété dans les fécès et représente une perte nette d'AA (Lapierre et coll., 2008).

La majorité des études chez les ruminants ont mesuré le flux azoté microbien (Broderick & Merchen, 1992) et ont calculé le flux de protéines alimentaires non dégradées dans le rumen par différence entre les protéines ingérées et les protéines microbiennes (revue de Lapierre et coll., 2006). Les protéines endogènes sont difficiles à quantifier et souvent négligées dans les calculs. Des études plus récentes utilisant des traceurs (Lapierre et coll., 2008), ont estimé ces secrétions endogènes à 15 % - 30 % du flux protéique duodénal (Ouellet et coll., 2002 et 2005 ; Lapierre et coll., 2008) chez la vache laitière et à 3-12 % chez les moutons (Van Bruchem et coll., 1997 ; Sandek et coll., 2001). Cette contribution est importante et doit être déduite lors de la mesure du flux duodénal de protéines pour déterminer l'apport vrai net d'AA au duodénum. La non prise en compte des secrétions endogènes dans le calcul du flux protéique duodénal revient à surestimer les apports nets en AA disponibles au niveau duodénal (Figure 19 et Tableau 1). En plus d'avoir un impact sur l'apport quantitatif d'AA au niveau duodénal, la part relative des protéines endogènes par rapport aux protéines microbiennes et by-pass (de composition en AA différente) a également un impact sur le profil en AA disponibles (ex : thréonine ou leucine) (Orskov et coll., 1986).

- Disparition de l'intestin grêle : absorption nette au travers de l'épithélium digestif

Le flux duodénal ne représente pas ce qui est disponible pour l'animal. Les AA réellement disponibles sont ceux digérés par l'intestin grêle. Par différence entre le flux d'AA au niveau de l'iléon (par pose d'une cannule iléale) et celui du duodénum, il est possible de calculer la digestibilité apparente des AA et protéines (Lapierre et coll., 2002b). Afin d'éviter la pose d'une cannule iléale, la digestibilité est souvent déterminée par différence entre les flux duodénaux et fécaux (Lapierre et coll., 2006). Cependant, les protéines endogènes et alimentaires sont métabolisées dans le lumen du tube digestif distal par les microorganismes qui sont présents et la perte d'AA au travers de l'intestin distal est supérieure à la synthèse d'AA par les microorganismes. Ainsi, la digestibilité apparente mesurée par différence duodénum – fécès est supérieure à la valeur duodénum – iléon (Berthiaume et coll., 2001) (Figure 19, Tableau 1).

La notion de digestibilité apparente iléale semble donc plus pertinente. Cependant, celle-ci est également sujette à limitations. En effet, une partie du flux iléal est d'origine endogène. Chez la vache laitière, Ouellet et coll. (non publiés cités par Lapierre et coll., 2006) ont montré que les pertes endogènes d'azote dans l'iléon représentaient 28 % du flux iléal total. Chez le mouton la contribution des secrétions endogènes au flux iléal représentaient 32 % (Sandek et coll., 2001) et 48

% (Van Bruchem et coll., 1997) du flux iléal total. Par conséquent, la prise en compte de ces secrétions endogènes dans le calcul de la digestibilité vraie est donc importante. A la différence des études sur Monogastriques (Jansman et coll., 2002), les secrétions endogènes émises dans les contenus iléaux proviennent de secrétions ayant eu lieu entre le duodénum et l'iléon mais aussi de secrétions déjà présentes au niveau duodénal comme précisé dans le paragraphe précédent (Lapierre et coll., 2006). Donc, chez les Ruminants, les protéines endogènes présentes dans les contenus iléaux sont des protéines endogènes pré-duodénales non digérées et des protéines endogènes secrétées par l'intestin grêle et non réabsorbées. La contribution de ces fraction aux protéines endogènes totales semble équivalente (Ouellet et coll., non publié cités par Lapierre et coll., 2006). La mesure de la digestibilité de la fraction des protéines endogènes pré-duodénales permet donc d'estimer la fraction des protéines d'origine alimentaire non digérées des contenus duodénaux; la fraction des protéines endogènes secrétées par l'intestin grêle non réabsorbées est ensuite déduite (contribution 50/50 pour les 2 fractions). La digestibilité des protéines endogènes duodénales est de l'ordre de 60-70 % chez les moutons (Sandek et coll., 2001) et les vaches laitières (Ouellet et coll., 2002) (Figure 19 et Tableau 1).

- Relation entre disparition de l'intestin grêle et apparition portale des AA

Les AA disparaissant de l'intestin grêle (digestibilité vraie) sont absorbés au travers de l'épithélium digestif et apparaissent intacts ou métabolisés dans la circulation sanguine en veine mésentérique puis en veine porte (Figure 7). Le ratio entre la disparition des AA dans l'intestin grêle et l'apparition nette des AA en veine porte correspond à la quantité d'AA utilisé (sur une base nette) par l'intestin grêle. Dans le cas où l'on considère que la masse du tube digestif reste constante (animaux à l'entretien, en faible croissance ou en lactation (sauf début de lactation)), le prélèvement net d'AA s'expliquerait en très grande majorité par une oxydation des AA (Lapierre et coll., 2002a). Peu d'études dans la bibliographie se sont intéressées à l'étude comparée de la disparition vraie des AA dans l'intestin grêle et de l'apparition nette en veine porte des AA. Les difficultés techniques associées à ce type d'étude en sont probablement responsables (discuté par Macrae et coll., 1997b et Lapierre et coll., 2006).

Une étude relativement ancienne sur moutons (Tagari & Bergman, 1978) a montré que le ratio entre la disparition des AA dans l'intestin grêle mesurée par digestibilité apparente iléale (animaux cannulés au niveau duodénal et iléal) et l'apparition portale était relativement faible et présentait de grandes variabilités entre AA (Figure 20a) (19-29 % pour histidine et methionine respectivement ; 69 % pour lysine). Des données plus récentes sur moutons et vaches laitières (positionnement des cathéters et cannules identiques à l'étude précédente) (MacRae et coll., 1997a

et b ; Berthiaume et coll., 2001) ont montré que ces ratios étaient plus proches de 1 et moins variables selon les AA (Figure 20 b et c). Lorsque les pertes liées aux protéines endogènes sont prises en compte dans la mesure de digestibilité (AA disponibles) (Tableau 2), les ratios AA disponibles / apparition nette veine porte sont proches de 1 pour certains AA (et même supérieur) (phénylalanine et histidine) et autour de 70-80 % pour les autres AA essentiels (Tableau 2). Les pertes restantes sont probablement dues à de l'oxydation. Ces données sur Ruminants sont cohérentes avec celles obtenues sur Monogastrique (Le Floc'h et Sève, 2000) (Tableau 3).

Figure 20 Etude comparée entre les acides aminés indispensables disparus de l'intestin (digestibilité apparente iléale) et retrouvés au niveau de la veine porte. (a) Tagari & Bergman, 1978, brebis alimentées avec de la luzerne à haute teneur en protéines. (b) MacRae et coll., 1996, agneaux en croissance alimentés avec de la luzerne à un plus bas niveau d'ingestion que (a), (c) Berthiaume et coll., 2001 vaches laitières recevant du fourrage.

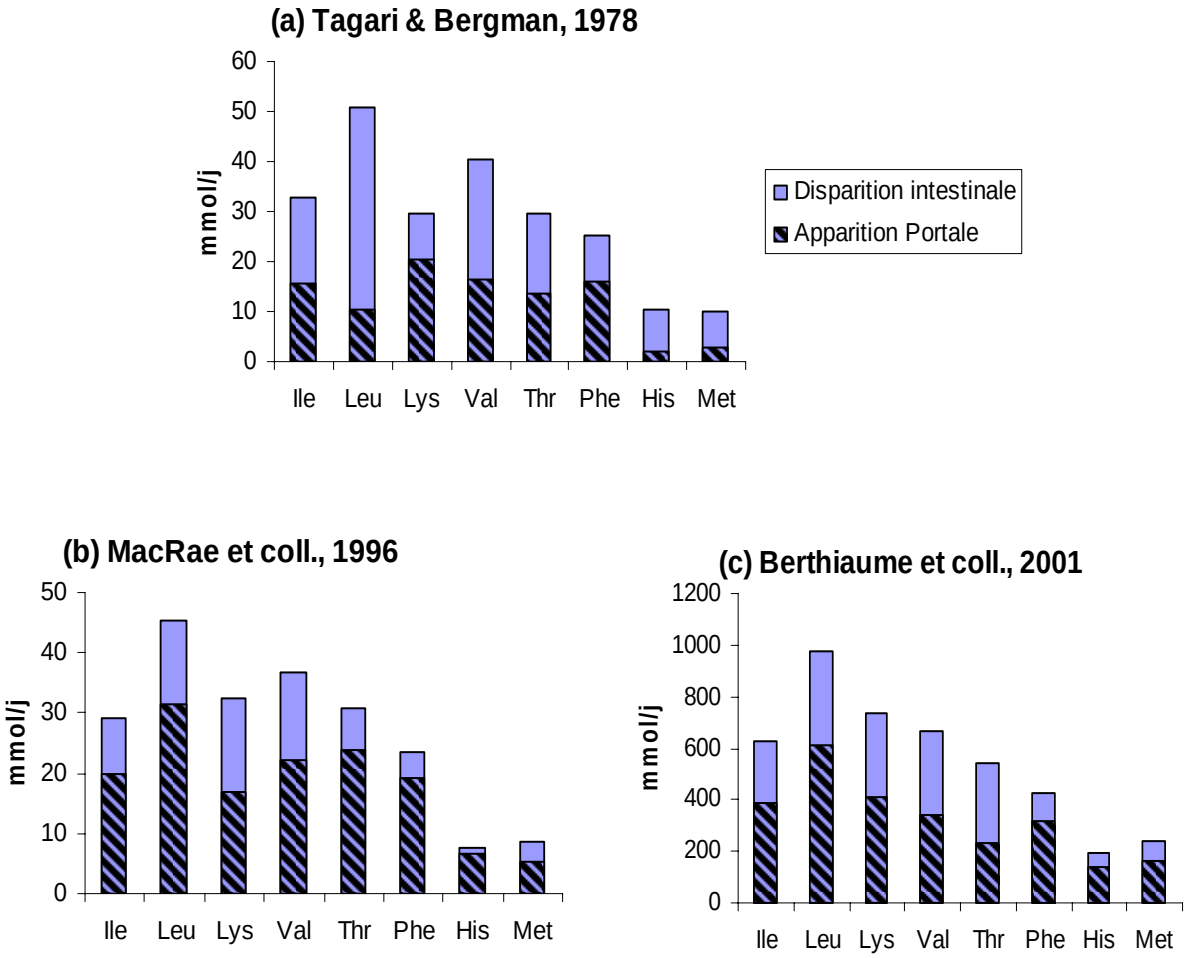


Tableau 2 Proportion d'acides aminés ingérés apparaissant en veine porte pour les trois études ci-dessus (en pourcent de la disparition intestinale mesurée par digestibilité apparente iléale)

	Ile	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Met
(a) Tagari & Bergman 1978	47.6	20.9	69.2	40.8	45.3	63.0	18.8	29.1
(b) MacRae et coll., 1996	68.2	69.1	52.3	60.4	77.9	82.1	89.3	59.8
(c) Berthiaume et coll., 2001	62.2	62.5	56.1	51.3	43.1	75.7	73.3	66.7

Tableau 3 Proportion d'acides aminés ingérés apparaissant en veine porte chez les porcs en croissance (d'après Le Floc'h et Sève, 2000).

	Ile	Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Met
Deutz et coll., 1998.	56	43	61	53	39	51	55	61
Van der Meulen et coll., 1997	83	86	82	67	44	94	107	93
Rérat et coll., 1992	74	83	83	104	52	75	69	99
Darcy-Villron et coll., 1991.	75	64	74	81	71	66	75	93

Enfin, l'utilisation nette d'AA par certaines parties du tube digestif comme les pré-estomacs, le pancréas et le tube digestif distal peut être déduite de la comparaison entre l'apparition nette des AA dans les TDVP et l'apparition nette des AA en veine mésentérique (Tableau 4). Les TDVP drainent en effet les tissus drainés par la veine mésentérique plus d'autres tissus (Figure 7). L'analyse du Tableau 4 montre une différence substantielle entre les deux bilans pour une majorité d'AA et en particulier leucine, isoleucine, valine, lysine, glutamine et thréonine, montrant une utilisation nette d'AA importante par les tissus n'appartenant pas à l'aire drainée par la veine mésentérique.

Tableau 4 Apparition nette d'acides aminés (mmol/h) en veine mésentérique (TDVM) et en veine porte (TDVP) chez le mouton nourri avec 1200g de fourrage (d'après Lobley et coll., 2003).

	TDVM	TDVP
Acides aminés non indispensables		
Alanine	4,062	3,198
Aspartate	0,612	0,594
Glutamate	1,572	1,302
Glutamine	-0,684	-1,710
Glycine	3,642	2,682
Proline	1,638	1,074
Sérine	2,442	1,872
Tyrosine	1,560	1,158
Acides aminés indispensables		
Histidine	0,774	0,546
Isoleucine	2,130	1,290
Leucine	3,450	1,902
Lysine	2,280	1,590
Méthionine	0,732	0,480
Phénylalanine	1,872	1,482
Thréonine	2,154	1,344
Tryptophane	0,510	0,258
Valine	2,634	1,572

2.1.3. Résultante : apparition des nutriments azotés en veine porte

2.1.3.1. Ratio entre AA totaux et ammoniaque

Les composés azotés majeurs apparaissant en veine porte sont l'ammoniaque et les acides aminés. Une revue de synthèse (Lapierre & Lobley, 2001 ; Tableau 5) montre qu'en moyenne, l'ammoniaque contribue relativement plus à l'absorption nette d'azote total en veine porte comparé aux AA chez les bovins quel que soit le régime. L'ammoniaque présent en veine porte représente une fraction importante absorbée (via l'alimentation et le phénomène de recyclage de l'urée) qui n'est pas disponible directement pour la synthèse protéique. Une partie sera cependant disponible ultérieurement via un recyclage de l'urée produite dans le foie à partir de l'ammoniaque présent en veine porte (cf **partie 2.1.2**). Chez les ovins, le ratio s'inverse et plus d'AA apparaissent en veine porte relativement à l'ammoniaque (Tableau 5). Autrement dit, la conversion de l'azote digestible en AA absorbés est supérieure chez les moutons (81 %) relativement aux bovins (39-55 %) (Lapierre et Lobley, 2001) (Tableau 5). Ceci a été confirmé récemment par méta-analyse (utilisant 17 publications mesurant les bilans nets splanchniques chez des ovins et bovins) (Lapierre et coll., 2007). Ces différences entre les deux espèces de ruminants proviennet très probablement des différents régimes donnés aux bovins et aux ovins et/ou, dans une moindre mesure, des méthodologies employées pour le dosage des acides aminés. L'impact des régimes sur la contribution des AA et ammoniaque à l'apparition nette portale d'azote sera détaillée dans la **partie 3.1**.

Tableau 5 Apparition nette portale en nutriments azotés et ingestion d'azote digestible (mmol/h) : effet de l'espèce animale et du type d'alimentation (Lapierre et Lobley, 2001).

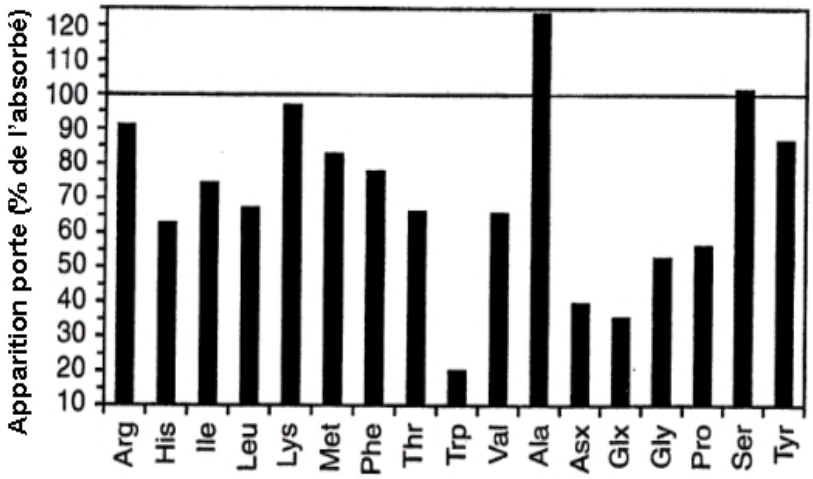
	$N\text{-}NH_3$	N-AA	N-Urée	N digéré	Ratio		
					$N\text{-}NH_3$: N digéré	N-AA : N digéré	($N\text{-}NH_3$ + N-AA) : N digéré
Bouvillons							
Fourrage	232	120	-103	315	0,72	0,39	1,11
Concentré	172	115	-101	293	0,60	0,39	0,99
Total	184	115	-99	295	0,62	0,39	1,01
Vaches laitières	505	477	-334	845	0,60	0,55	1,12
Moutons							
Fourrage	11,6	15,0	-20,5	21,6	0,68	0,86	1,49
Fourrage + Concentré	11,3	22,3	-17,2	28,3	0,50	0,80	1,27

2.1.3.2. Profil en AA apparaissant en veine porte

Globalement, les AA apparaissant en veine porte sont pour 40-50 % des AAI et 50-60 % des AANI (Lapierre et coll., 2000 ; Huntington et coll., 1988, Seal & Parker, 1996 ; Bruckental et coll. ,1997 ; Reynolds et coll., 1994 ; Savary-Auzeloux et coll., 2003a et b). Seules deux études montrent, sans explication évidente, un ratio AAI/AAT très supérieur (Huntington & Prior, 1985 ; Seal et coll., 1992).

Comme le montre la Figure 21, la proportion d'AA apparaissant en veine porte relativement au flux absorbé est variable selon l'AA. En effet, certains AANI comme glutamate/glutamine, aspartate/asparagine présentent une apparition portale très faible (30-40 %) relativement à ce qui est absorbé (Figure 21 ; Reynolds, 2006). L'inverse est observé pour l'alanine. Des résultats similaires sont observés chez les Monogastriques (Le Floc'h et Sève, 2000 ; Baracos, 2004). Concernant les AAI, la lysine, methionine et phénylalanine semblent peu utilisés par les TDVP. Les AA à chaînes ramifiée (**AACR** = leucine, valine et isoleucine), thréonine et surtout tryptophane sont, par contre, plus utilisés (Figure 20 et 21, Berthiaume, 2001). Ces données sont confirmées par la comparaison de l'apparition des AA au niveau des TDVP et des tissus drainés par la veine mésentérique (Tableau 4, Lobley et coll., 2003) où les ratios TDVP / tissus drainés par la veine mésentérique sont plus élevés pour la phénylalanine et plus faibles pour les AACR, la lysine et la thréonine. Une moins bonne absorption de la thréonine est également observée chez le Monogastrique (Rérat et coll., 1992 ; Deutz et coll., 1998, Tableau 3). Concernant l'histidine, elle est très peu captée dans certaines études (Berthiaume et coll., 2001, Figure 20) et plus selon d'autres auteurs (Hanigan, 2005, Figures 21). Par contre, pour expliquer la très importante utilisation du tryptophane constatée dans la Figure 21, l'hypothèse d'une mauvaise estimation dans l'apport de tryptophane est avancée par Hanigan (2005).

Figure 21 Emission nette d'acides aminés en veine porte exprimée en pourcentage du flux absorbé d'acides aminés. (Asx représente Asp+ Asn et Glx représente Glu + Gln) (Hanigan et coll., 2005).



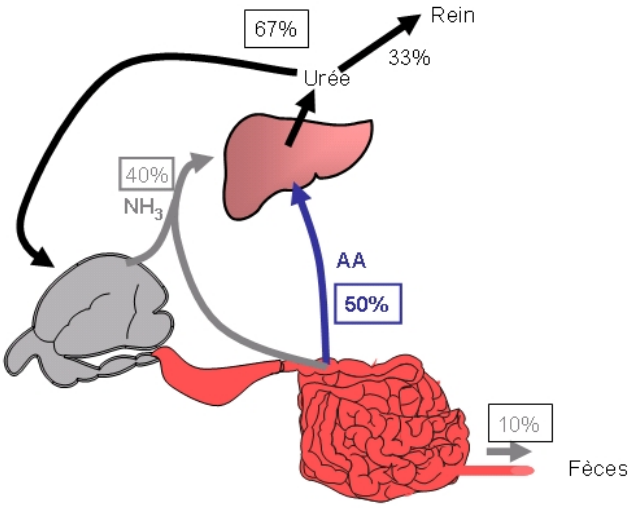
2.1.3.3. Apparition nette portale en peptides

L'absorption de peptides reste un sujet de débat, en particulier à cause de difficultés méthodologiques (Lobley & Lapierre 2003, Lapierre et coll., 2006). En effet, un dosage d'AA est réalisé sur des AA libres plasmatiques et un filtrat hydrolysé de plasma contenant les peptides et les AA. La différence entre ces dosages donne la quantité de peptides plasmatiques. La majorité des résultats semblent montrer que leur absorption contribue peu (Rémond et coll., 2000a et b) ou pas (Backwell et coll., 1997) à la quantité et la qualité des AA disponibles pour l'animal. Cependant, chez le mouton, des données récentes de Rémond et coll. (2008) montrent que la contribution des peptides au relargage net des tissus drainés par la veine mésentérique en AA essentiels est de l'ordre de 7-8 %. D'autres études sur moutons estiment cette contribution à 14 % (Rémond et coll., 2003) voire 20 % chez l'agneau (Neutze et coll., 1996).

2.1.3.4. Devenir de l'urée recyclée

Comme nous l'avons précisé dans la **partie 2.1.1.4**, 2/3 de l'urée produite par le foie est recyclée vers les TDVP. Cependant, suite à ce recyclage, seulement 50 % de la part de l'urée recyclée sera effectivement utilisée à des fins anaboliques par l'animal car elle sera réabsorbée sous forme d'AA (Figure 22) (Lapierre et Lobley, 2003). Les 50 % restants seront soit réabsorbés sous forme d'ammoniaque (40 %) ou excrétés dans les fécès (10 %). Dans le cas du mouton perfusé avec de l'urée [$^{15}N^{15}N$], jusque 63 % de l'entrée d'urée dans les TDVP (et donc essentiellement au niveau des estomacs) est utilisée pour des processus anaboliques à des niveaux d'alimentation inférieurs à l'entretien et se maintient à 46 % chez des animaux nourris à 1,8 x l'entretien (Sarraseca et coll., 1998).

Figure 22 Recyclage de l'azote chez les ruminants : devenir de l'urée produite par le foie. (Lapierre & Lobley, 2003)



Ce phénomène de recyclage de l'urée est donc essentiel chez les ruminants pour « épargner » l'azote d'origine alimentaire ou métabolique.

2.1.4. Voies d'utilisation des nutriments azotés par le tube digestif

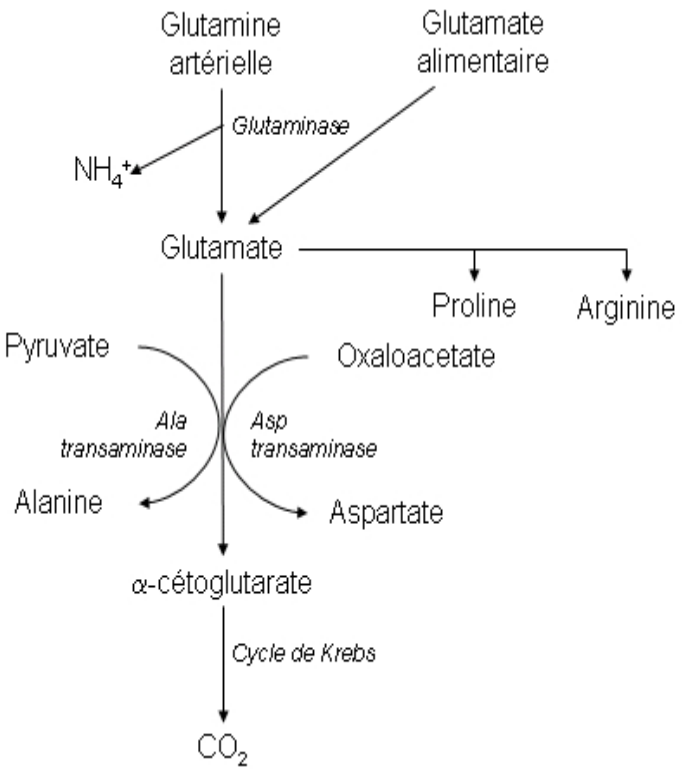
2.1.4.1. Oxydation complète ou partielle des AA

2.1.4.1.1. Les AA non indispensables

L'utilisation des AANI dans le tube digestif à des fins d'oxydation est mal connue et la majorité des données proviennent d'études utilisant des AANI marqués et infusés par voie entérale et/ou périphérique chez le Monogastrique.

Le glutamate, la glutamine, et l'aspartate sont des sources d'énergie importantes pour les tissus intestinaux des rats (Windmueller & Spaeth, 1978) et les Ruminants (Heitman & Bergman, 1981). Le glutamate est transformé en α-cétoglutarate qui entre dans le cycle de Krebs puis est oxydé (Figure 23) L'oxydation de ces AA permet de fournir l'énergie nécessaire à la forte prolifération cellulaire de la muqueuse intestinale (Le Floc'h & Seve, 2000). L'oxydation de ces trois AA a été montrée sur des entérocytes isolés de moutons (Oba et coll., 2004). Ces données sont cohérentes avec les prélèvements nets importants constatés en particulier pour la glutamine par bilans artério-veineux au niveau des TDVP (**cf partie 2.1.2.2**).

Figure 23 Oxydation du glutamate dans la muqueuse intestinale (Le Floc'h & Sève, 2000).



Des données plus quantitatives existent chez les Monogastriques où l'oxydation du glutamate et de la glutamine contribuent respectivement à 25 à 47 % des dépenses énergétiques du tube digestif des porcelets (Reeds et coll., 1996 ; Reeds & Burrin, 2001). La glutamine, le glutamate et l'aspartate ne sont cependant pas complètement oxydés en CO_2 (Stoll & Burrin, 2006). En effet, des résultats sur intestin perfusé de rats *in situ* (Windmueller & Spaeth, 1976 et 1978) ou sur porcelets (Stoll et coll., 1999a) montrent que 55-70 % de la glutamine, 52-64 % du glutamate et 52 % de l'aspartate est oxydé en CO_2. Les atomes de carbone restants sont convertis en lactate, alanine, proline, citrulline, ornithine et arginine avant d'être émis dans la circulation portale. Le devenir des azotes correspondants n'est pas entièrement connu. Une partie de l'azote provenant du glutamate et de la glutamine est sous forme d'ammoniaque ou transféré sur d'autres AA (citrulline, ornithine, proline, arginine) dont une grande partie est convertie en urée dans le foie.

Seulement 4 % de la cystéine disparaissant de l'intestin apparaît en veine porte chez des moutons nourris avec de l'herbe (Rémond et coll., 2003). Cette valeur souligne la forte demande des TDVP en cystéine, sans doute en relation avec la synthèse de glutathion par l'intestin (Reeds et coll., 1997).

2.1.4.1.2. Les AA indispensables

- Quels AAI sont oxydés dans l'intestin ?

Certains AAI sont susceptibles d'être oxydés par les TDVP notamment les AACR. En effet, les tissus digestifs, comme de nombreux autres tissus, possèdent les enzymes responsables de la transamination et la déshydrogénation d'AAI (Goodwin et coll., 1987). La thréonine est fortement oxydée par les TDVP chez le porc et notamment dans le pancréas présentant une thréonine deshydrogénase très active (Le Floc'h et coll., 1995). Dans ce cas, l'oxydation de la thréonine aboutit à la formation de glycine. Une oxydation similaire de la thréonine chez les Ruminants pourrait expliquer le fort prélèvement net de cet AA par les TDVP mais reste à démontrer.

La leucine et la méthionine (mais pas la phénylalanine ni la lysine) sont oxydées par les TDVP selon une étude réalisée chez le mouton après perfusion artérielle de leucine, methionine phénylalanine et lysine marquées (Lobley et coll., 2003). Ces mesures directes de l'oxydation des AAI peuvent expliquer, ici encore, les observations faites lors de l'étude des émissions nettes en AAI des TDVP (**cf partie 2.1.2.2**).

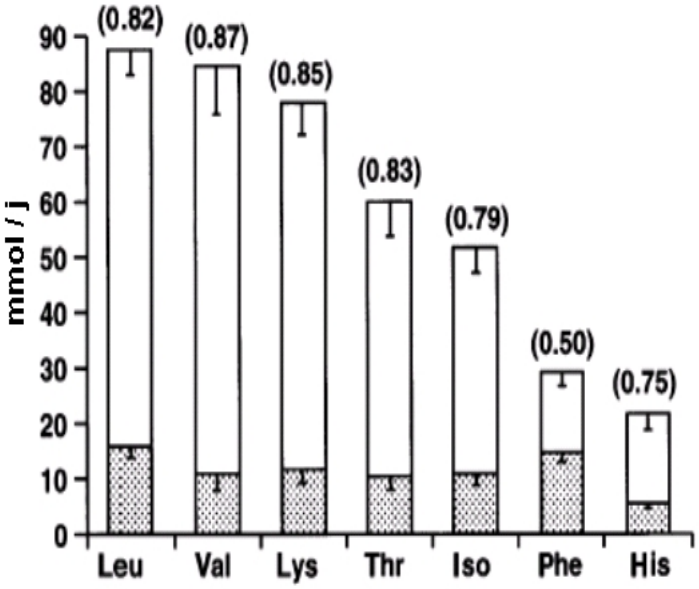
- Origine des AA oxydés par les TDVP

Les AA disponibles aux tissus digestifs ont une double origine : à la fois artérielle (comme de nombreux autres tissus) mais aussi entérale. Il est donc intéressant de savoir si les AA utilisés par les TDVP sont issus de l'apport artériel ou entéral.

Bien que comprenant l'ensemble des tissus drainés par la veine mésentérique plus le rumen, le tube digestif distal et le pancréas (Figure 7), l'émission nette portale en AA est inférieure à l'émission nette mésentérique chez le mouton et le bovin (Reynolds, 2002 ; Rémond et coll., 2008) (Tableau 4). Ceci suggère une utilisation nette substantielle des AA d'origine artérielle par les tissus digestifs, en particulier par ceux qui ne sont pas drainés par la veine mésentérique. Pour les AAI, le ratio entre les bilans nets au niveau des TDVP et mésentérique varie de 0,55 à 0,8 (Tableau 4)).

Des études combinant des perfusions d'un mélange de plusieurs AA marqués par voie entérale et artérielle ont montré chez le Ruminant (Mac Rae et coll., 1997) que l'utilisation des AA par le tube digestif était essentiellement d'origine artérielle (50-90 %) (Figure 24, MacRae, 1997).

Figure 24 Quantité d'acides aminés indispensables (mmol/j) séquestrés dans les tissus du tube digestif et les sécrétions endogènes issues de la fourniture artérielle (en blanc) et luminale (en gris) en AA. Les valeurs entre parenthèses correspondent au pourcentage provenant de l'artère) (MacRae et coll., 1997)



Lobley et coll. (2003) ont confirmé, après perfusion de 1-^{13}C leucine, phénylalanine, methionine et lysine, l'oxydation de certains AA artériels (leucine et dans une moindre mesure methionine) par les tissus splanchniques. L'oxydation de la leucine (entérale et artérielle) est également montrée chez le porc nourri avec un régime riche en protéines (van der Schoor et coll., 2001). Cependant, et en accord avec les données de van Goudoever et coll. (2000) sur porc, aucune oxydation de la lysine artérielle n'a été montrée chez le mouton (Lobley et coll., 2003). L'oxydation de la lysine ne semble avoir lieu que lorsqu'elle est d'origine entérale chez le porc (van Goudoever

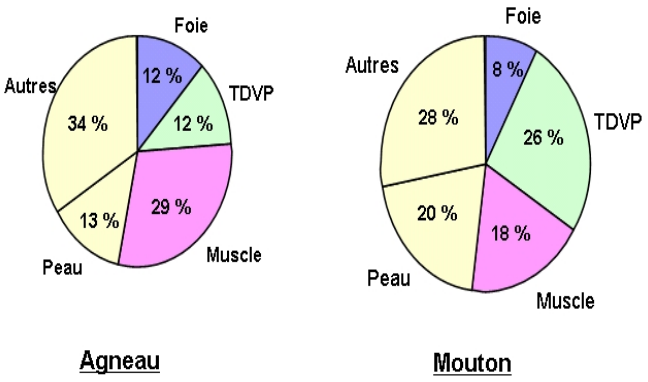
et coll. 2000), ce qui a été confirmé sur entérocytes en culture (Ball, 2002). La présence d'une lysine-cétoglutarate réductase (nécessaire pour l'oxydation de la lysine) dans les tissus intestinaux de porcelets pourrait expliquer l'oxydation de la lysine par les TDVP (revue par Lobley & Lapierre, 2003) mais les mécanismes expliquant son oxydation entérale spécifique sont inconnus. Enfin, l'oxydation de la phénylalanine par le tube digestif n'a pas été démontrée chez les Ruminants (Lobley et coll., 2003 ; El-Kadi et coll., 2006) même si plus de 40 % de son apport par voie entérale est oxydée chez le porcelet (Bush et coll., 2003).

2.1.4.2. Synthèse des protéines dans les TDVP

Dans le cas d'un animal à l'entretien ou en faible croissance, la masse du tube digestif reste constante. Par conséquent, à l'échelle de la journée, le prélèvement des AA pour la synthèse protéique dans l'aire digestive est compensé par l'apport d'AA liée à la protéolyse. Mise à part la synthèse des protéines exportées, l'analyse des bilans nets ne permet pas de déterminer l'activité de synthèse et de dégradation des protéines constitutives du tube digestif. L'utilisation des traceurs est donc nécessaire pour estimer la vitesse de synthèse des protéines dans l'aire digestive.

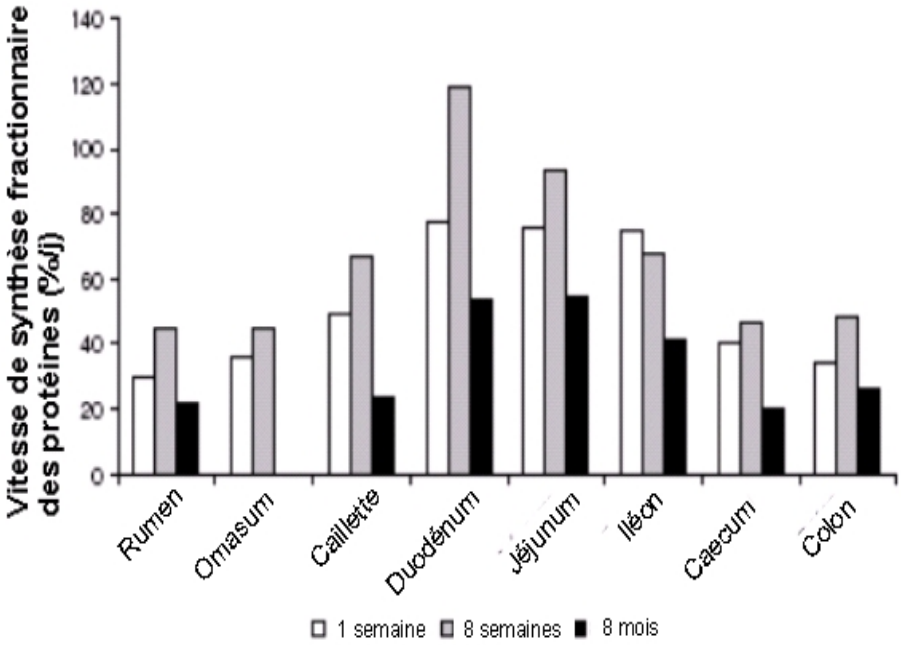
Dans l'ensemble des TDVP, le tube digestif est le tissu qui contribue le plus à l'activité de synthèse protéique. La taille du tube digestif peut varier notamment après un repas chez les Monogastriques (Luiking & Deutz, 2007) ou selon le niveau d'alimentation chez les Ruminants (Kamalzadeh et coll., 1998). La masse protéique des tissus intestinaux représente environ 4 % de la masse protéique corporelle chez les préruminants et cette valeur monte à 6-8 % chez les Ruminants (Lobley et coll., 1980 ,1993 ; Attaix, 1988 ; MacRae et coll., 1993). A cause d'un turnover protéique intense, les TDVP contribuent à près de 26 % de la synthèse des protéines corporelles chez le ruminant (Lobley et coll., 1980 et 1993; Attaix, 1988) et 12 % chez le pré-ruminant (Attaix & Arnal, 1987 ; Lobley, 1993) (Figure 25).

Figure 25 Contribution des tissus splanchniques et du muscle à la synthèse protéique du corps entier (exprimé en pourcent) chez l'agneau (1 semaine) et le mouton (8 mois) (MacRae, 1996).



De nombreuses études ont mesuré la synthèse protéique de l'aire splanchnique par la technique d'injection d'un AA marqué en surcharge. Avec cette technique, sont mesurées simultanément la synthèse des protéines endogènes et des protéines exportées (**cf partie 1.2.2.2.**). La vitesse fractionnaire de synthèse des protéines du tube digestif chez l'agneau sevré ou non est supérieure à 20 % / jour et est très variable selon les segments du tube digestif considérés (Figure 26). En effet, elle oscille entre 20 et 40 % / jour pour le rumen et le tube digestif distal mais peut être supérieure à 100 % pour le duodénum. L'activité de synthèse protéique a ainsi été mesurée dans les différents segments du tube digestif :

Figure 26 Synthèse protéique fractionnaire (%/jour) dans l'aire digestive d'agneaux nourris au lait (pré-ruminants d'1 semaine,) ou sevrés (8 semaines et 8 mois) (Extrait de Attaix et coll., 2005).



- Pré-estomacs : Le développement du rumen est rapide et stimulé par l'alimentation et la mise en place de la fermentation microbienne. Ceci explique que le rumen représente 7 % du poids des tissus digestifs chez l'agneau nourri au lait alors qu'elle atteint la valeur de 30 % chez des agneaux sevrés (8 semaines) (Attaix et coll., 1988). Après sevrage, le développement du rumen est lié à une augmentation de la synthèse protéique (augmentation de l'efficacité et de la capacité ribosomale (Attaix et coll., 1988)).

- Caillette : Le métabolisme protéique de la caillette est dominé par la secrétion des enzymes digestives (pepsine, lysosyme …) et des mucines, ce qui explique que chez le jeune Ruminant, la vitesse de synthèse fractionnaire (% / jour, FSR) est 8 fois supérieure dans la muqueuse que dans la séreuse (Attaix et coll., 1988).

- L'intestin grêle : Ce segment présente la valeur de FSR la plus élevée qui s'explique par le turnover des cellules épithéliales, la synthèse des enzymes et des mucines de la bordure en brosse et la présence de cellules immunitaires. Ainsi, comme pour la caillette, la FSR de la muqueuse est très supérieure à celle de la séreuse (Lobley et coll., 1994). La FSR décroît du duodénum à l'iléon (Figure 26).

- Gros intestin : Chez les agneaux sevrés de 8 semaines, le gros intestin représente 13 % de la masse protéique de l'aire digestive et 9 % de la vitesse absolue de synthèse protéique (Attaix et coll., 1988). Chez le mouton adulte, les valeurs correspondantes sont de 22 % (Nozière et coll., 1999) et 18 % (Lobley et coll., 1994).

Des données plus parcellaires suggèrent que la masse des tissus digestifs est probablement modulée également par la protéolyse (Attaix et coll., 1992 ; Samuels et coll., 1996).

Les protéines constitutives et surtout exportées des TDVP ont une composition en AA particulière : elles sont plus riches en proline, glutamate, glycine, aspartate, serine et thréonine relativement aux autres protéines corporelles (Mariscal-Landin et coll., 1995 cité par Le Floc'h & Sève, 2000). Le prélèvement important en thréonine pourrait donc également s'expliquer (en plus d'une oxydation par le pancréas montrée dans le paragraphe précédent) par sa forte teneur dans les protéines secrétées dans le lumen du tube digestif comme les mucines. Ainsi, chez la vache laitière, un peu moins de la moitié de la phénylalanine, méthionine et leucine digestibles dans l'intestin apparaît au niveau portal et le pourcentage est encore plus faible pour la thréonine (environ 25 %) qui est utilisée pour la synthèse protéique endogène et exportée du tube digestif et de plus est oxydée dans le pancréas.

La synthèse de protéines endogènes secrétées par le tube digestif entraîne donc une perte nette d'AA pour l'organisme car ces protéines sont peu digérées et peu réabsorbées. La synthèse de ces protéines exportées (particulièrement riches en thréonine en particulier), associée à une oxydation de certains AA (leucine, methionine, glutamine, thréonine) dans le tube digestif entraîne de plus une modification du profil en AA apparaissant en veine porte. En revanche, et d'un point de vue quantitatif, le recyclage de l'azote uréique permet d'augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote chez les ruminants en favorisant la synthèse d'AA d'origine microbienne. Ainsi, la combinaison de l'ensemble de ces phénomènes affecte quantitativement et qualitativement le profil en AA absorbés.

2.2. Le foie

2.2.1. Anatomie et physiologie hépatique

Le foie représente 2 à 3 % du poids total d'un ovin adulte (MacRae et coll., 1993). Cette masse est due, pour près de 25 %, à du sang, car cet organe est le plus richement vascularisé de l'organisme (Lobley et coll., 2000). Le foie est constitué d'une capsule conjonctive (capsule de Glisson) qui forme des sillons délimitant quatre lobes. Il est impliqué dans de nombreux processus métaboliques et physiologiques indispensables dans l'organisme comme résumé dans le Tableau 6. Cependant, seul son rôle dans le métabolisme et le remaniement des nutriments azotés sera détaillé ici.

Tableau 6 Fonctions du foie (Hecketsweiler & Hecketsweiler, 2004)

- **Métabolisme des sucres** :

  * Néoglucogenèse (synthèse de glucose)
  * Glycogénogenèse (synthèse du glycogène)
  * Glycogénolyse (dégradation du glycogène)

- **Métabolisme des composés azotés** :
  * Uréogenèse (élimination de l'ammoniaque et catabolisme des acides aminés)
  * Synthèse protéique : synthèse des protéines hépatiques constitutives et exportées. Parmi les protéines exportées : albumine, protéines de la réaction inflammatoire (ex : facteurs de la coagulation dont le fibrinogène)

- **Métabolisme des lipides :**
  * Synthèse de cholestérol
  * Dégradation du cholestérol en acides biliaires
  * Production de triglycérides
  * Synthèse de lipoprotéines

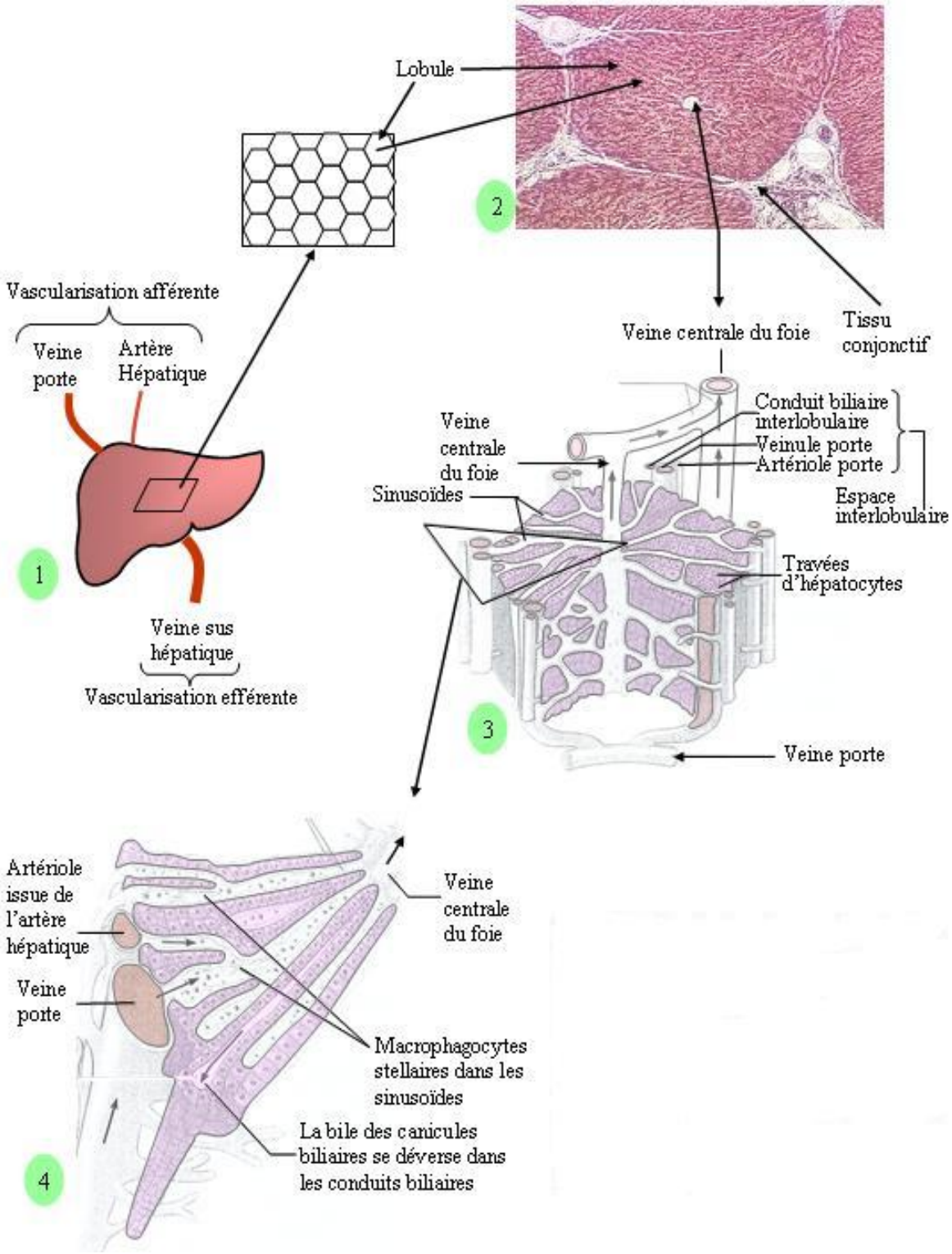
- **Métabolisme d'autres molécules :**
  * Dégradation de l'insuline et autres hormones
  * Destruction de l'hémoglobine (et élimination de la billirubine dans la bile)
  * Dégradation de substances toxiques (dont l'ammoniaque cité plus haut)

- **Synthèse de la bile** (émulsion et absorption des lipides). Une partie de la bile est secrétée dans le duodénum et une partie est stockée dans la vésicule biliaire

- **Stockage** de nombreuses substance : glucose (glycogène), vitamine B12, fer, cuivre

Figure 27 Anatomie macro et microscopique du foie (d'après Marieb, 1999)

1) Vascularisation afférente et efférente au foie
2) Microphotographie d'un lobule hépatique
3) Lobule hépatique (les flèches indiquent le sens de circulation sanguine)
4) Partie d'un lobule hépatique montrant les composantes de l'espace interlobulaire (les flèches indiquent le sens de la circulation sanguine)



Le foie est composé de 4 types cellulaires différents : les hépatocytes (type cellulaire le plus répandu), les macrophages (cellules de Kupffer), les cellules endothéliales (le long de l'espace de Disse) et des adipocytes (cellules de Ito) (Jungermann & Kietzmann, 1996). La plus petite unité fonctionnelle du foie est l'acinus (ou lobule) (Figure 27). Les acini se présentent sous forme d'hexagone et regroupent des hépatocytes. En périphérie du lobule se trouvent les vaisseaux afférents au foie (et le conduit biliaire) alors qu'au centre se trouve la veine centrale qui rejoint ensuite la veine sus-hépatique. A une échelle macroscopique, le sang afférant au foie arrive pour 75-95 % via la veine porte chez les Ruminants, le reste arrivant via l'artère hépatique (Barnes et coll., 1986 ; Reynolds, 1995). Ces vaisseaux se rejoignent au niveau du hile du foie sur la face inférieure du foie (Ortigues-Marty et coll., 2003a). Après être passé par les lobules hépatiques, le sang quitte le foie via les veines sus-hépatiques au niveau de la face postério-supérieure.

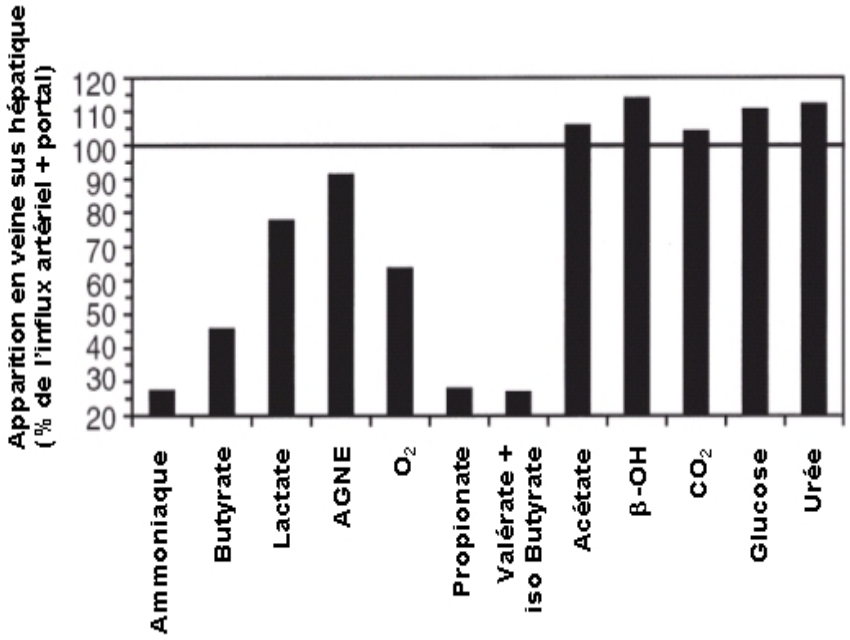
Un élément très important de l'architecture hépatique est qu'il existe une zonation spatiale d'hépatocytes au sein des lobules (Figure 27). En effet, au sein même d'un lobule, des hépatocytes périportaux et les hépatocytes périveineux co-existent. Les premiers représentent près de 90 % des hépatocytes totaux (Jungermann & Katz, 1989). A cette zonation spatiale se surajoute une zonation métabolique. Les hépatocytes périportaux étant les premiers à recevoir le sang provenant de la veine porte. Ainsi, à travers les hépatocytes périportaux et périveineux, un gradient se met en place pour les différents métabolites traversant le foie. La tension partielle en oxygène passe de 65 mm de mercure à 35 mm de mercure (Jungermann & Katz, 1996). La concentration en ammoniaque chute également d'environ 85 % alors que celle en AA et en glucose est plutôt constante du fait d'une utilisation et d'une production concomitante (Jungermann & Kietzmann, 1996). Les hépatocytes périportaux contiennent les 5 enzymes du cycle de l'urée (Figure 12) et la glutaminase mitochondriale (Lobley et coll., 2005). Ces enzymes ne sont pas présentes dans les hépatocytes périveineux, suggérant que l'uréogenèse serait spécifique des hépatocytes périportaux. A l'inverse, les hépatocytes périportaux, bien qu'ils possèdent des transporteurs pour la plupart des AA, n'ont pas de transporteur pour l'aspartate et le glutamate alors que les hépatocytes périveineux possèdent ces transporteurs ainsi que la glutamine synthétase cytosolique (Häussinger et Gerok, 1983). Enfin, alors que les hépatocytes périportaux expriment les ARNm de diverses protéines exportées (dont l'albumine) (Gebhardt, 1992 ; Jungermann & Kietzmann, 1996), l'ARNm de l'albumine n'est pas présent dans les hépatocytes périveineux. Il existe donc une zonation du métabolisme de l'urée, de certains AA et des protéines exportées.

2.2.2. Utilisation/émission nette hépatique des nutriments azotés

2.2.2.1. Aspects quantitatifs

La Figure 28 résume des données de la littérature concernant les bilans nets hépatiques en nutriments. L'ammoniaque apparaissant en veine porte est quasiment totalement prélevé par le foie (Hanigan, 2005). Lapierre et coll. (2005) estiment que le prélèvement net hépatique moyen d'AA est de 45 % (16 à 69 %) de l'apparition portale chez la vache laitière. Du fait d'une extraction nette hépatique d'AA importante et comme le foie est situé physiologiquement entre l'absorption des nutriments par le tube digestif et l'utilisation de ces nutriments par les tissus périphériques (mamelle, muscles), il a longtemps été condidéré comme ayant un rôle prépondérant et régulateur de la biodisponibilité en AA pour les tissus périphériques.

Figure 28 Efflux hépatique en différents nutriments sanguins (concentration en nutriment dans la veine hépatique x débit en veine hépatique) comparé à l'influx hépatique ([concentration en veine porte + concentration en artère hépatique] x débit en veine hépatique) (d'après Hanigan, 2005).



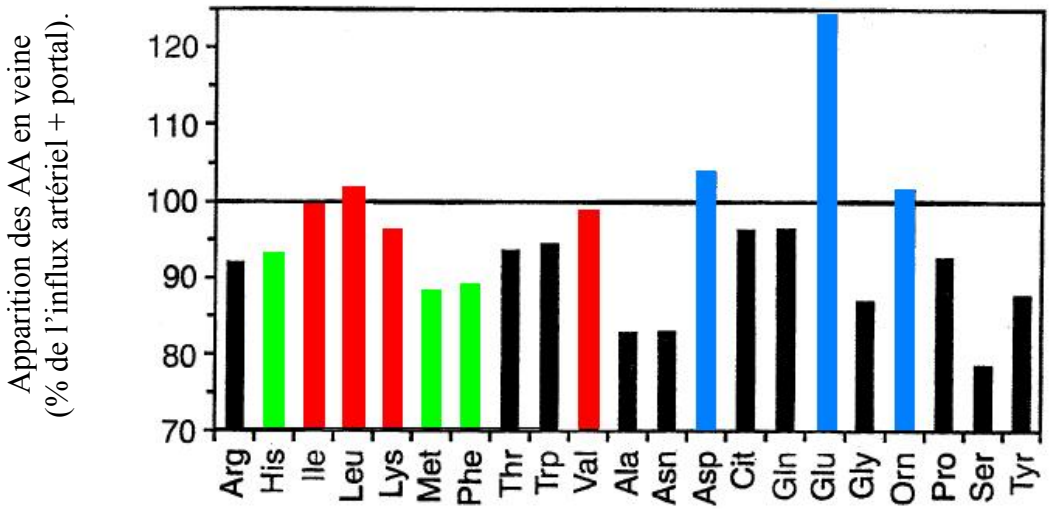
Cependant, le taux d'extraction net hépatique relatif à l'apparition nette portale correspond à un prélèvement moyen sur la journée et n'est en aucun cas une donnée dynamique. Ainsi, à chaque passage du sang au travers du foie, le prélèvement net hépatique est beaucoup plus faible (de l'ordre de 5-25 % de l'apport artériel d'AA au TDVP chez les bovins, ovins et porcs (Lobley (2003) et Reynolds (2006)). De cette observation, nous pouvons donc conclure que le foie prélève une quantité relativement importante des AA fournis par la veine porte à chaque passage de ces AA dans le foie, mais qu'une fraction substantielle reste cependant disponible pour les tissus périphériques suite à chaque passage des nutriments dans le foie (Reynolds, 2002 ; Lobley &

Lapierre, 2003). Le rôle du foie en tant que régulateur de la biodisponibilité des AA vis-à-vis des tissus périphériques est donc à réévaluer (Lobley, 2003). De plus, du fait des nombreux cycles que font les AA dans l'organisme, les AA arrivant au foie via la veine porte proviennent essentiellement de l'artère irrigant les TDVP (et non de l'alimentation) (Reynolds, 2006), le foie peut donc être considéré comme un compétiteur pour l'utilisation des AA artériels au même titre que les autres tissus et organes.

2.2.2.2. Données qualitatives

Une grande variabilité dans le prélèvement net hépatique des AA individuels est également constatée. Ceci a pour conséquence que le profil en AA afférents et efférents du foie est largement modifié (Figure 29 ; Hanigan et coll., 2005). Parmi les AANI, certains présentent une utilisation nette par le foie : alanine, asparagine, glycine, serine. D'autres AANI présentent une émission nette comme l'aspartate et l'ornithine et surtout le glutamate qui interviennent dans les échanges interorganes en carbone et azote (Hanigan et coll., 2005). En ce qui concerne les AAI, ils présentent globalement un captage net par le foie à l'exception notoire des AACR et de la lysine tant chez les Ruminants (Wray-Cahen et coll., 1997 ; Savary-Auzeloux et coll., 2003a) que chez les Monogastriques (Bruins et coll., 2003).

Figure 29 Efflux hépatique (concentration en nutriment dans la veine hépatique x débit en veine hépatique) d'acides aminés individuels comparé à l'influx hépatique ([concentration en veine porte + concentration en artère hépatique] x débit en veine) (d'après Hanigan, 2005)



en bleu les AA non indispensables qui sont produits (sur une base nette) par le foie,
en rouge les AA indispensables qui sont peu captés par le foie (<10% de l'influx),
en vert les AA indispensables qui sont très captés par le foie (>90% de l'influx).

Le prélèvement net hépatique en AA est important. Il représente presque la moitié de l'apparition nette d'AA en veine porte. Il est variable selon les AA (faible pour les AACR et la lysine, plus important pour les autres AAI). Le prélèvement net d'AA par le foie peut s'expliquer par : 1) une utilisation des AA vers les voies anaboliques hépatiques, c'est-à-dire la synthèse des protéines hépatiques constitutives et exportées et la néoglucogenèse. 2) le maintien de l'eu-aminoacidémie dans l'organisme et la détoxification de l'ammoniaque permettant de maintenir, sur le court terme, un équilibre homéostatique compatible avec la vie de l'animal. Ceci implique la déamination des AA présents en excès dans l'organisme et l'élimination de leur azote via la synthèse d'urée. Les chaînes carbonées de ces AA sont ensuite catabolisées en CO_2. Les différentes voies d'utilisation majeures des AA dans le foie sont détaillées ci-dessous.

2.2.3. Synthèse protéique hépatique

2.2.3.1. Synthèse des protéines totales

La vitesse de synthèse fractionnaire des protéines hépatiques est environ 5 fois plus rapide que celle du muscle chez différentes espèces (Lobley et coll., 1980 ; Attaix et coll., 1988 ; Baracos et coll., 1991; Ruot, 2001). Elle oscille entre 20 et 30 % / jour pour un mouton adulte (Attaix et coll., 2005) et est plus élevée (de l'ordre de 40-50 % / jour) chez le rat (Mosoni et coll., 1996; Savary et coll., 2001). Ces valeurs regroupent la synthèse des protéines constitutives et exportées. Si on suppose que toutes les protéines plasmatiques sont d'origine hépatique, il a été estimé que celles-ci représentent 38-51 % de la synthèse des protéines hépatiques totales (Connell et coll., 1997). Parmi les protéines exportées, l'albumine représente environ 45 % des protéines plasmatiques et 8-17 % de la synthèse protéique hépatique correspond à de la synthèse d'albumine (Connell et coll., 1997).

A partir des données d'émission nette des AA au niveau hépatique, il est possible de calculer la contribution potentielle d'un AA à la synthèse de protéines exportées. Ainsi, de 8 à 20 % du prélèvement net hépatique de phénylalanine et methionine et plus de 35-60 % du prélèvement net des AACR et de la lysine (Lobley & Milano, 1997 ; Connell et coll., 1997 ; Raggio et coll., 2007) sont utilisés pour la synthèse des protéines hépatiques exportées totales. L'importante contribution du prélèvement net des AACR à la synthèse protéique hépatique s'explique par leur relativement faible catabolisme dans le foie (Lobley & Milano, 1997).

2.2.3.2. Les protéines particulières

A l'exception des immunoglobulines, la quasi-totalité des protéines du plasma sont synthétisées par les hépatocytes (Ruot, 2001). Leurs concentrations plasmatiques sont variables d'une protéine à l'autre et elles jouent des rôles très divers dans l'organisme. L'albumine est la protéine plasmatique la plus abondante (environ 30 g / l chez le mouton) (Ruot 2001 ; Connell et coll.,1997). Elle assure un rôle essentiel dans la régulation de la pression osmotique du plasma ainsi que dans le transport des lipides (acides gras libres), des hormones liposolubles (comme les hormones thyroïdiennes), du calcium… Le fibrinogène (3-4 g / l chez le mouton) est également secrété par le foie et joue un rôle dans la coagulation du sang. Il représente 2-3 % des protéines plasmatiques et, à la différence de l'albumine, voit sa concentration fortement augmenter lors de l'inflammation (protéine positive de la réaction inflammatoire (Ruot, 2001)).

La vitesse fractionnaire de synthèse de l'albumine et du fibrinogène, mesurée après perfusion d'un AA marqué, est connue chez le Monogastrique (10-15 % / j pour l'albumine et 25-30 % / j pour le fibrinogène chez le porc (Jahoor et coll., 1999) ; 13-16 % pour l'albumine et 15-30 % pour le fibrinogène chez l'Homme (Thalacker-Mercer et coll., 2007 ; De Feo et coll., 1991) et le Ruminant (10 % / j et 3-4 % / j pour l'albumine chez le mouton (Connell et coll., 1997) et la vache laitière (Raggio et coll., 2007) respectivement). L'enrichissement de l'apoprotéine B100 (Apo B-100, protéine à turnover extrêmement rapide : demi-vie inférieure à 2 heures) a également été mesuré dans certaines études car il est considéré comme un bon index de l'enrichissement du compartiment précurseur de la synthèse des protéines hépatiques (Reeds et coll., 1992 ; Connell et coll., 1997 ; Ahlman et coll., 2001) (Annexe 2B).

Sauf dans de rares études (Jahoor et coll., 1996), la vitesse de synthèse *in vivo* des autres protéines plasmatiques exportées par le foie a été peu mesurée. En effet, les faibles concentrations plasmatiques en ces protéines empêchent une mesure fiable de l'enrichissement isotopique lors des études utilisant des AA marqués avec des isotopes stables. Cependant récemment, grâce à l'approche protéomique, l'enrichissement de protéines plasmatiques de faible concentration (comme la protéine C réactive) a été obtenu (van Eijk & Deutz, 2003). Par ailleurs des études *in vitro* ont permis, par l'étude du relargage des protéines exportées dans le milieu d'incubation ou par l'incorporation d'AA marqués au ^{14}C ou ^{35}S dans les protéines exportées d'hépatocytes incubés, d'estimer la vitesse de synthèse relative entre diverses protéines hépatiques (albumine, fibrinogène, transferrine, protéine C réactive, α1-antichimotrypsine, α1-glycoprotéine acide, haptoglobine) (Jeejeebhoy et coll., 1975 ; O'Riordain et coll., 1995 ; Gruffat-Mouty et coll., 1999 ; Jaleel et Nair, 2004). Cependant, du fait des difficultés méthodologiques, l'étude de la vitesse de synthèse des

protéines particulières plasmatiques de faible concentration et exportées par le foie reste un champ d'investigation très ouvert.

2.2.4. Néoglucogenèse hépatique chez le Ruminant

L'autre grande voie anabolique hépatique à laquelle participent les AA est la néoglucogenèse qui fournit l'essentiel du glucose chez le ruminant (Seal & Reynolds, 1993). L'émission nette de glucose par le foie est la conséquence de deux voies métaboliques : la synthèse *de novo* de glucose (la néoglucogenèse) et la dégradation du glycogène (glycogénolyse) (Postic et coll., 2004). Chez les Ruminants, les précurseurs majeurs du glucose néosynthétisé sont le propionate, les acides aminés, le lactate, le glycérol et le pyruvate (Majdoub, 2002).

2.2.4.1. Néoglucogenèse: spécificités du Ruminant

Le foie produit environ 85 % du glucose utilisé par l'organisme du Ruminant (Ortigues-Marty et coll., 2003 ; Bergman et coll., 1970 ; Kauffman & Bergman, 1971 cités par Milano, 1997). Le reste du glucose est produit dans le rein (Ortigues-Marty et coll., 2003b). Chez les Monogastriques la majorité du glucose utilisé est issu de l'alimentation et absorbé au niveau portal (Bruins et coll., 2003). Ainsi, chez le Ruminant et contrairement à l'Homme (Nuttall et coll., 2008 ; Wahren & Ekberg, 2007) la néoglucogenèse hépatique est maximale à l'état nourri et diminue avec le jeûne (McDowell, 1983 ; Demigné et coll., 1988 et 1991; Danfaer et coll., 1995; Lomax et coll., 1986).

2.2.4.2. Utilisation des AA dans la néoglucogenèse

Le principal précurseur hépatique du glucose néosynthétisé est le propionate dont la contribution potentielle est évaluée à 30 à 70 % (Majdoub, 2002; 70 % pour Huntington et coll., 2006), que ceci soit mesuré *in vivo* (Veenhuizen et coll., 1988) ou *in vitro* (Demigné et coll., 1991 ; Danfaer et coll., 1995). Plus de 60 % du propionate capté par le foie est utilisé pour la synthèse de glucose (Brockman, 1990 ; Demigné et coll. 1991).

L'alanine, la glutamine, le glutamate et la glycine sont les AA qui contribuent le plus à la synthèse de glucose chez les Ruminants. Leur contribution potentielle est extrêmement variable (2-40 % Lindsay, 1982 ; Danfaer et coll., 1995). Cette variabilité peut provenir soit de la différence entre contribution potentielle et contribution vraie soit de l'influence des conditions physiologiques et nutritionnelles sur l'utilisation des précurseurs. Après perfusion de ^{14}C glutamate ou ^{14}C

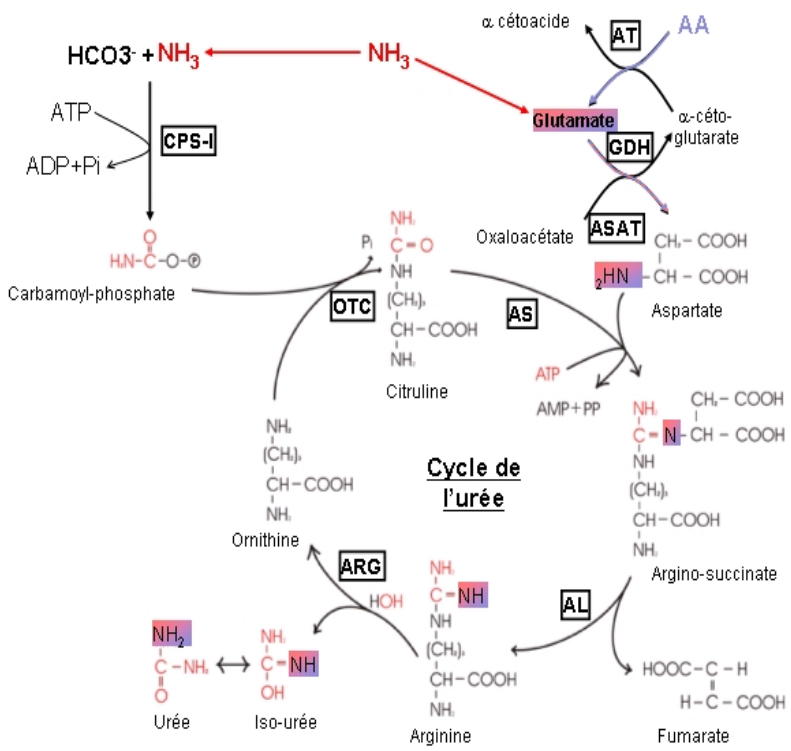
glutamine sur moutons cathétérisés, 15-20 % du turnover du glucose proviendrait des trois AA : alanine, glutamate et glutamine (Wolf & Bergman, 1972 ; Heitmann & Bergman, 1978 et 1981).

Un point important à souligner est que le propionate est uniquement d'origine exogène (dépendant des apports alimentaires via les fermentations ruminales, Reynolds, 2006) alors que les AA peuvent être d'origine soit alimentaire soit digestive soit endogène (liés à la dégradation de protéines hépatiques ou musculaires). Cette différence implique par exemple qu'une baisse des apports alimentaires (quantitatifs ou qualitatifs) et de la disponibilité en propionate peut être compensée par l'utilisation accrue des autres précurseurs néoglucogéniques, comme notamment les AA, d'origine partiellement endogène.

2.2.5. Catabolisme des AA et uréogenèse à partir des AA et de l'ammoniaque

La dégradation de la plupart des AA commence par le clivage et l'incorporation du groupement NH_2 dans la voie d'uréogenèse. Le cycle de l'urée et les enzymes associées est détaillé en Figure 30. Les carbones peuvent être exportés vers les tissus périphériques sous forme de glucose (voir partie précédente) ou oxydés (Milano, 1997). Une première partie concernera l'activité d'uréogenèse chez les ruminant. Comme une des deux voies d'entrée de l'azote dans le cycle de l'urée est l'aspartate, une deuxième partie sera consacrée à déterminer s'il existe un besoin incompressible d'AA pour le bon fonctionnement du cycle de l'urée. Enfin, une dernière partie sera consacrée au catabolisme des AA particuliers par le foie.

Figure 30 Cycle de l'urée et enzymes clés



Enzymes associés au cycle de l'urée.
Carbamoyl-Phosphate Synthase (CPS I)
Ornithine transcarbamylase (OTC)
Arginosuccinate synthase (AS)
Arginosuccinate lyase (AL)
Arginase (ARG)
Glutamate Deshydrogénase (GDH)
Aspartate Amino Transférase (ASAT)
Amino Transférase (AT)

2.2.5.1. Utilisation des AA et de l'ammoniaque pour l'uréogenèse

- Contribution relative des AA et de l'ammoniaque pour la synthèse d'urée

L'utilisation nette d'ammoniaque, importante au niveau hépatique, est essentielle car ce nutriment est toxique pour système nerveux central (Lobley et coll., 1995). La contribution de l'ammoniaque à la synthèse d'urée hépatique (établie à partir de la méthode des bilans artério-veineux) est comprise entre 53 et 91 % chez les bovins et seulement 7 à 37 % chez les ovins (Milano, 1997). Ces résultats impliquent donc que chez les ovins en particulier, une source alternative d'azote (les acides aminés) doit être nécessaire pour permettre la synthèse d'urée. Le captage de l'azote (sous forme d'AA et d'ammoniaque) et sa conversion en urée se font à partir du carbamoyl phosphate ou de l'aspartate, comme cela a été montré dans des études utilisant des molécules marquées au ^{15}N (Jahoor et coll., 1988; Geissler et coll., 1996 cités par Milano, 1997). Les AA peuvent donc transférer leur azote aminé vers l'aspartate par transamination (ex : alanine) ou indirectement (glutamate) via l'activité de l'aspartate amino transferase (Figure 30). Concernant l'ammoniaque, il a deux origines : 1) apport d'ammoniaque directement via la veine porte (activité des micororganismes ruminaux) et 2) déamination de la glutamine, glycine, lysine, asparagine et histidine (Milano, 1997). Ainsi, l'utilisation des AA dans la voie d'uréogenèse est fortement imbriquée avec la détoxification de l'ammoniaque en urée.

- Efficacité du mécanisme de détoxification de l'ammoniaque : zonation hépatique

Comme précisé dans la **partie 2.2.1.**, les hépatocytes périveineux et périportaux semblent chacun avoir un rôle distinct dans la dégradation des AA et le cycle de l'urée. En effet, CPS-I, présente dans les nombreux hépatocytes périportaux, présente une forte capacité (mais faible affinité : 1-2 m*M*) pour prélever l'ammoniaque. Au contraire, la glutamine synthétase (**GS**) présente dans les moins nombreux hépatocytes périveineux (avec une forte affinité pour l'ammoniaque : <0.5 m*M* chez les monogastriques) (Lobley et coll., 2000) est un deuxième système complémentaire de capture de l'ammoniaque. Ce second système permet de capter la faible part d'ammoniaque qui aura échappé au cycle de l'urée (Lobley et coll., 1995). Ces deux mécanismes complémentaires permettent d'éviter l'hyperammoniémie périphérique qui peut avoir comme conséquence une perte d'appétit, l'infertilité, le coma, et la mort (Lobley & Milano, 1997). Ces mécanismes ont montré toute leur efficacité car comme précisé dans la **partie 2.2.2.1.**, l'extraction nette hépatique d'ammoniaque est proche de son apparition nette portale (Parker et coll., 1995) (75-85 % ; Reynolds et coll., 1991). Une étude utilisant une perfusion d'ammoniaque-^{15}N a même montré que 98 % de l'ammoniaque était prélevé à chaque passage au travers du foie (Nieto et coll., 1996) chez des moutons nourris au foin à 1,4 x l'entretien. L'ammoniaque détoxifié dans le foie se

retrouve ainsi majoritairement en urée et, dans une moindre mesure, en glutamine (Lobley & Milano, 1997).

- Y-a-t-il un besoin obligatoire d'AA pour la synthèse d'urée ?

Comme nous l'avons montré précédemment, les azotes de l'urée proviennent du carbamoyl phosphate et de l'aspartate. Ceci suggèrerait donc qu'il faudrait un AA catabolisé pour une molécule d'ammoniaque détoxifiée lors de la synthèse de l'urée. Certaines études anciennes utilisant les bilans artério-veineux ont d'ailleurs montré *in vivo*, chez des bovins nourris avec des régimes à base de fourrage, qu'une émission nette accrue d'ammoniaque par les TDVP associée à un captage accru d'ammoniaque par le foie induisait un prélèvement accru des AA, suggérant que les AA pourraient être utilisés uniquement afin de faire fonctionner le cycle de l'urée et détoxifier l'ammoniaque (Huntington, 1989 ; Reynolds & Tyrrell, 1991 ; Reynolds et coll., 1991). Cependant, chez des Ruminants nourris avec des régimes variés, la contribution potentielle de la fraction azotée non ammoniacale à l'émission nette d'urée hépatique n'est pas de 50 % mais plutôt de 20-40 % (Burrin et coll., 1991 ; Reynolds et coll., 1991 ; Lobley et coll., 1995 ; Lobley et coll., 1996b ; Milano, 1997), suggérant (à l'inverse des étude anciennes citées ci-dessus) que l'ammoniaque doit pouvoir entrer dans le cycle de l'urée également via l'aspartate.

Comment l'ammoniaque pourrait entrer dans le cycle de l'urée via l'aspartate : grâce à la glutamate deshydrogénase. Cette enzyme permet la synthèse de glutamate à partir de l'ammoniaque et de l'α-céto glutarate. Le glutamate produit peut ensuite donner de l'aspartate à partir d'oxaloacétate grâce à l'action de l'aspartate amino-transferase (**ASAT**) (Figure 30). Des études utilisant des perfusions de bicarbonate d'ammonium (afin d'éviter une acidose métabolique) chez des moutons ont montré que l'augmentation de production d'urée (mesurée à partir d'une perfusion de $^{15}NH_4Cl$ et bilans nets hépatiques d'urée) est 1,2 fois supérieure à l'augmentation d'ammoniaque infusé sans modification de l'oxydation de la leucine (Lobley et coll., 1996b). De même, dans des hépatocytes incubés en présence de $^{15}NH_3$, l'urée [$^{15}N^{15}N$] produite est prédominante en absence d'AA, suggérant que l'azote de l'aspartate et du carbamoyl phosphate peut donc provenir de l'ammoniaque (Luo et coll., 1995). Par conséquent, il ne semble pas y avoir de besoin obligatoire en AA pour la détoxification de l'ammoniaque en excès.

Nous avons rapporté la réponse du foie à un apport massif d'ammoniaque. Qu'en est il lors d'un apport massif d'AA : peut-il y avoir une répercussion sur le prélèvement d'ammoniaque hépatique ? Une perfusion d'AA en veine mésentérique chez le mouton se traduit par une augmentation de l'émission nette d'urée (comme lors de la perfusion d'ammoniaque) avec un captage net hépatique d'ammoniaque qui reste constant (Wray-Cahen et coll., 1997) et une

aminoacidémie artérielle qui augmente (Lobley et coll., 2001). Il semble donc que l'hyperaminoacidémie soit « préférée » à l'hyperammoniémie lors de l'établissement des équilibres métaboliques (Lobley & Milano, 1997).

2.2.5.2. Oxydation des AA : devenir de la chaîne carbonée et spécificité entre AA

Il existe une grande variabilité entre AA concernant leur devenir catabolique au sein du corps entier. Les prélèvements hépatiques en phénylalanine, methionine et histidine sont conséquents par rapport au relargage en veine porte (**cf. partie 2.2.2.2.**) De plus, dans plusieurs études (Raggio et coll., 2004, Tagari et coll., 2004) l'émission nette splanchnique en histidine, methionine et phenylalanine (+ tyrosine) sont très proches des prélèvements de la glande mammaire et de la quantité d'AA présente dans les protéines de lait produites chez la vache laitière (Lobley, 2003). De nombreuses études ont montré que ces AA sont majoritairement oxydés dans le foie (Lobley & Lapierre, 2003 ; Miller, 1962). A l'inverse, le foie semble jouer un rôle plus mineur dans le catabolisme de la leucine puisque son oxydation hépatique est estimée à 3-19 % de l'oxydation corporelle contre 31-37 % oxydée dans les TDVP (Lapierre et coll., 2002). Ceci explique en particulier le prélèvement net hépatique faible en leucine. Les autres AACR et la lysine présentent également un faible prélèvement net hépatique. Les AACR (et parmi eux, la leucine qui est la plus étudiée) sont en effet connus pour être catabolisés dans de nombreux tissus et organes dont le tissu adipeux (Goodwin et coll., 1987), le muscle (Pell et coll., 1986 ; Harris et coll., 1992), la glande mammaire (Bequette et coll., 1996 ; Thivierge et coll., 2002) et les TDVP (Lobley et coll., 2003). Ainsi, et à la différence des autres AA, les fournitures post-hépatiques en AACR et lysine sont très supérieures aux prélèvements de la glande mammaire et aux quantités d'AA produites dans les protéines de lait car ces AA sont oxydés ailleurs que dans l'aire splanchnique (Lobley et coll., 2003).

Comme dans le cas des TDVP, le foie prélève quantitativement des quantités importantes d'AA et ces prélèvements nets sont variables selon les AA (faibles pour AACR et lysine, plus importants pour phénylalanine et méthionine par exemple). La faible utilisation des AACR et de la lysine s'explique par leur faible oxydation dans le foie alors que les surplus en autres AA sont catabolisés au niveau hépatique. En marge de l'oxydation, presque 20 % de la phénylalanine et de la méthionine (pourtant oxydées au niveau hépatique) et plus de 50 % des AACR sont utilisés pour la synthèse des protéines exportées, ce qui est donc une voie d'utilisation des AA dans le foie également importante. Concernant la néoglucogenèse, la part des AA néoglucogéniques dans cette voie est très variable selon l'état physiologique et nutritionnel de l'animal.

<u>Conclusion :</u> Ainsi, les tissus de l'aire splanchnique (TDVP + foie) utilisent de fortes quantités d'AA et remanient le profil en nutriments azotés présents dans l'aliment. Or, ces AA sont les substrats essentiels à la synthèse protéique dans le muscle ou la mamelle. Ce mécanisme est amplifié, chez les ruminants par la forte production d'ammoniaque (plus de 50% de l'azote apparaissant en veine porte) issu des protéines alimentaire qui n'est pas disponible directement pour la synthèse protéique tissulaire.

L'importante utilisation des AA au niveau splanchnique est donc en partie responsable de la faible efficacité de transformation des protéines alimentaires en protéines à haute valeur ajoutée (protéines de lait ou de viande). Des études nutritionnelles visant à maximiser l'émission splanchnique d'AA chez les ruminants ont donc été réalisées. La partie suivante aura donc pour objectif de détailler et comprendre les stratégies nutritionnelles qui ont été étudiées et celles qui se sont révélées les plus efficaces pour améliorer l'émission nette d'AA par les tissus de l'aire splanchnique. Les voies métaboliques directement impliquées dans ces modulations de bilans seront également détaillées.

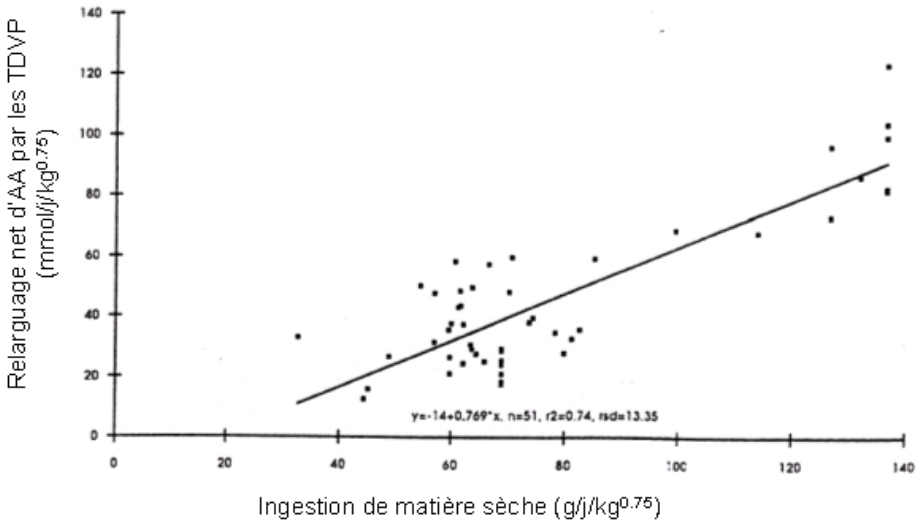
3. Régulation nutritionnelle de l'utilisation des acides aminés par l'aire splanchnique

3.1. Emission nette splanchnique d' AA, urée et ammoniaque

3.1.1. Niveau d'alimentation

Les études qui se sont intéressées à l'effet d'un changement de niveau d'alimentation sur le bilan net splanchnique en nutriments azotés chez les ruminants (Burrin et coll., 1991 ; Reynolds et coll., 1991 ; Lescoat et coll. 1996 ; Lapierre et coll., 2000, Figure 31) ont montré une augmentation proportionnelle (Lapierre et coll., 2007) de l'apparition nette portale d'ammoniaque et d'AA associée à l'augmentation du niveau d'ingestion et de la matière sèche ingérée. Au niveau hépatique, la quasi-totalité de l'ammoniaque est prélevé, quel que soit le niveau d'alimentation considéré (Lobley & Milano, 1997). Concernant les AA, le prélèvement hépatique est, par ailleurs, augmenté avec l'augmentation de l'ingestion (lorsque la nature du régime reste identique). Comme le montrent la Figure 32 et le Tableau 7 le rapport entre le prélèvement net hépatique des AA et leur émission nette par les TDVP reste constant quel que soit le niveau d'alimentation (sauf lorque celui-ci est inférieur à l'entretien). Il oscille entre 50 et 70 % dans la majorité des études chez les animaux en croissance nourris au dessus de l'entretien (Tableau 7). Malgré des prélèvements nets en AA par les TDVP et le foie importants, l'augmentation du niveau d'alimentation se traduit donc par une augmentation de l'émission nette splanchnique totale, de la biodisponibilité des AA aux tissus périphériques et de la rétention azotée globale de l'animal en croissance modérée ou adulte (Lapierre et coll., 2000 ; Savary-Auzeloux et coll., 2003c).

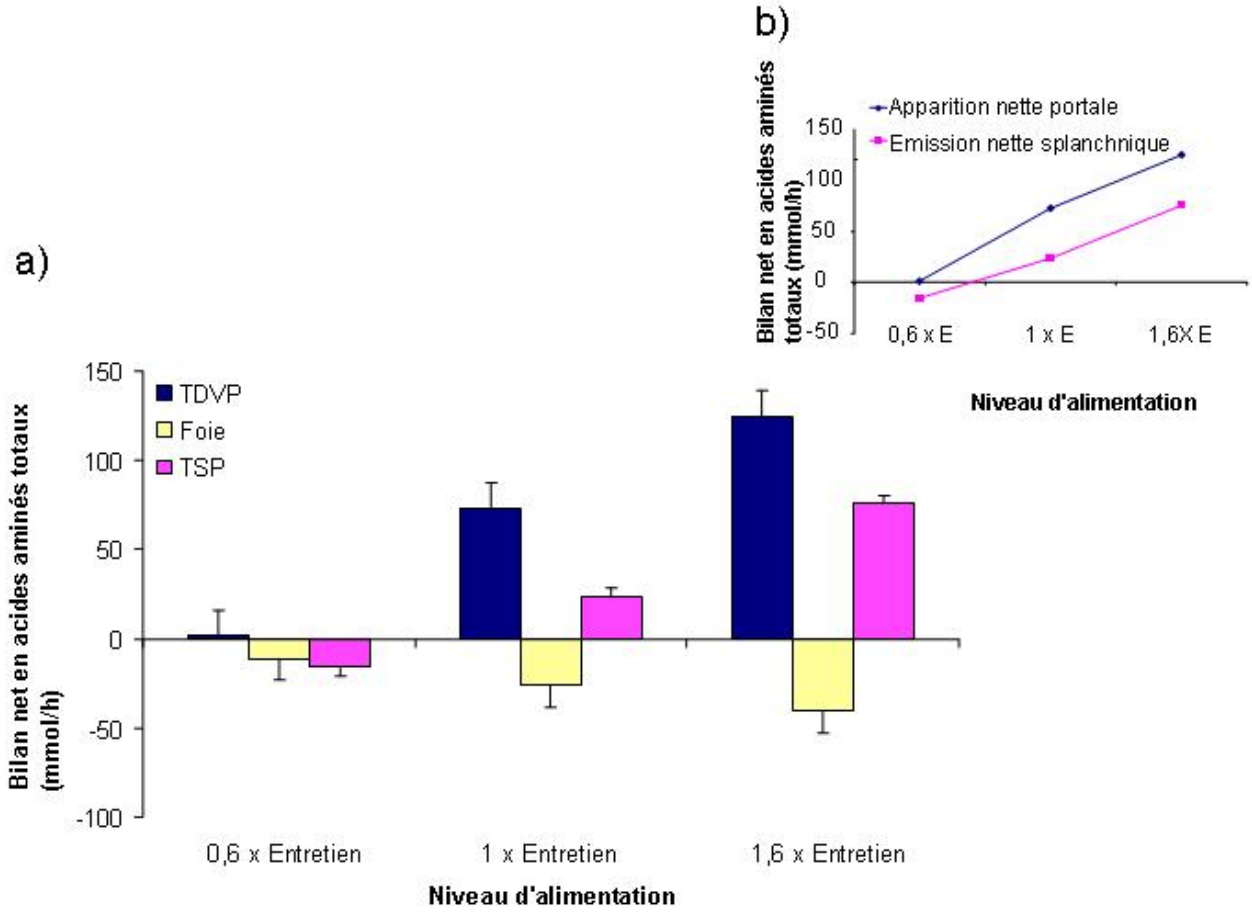
Figure 31 Relation entre l'apparition nette en acides aminés (AA) au niveau des tissus drainés par la veine porte (TDVP) et l'ingestion de matière sèche par kg de poids métabolique ($kg^{0.75}$) (Lescoat et coll.,1996)



Publication	Animaux	Régimes	Prélèvement net hépatique (% apparition nette portale)
Reynolds, 2006	Bouvillons	12% CP, 690 MJ/kg MS	54
		12% CP, 904 MJ/kg MS	33
		16% CP, 690 MJ/kg MS	51
		16% CP, 904 MJ/kg MS	66
Reynolds, 2006	Vaches laitières taries	Faible ingéré	116
		Fort ingéré	96
	Vaches laitières en lactation	Faible ingéré	***43***
		Fort ingéré	***43***
Blouin et coll., 2002	Vaches laitières	MP ingéré élevé	***24***
		MP ingéré bas	***35***
Reynolds et coll., 1991	Génisses	75% luzerne à faible ingéré (1.2 x E)	79
		75% luzerne à fort ingéré (1.9 x E)	77
		75% concentré à faible ingéré (1.2 x E)	71
		75% concentré à fort ingéré (1.6 x E)	69
Reynolds et coll., 1992	Bouvillons	Faible ingéré (1.23 x E)	63
		Faible ingéré (1.23 x E) + GH	***27***
		Fort ingéré (2 x E)	57
		Fort ingéré (2 x E) + GH	53
Bruckental et coll., 1997	Bouvillons	Témoin	69
		Témoin + caséine dans caillette	76
		Témoin + caséine caillette + GH	***36***
Taniguchi et coll., 1995	Bouvillons	Témoin (T)	73
		T + Amidon + caséine caillette	58
		T + amidon caillette + caséine rumen	59
		T + amidon rumen + caséine caillette	63
		T+ amidon et caséine rumen	69
Guerino et coll., 1991	Bouvillons	Témoin (T)	18
		T + 150 g caséine post rumen / j	61
		T + 300 g caséine post rumen / j	49
Huntington et coll., 1996	Bouvillons	Ration à 27% de concentré	52
		Ration à 63% concentré	47
Eisemann & Nienaber, 1990	Bouvillons	A jeûn	***>>100***
		Nourris	51
Lapierre et coll., 2000	Bouvillons	0.6 x Entretien	***>>100***
		1 x Entretien	46
		1.6 x Entretien	40

Tableau 7 Prélèvement net hépatique d'acides aminés totaux (ou d'azote α-aminé) en pourcent de l'apparition nette en veine porte chez les bovins.

Figure 32 Effet du niveau d'alimentation sur a) le bilan net en acides aminés libres totaux (mmol/h) au niveau splanchnique (Tissus Drainés par la Veine Porte (TDVP), Foie et Tissus Splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'acides aminés libres (mmol/h) (d'après Lapierre et coll., 2000). Pour des vaches laitières nourries à 0,6 fois l'entretien, à l'entretien ou à 1,6 fois l'entretien.



Concernant les AA spécifiques, le ratio AAI/AA totaux apparaissant en veine porte et en veine sus-hépatique reste stable (généralement entre 40 et 50 %) quel que soit le niveau d'ingestion (Lapierre et coll., 2000 ; Reynolds et coll., 1994b ; Bruckental et coll., 1997), suggérant que le profil en AA est peu modulé par ce facteur. Il est constaté, cependant, que le captage hépatique net d'AA comme la phénylalanine, la méthionine est augmenté avec l'augmentation d'ingéré alors que celui des AACR et de la lysine, reste relativement faible et stable (Lapierre et coll., 2000 ; Savary-Auzeloux et coll., 2003c). Enfin, on peut remarquer que la contribution potentielle de l'ammoniaque à la synthèse d'urée est assez stable lorsque le niveau d'alimentation est altéré (56 à 63 % chez Lapierre et coll., 2000 ; 53 à 62 % chez Reynolds et coll., 1991 ; et 28 à 37 % chez Burrin et coll., 1991).

L'augmentation du niveau d'alimentation se traduit également par une augmentation de l'émission nette d'urée par le foie proportionnelle au prélèvement hépatique d'AA, avec une contribution des AA à la production d'urée augmentée (Burrin et coll., 1991 ; Reynolds et coll., 1991 et 1992a ; Lapierre et coll., 2000).

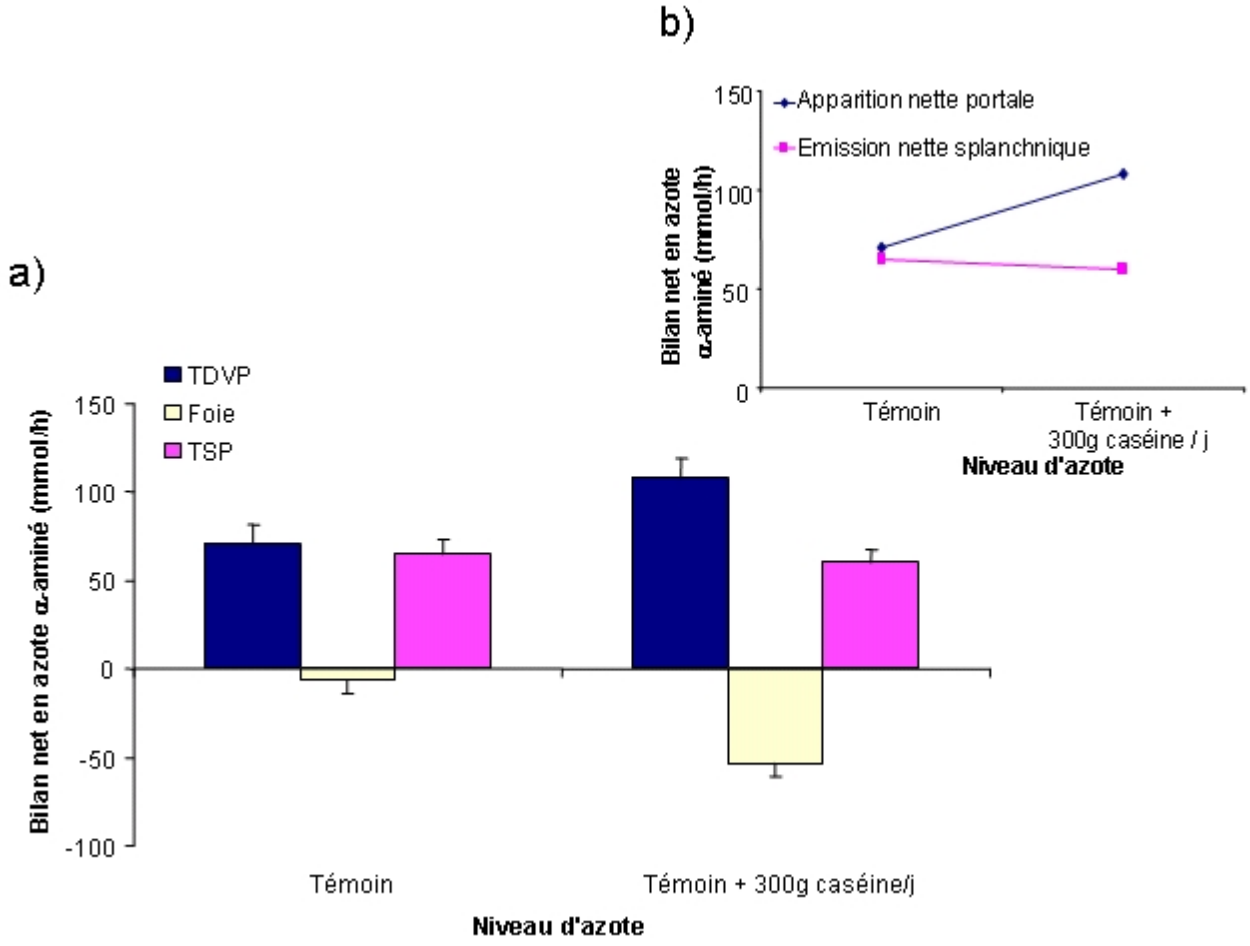
Les concepts développés dans le début de ce paragraphe ne sont plus valables à des niveaux d'alimentation inférieurs à l'entretien. Dans ce cas, l'apparition nette portale d'AA est faible ou presque nulle (jeûne ou niveau d'alimentation inférieur aux besoins d'entretien des animaux, Lapierre et coll., 2000 ; MacRae et coll., 1997b ; Huntington & Prior, 1985) et le foie extrait plus d'AA que les quantités apparaissant en veine porte (Koeln et coll., 1993 ; Lapierre et coll., 2000; Ferrell et coll., 1999 et 2001) (Figure 32). Le couple glutamine/glutamate présente un captage net par les TDVP important à un faible niveau d'alimentation (Burrin et coll., 1991 ; Lapierre et coll., 2000) et seuls la citruline et l'ornithine présentent des apparitions nettes portales notables et peu influencées par le faible niveau alimentaire (Lapierre et coll., 2000).

3.1.2. Niveau d'apport protéique dans la ration

Dans un objectif de favoriser l'efficacité de production (lait ou viande) chez les Ruminants, des stratégies d'apport de protéines peu dégradées dans le rumen, favorisant l'absorption d'AA au niveau portal, ont été étudiées. Expérimentalement, ces études ont consisté en la founiture de protéines « protégées » ou non des dégradations ruminales (Raggio et coll., 2004 ; Ferrell et coll., 1999 et 2001) ou de perfusion de caséine dans la caillette (évitant ainsi la dégradation ruminale des protéines) (Bruckental et coll. 1997 ; Taniguchi et coll., 1995 ; Guerino et coll., 1991). Comme montré dans la Figure 33, si les apports énergétiques associés sont suffisants relativement aux besoins des animaux, les supplémentations en protéines induisent une augmentation de l'apparition portale d'AA (Raggio et coll., 2004; Tagari & Bergman, 1978; Reynolds, 2006). Cependant, le ratio entre le prélèvement hépatique des AA et l'apparition nette portale en AA augmente (Guerino et coll., 1991; Bruckental et coll., 1997), ce qui a pour conséquence une réduction (ou pas d'augmentation) de l'émission nette splanchnique d'AA. Ainsi, ces études montrent que le supplément d'AA apporté est préférentiellement utilisé par les tissus de l'aire splanchnique et non par les tissus périphériques. Ceci est cohérent avec les résultats de Raggio et coll. (2004) qui montrent une diminution de l'efficacité du transfert des AA alimentaires vers les protéines de lait lors d'une supplémentation en protéines dans l'alimentation de vaches laitières. Concernant les AA particuliers, dans cette même étude, le prélèvement net hépatique de phénylalanine, méthionine et histidine augmente linéairement avec la supplémentation en protéines dans l'alimentation alors que

les prélèvements nets hépatiques en AACR et lysine, faibles, sont insensibles aux régimes (Raggio et coll., 2004).

Figure 33 Effet d'une supplémentation protéique dans la caillette sur a) le bilan net en azote α-aminé (mmol/h) au niveau splanchnique (tissus drainés par la veine porte (TDVP), Foie et tissus splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'azote α-aminé (mmol/h) chez des bouvillons (d'après Guerino et coll., 1991).



L'apparition nette portale d'ammoniaque est stable ou faiblement augmentée lors des supplémentations en protéines dans la ration (Raggio et coll., 2004; Bruckental et coll., 1997; Guerino et coll., 1991). Par contre, l'émission hépatique d'urée est augmentée (+ 72 % chez Bruckental, et coll., 1997), suggérant une augmentation de l'utilisation des AA pour la synthèse d'urée, ce qui est cohérent avec l'augmentation de prélèvement hépatique d'AA. De même, si des AA sont directement apportés par infusion mésentérique, ils sont plus prélevés par le foie, et une augmentation significative de l'émission nette d'urée est également observée (Wray-Cahen et coll., 1997; Lobley et coll., 1998). Dans certains cas, comme le montre Guerino et coll. (1991), la perfusion de 150 g/j de caséine dans la caillette de bouvillons se traduit par une augmentation de

captage d'AA par le foie sans effet notable sur l'uréogenèse. L'uréogenèse est par contre augmentée lors de la perfusion de 300 g/j de caséine. Ainsi, les AA fournis en excès des besoins sont catabolisés par le foie (urée) et peuvent être utilisés dans d'autres voies métaboliques (anaboliques ?) lorsque les supplémentations permettent de combler un besoin non couvert par le régime de base (comme dans le cas de Guerino et coll., 1991).

3.1.3. Impact de la nature du régime et dégradabilité de l'azote de la ration

3.1.3.1. Fourrage vs concentré

La nature du régime, et en particulier le ratio entre la part de fourrage et de concentré apporté dans le régime peut influencer la quantité d'ammoniaque absorbé et le ratio entre ammoniaque et AA apparaissant en veine porte (Bohnert et coll., 1999; Ferrell et coll., 1999 et 2001; Reynolds et coll. 1991; Reynolds & Tyrell, 1991; Huntington, 1989). Seul Huntington et coll. (1996) ne montrent pas de modification du ratio entre ammoniaque et AA apparaissant en veine porte chez des bouvillons nourris avec un régime à 27 % ou 63 % de céréales.

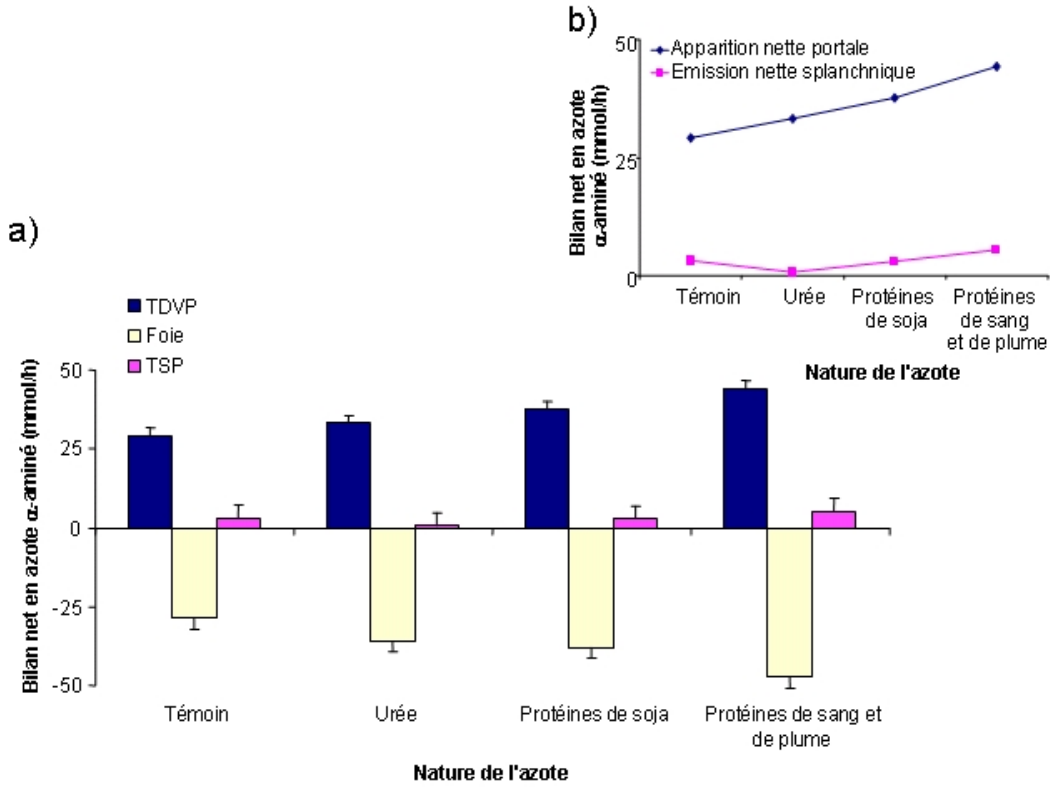
Dans la majorité de ces études, l'apparition nette en AA en veine porte est peu modifiée mais une augmentation de l'apparition nette portale en ammoniaque est constatée avec les régimes riches en fourrages (Lapierre & Lobley, 2001). Ceci se traduit par une augmentation de l'émission hépatique d'urée pour détoxifier l'afflux accru d'ammoniaque (Huntington, 1989; Reynolds et coll., 1991; Huntington et coll., 1996). Dans deux études (Huntington, 1989 et Reynolds et coll., 1991), le prélèvement hépatique d'AA est aussi augmenté dans le cas de régimes riches en fourrages. L'ensemble de ces données suggère un lien entre l'uréogenèse hépatique et une utilisation « nécessaire » des AA dans cette voie catabolique dans des régimes à base de fourrages (Lapierre & Lobley, 2001).

Aucune conclusion n'est possible concernant le recyclage de l'urée au niveau des TDVP car il est augmenté (Huntington et coll., 1996), diminué (Huntington, 1989) ou non modifié (Reynolds et coll., 1991) avec un régime riche en fourrages. La grande variabilité de réponse des animaux à l'apport de céréales ou de fourrages selon les études n'est pas surprenante dans la mesure où en plus de moduler la forme d'azote apportée aux animaux, les niveaux azotés et énergétiques donnés aux animaux peuvent varier entre les deux régimes (Reynolds et coll., 1991 ; Reynolds & Tyrell 1991) ou non (Huntington et coll., 1996). De plus le terme « fourrages » et « concentrés » cache une grande variabilité en teneur, composition en azote et en dégradabilité ruminale de l'azote.

3.1.3.2. Impact de la dégradabilité de l'azote

Afin de mieux comprendre le devenir dans les tissus splanchniques de différentes formes d'azote ingérées par des ruminants, des supplémentations contrôlées en divers types de protéines ont été réalisées dans une même étude: urée, protéines dégradables ou non dans le rumen (Bohnert et coll., 1999; Ferrell et coll., 1999 et 2001; Atkinson et coll., 2007). L'effet de dégradabilité des protéines sur l'apparition nette portale d'AA est difficile à mettre en évidence. En effet, à apports azotés égaux, l'apparition portale en azote α-aminé est peu ou pas modulée par la dégradabilité de l'azote (les extrêmes employés étant l'urée d'une part et les protéines de sang, de plume et corn gluten meal d'autre part) (Ferrell et coll., 1999 et 2001; Bohnert et coll., 1999) (Figure 34). Dans ces mêmes études, l'extraction hépatique d'AA n'est également pas modulée, et la biodisponibilité en AA pour les tissus périphériques n'est pas modifiée.

Figure 34 Effet de la nature de l'azote dans la ration sur a) le bilan net en azote α-aminé (mmol/h) au niveau splanchnique (tissus drainés par la veine porte (TDVP), foie et tissus splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'azote α-aminé (mmol/h) chez des moutons. (D'après Ferrell et coll., 2001).



Concernant les quantités d'ammoniaque apparaissant en veine porte, elles peuvent augmenter lorsque des protéines dégradables dans le rumen sont supplémentées à un régime à base de fourrages de mauvaise qualité (Bohnert et coll., 1999; Ferrell et coll., 1999). Par contre, aucun effet de la dégradabilité des protéines supplémentées n'est observé sur l'apparition portale en ammoniaque lorsque le régime de base fourni aux animaux est riche en céréales (Bohnert et coll.,

1999; Ferrell et coll., 2001). La nature du régime de base semble donc expliquer ces différences (Lapierre & Lobley, 2001). Enfin, le degré de dégradabilité de l'azote supplémenté aux animaux ne semble pas avoir d'impact sur le recyclage de l'urée dans les TDVP (Bohnert et coll., 1999; Ferrell et coll., 1999 et 2001).

3.1.4. Impact d'une supplémentation énergétique

Comme cela a été précisé dans les paragraphes précédents, l'apport quantitatif et qualitatif en énergie dans la ration est un paramètre important dans l'utilisation métabolique de l'azote de la ration. En particulier, un apport énergétique adapté a un impact majeur sur l'activité des microorganismes ruminaux qui peuvent ainsi utiliser avec une efficacité optimale l'azote qui est à leur disposition (Lapierre & Lobley, 2001). Ainsi, une supplémentation en énergie rapidement fermentescible se traduit par une augmentation du transfert d'urée dans le rumen (Kennedy & Milligan, 1980; Rémond et coll., 1996). La question est de savoir si cet azote recyclé sera utilisé pour produire des protéines bactériennes et donc à terme des AA. Chez des Ruminants nourris avec un régime à 11 % de protéines, une augmentation de l'apport énergétique dans la ration se traduit par une augmentation du recyclage de l'urée et de l'absorption en AA (Reynolds et coll., 1992b). De même, lorsque des animaux sont nourris avec des graines de sorgho ou maïs ayant subi ou non un processus de « steam-flaking » (qui augmente la proportion d'amidon dégradable dans le rumen), on assiste à une augmentation du recyclage de l'urée dans le tube digestif (Delgado-Elorduy et coll., 2002; Theurer et coll., 2002). Cependant, les résultats concernant l'émission nette portale d'AA sont plus variables (aucun effet pour Theurer et coll., 2002 et Delgado-Elorduy et coll., 2002) et une augmentation de l'apparition portale en AA pour Tagari et coll., 2004 et Alio et coll., 2000). Malgré l'absence de variation de l'apparition nette portale en AA, le processus de « steam- flaking » peut avoir un impact positif sur la rétention azotée (en pourcentage de l'azote ingéré) (Theurer et coll., 2002). Les mécanismes mis en jeu restent à élucider. D'après Lapierre & Lobley (2001), il semblerait que lorsque, sans supplémentation énergétique, le taux de conversion de l'azote alimentaire (et le recyclage d'urée correspondant) est déjà à son maximum, toute supplémentation énergétique est inefficace. Le système de recyclage d'azote, bien que très efficace, présenterait donc des limites.

D'autres études se sont intéressées à supplémenter le régime en énergie ou à perfuser directement du propionate dans le rumen afin de déterminer l'impact d'un apport énergétique seul sur les bilans nets splanchniques en acides aminés. Lors d'une supplémentation énergétique chez le mouton, ou d'une perfusion de propionate chez des bovins en croissance, l'absorption nette portale d'azote α–aminé était numériquement ou significativement augmentée (Ferrell et coll., 1999; Seal

& Parker, 1996). Une telle augmentation n'a pas été constatée dans d'autres études où seule une légère augmentation de l'apparition en AACR était observée (Savary-Auzeloux et coll., 2003b; Nozière et coll., 2000) au plus haut niveau de propionate infusé. Une diminution du catabolisme des AA (ou de certains AA comme les AACR) dans les TDVP et/ou une modification du métabolisme des microorganismes ruminaux peuvent être suspectées.

L'augmentation du niveau d'alimentation se traduit, sans réelle surprise, par une augmentation de l'émission nette splanchnique d'AA sans modification majeure du profil en AA émis et, chez les Ruminants en croissance, par une augmentation de la rétention azotée. Par contre, la supplémentation en protéines dans la ration (quelle que soit la forme d'apport) n'a pas un impact identique sur l'émission nette splanchnique d'AA. En effet, une faible augmentation de l'émission d'AA est au mieux constatée en raison d'une utilisation nette d'AA par le foie accrue. Cette absence d'effet peut être liée à une difficulté de l'organisme à utiliser les AA en supplément, en particulier lorsque le régime de base couvre déjà la majorité des besoins en azote pour la croissance ou la lactation. Elle peut aussi être liée à un déficit relatif en énergie dans la ration des animaux qui ne peuvent pas utiliser l'azote supplémentaire fourni. En effet, lors d'une augmentation d'apport d'amidon dégradable dans le rumen, le recyclage de l'azote augmente, se traduisant, dans certains cas, par un effet bénéfique sur la croissance des animaux sans modification claire de l'émission nette splanchnique d'AA. Ces résultats tendent à montrer l'importance d'approfondir les études sur les interactions entre apports énergétiques et azotés dans la ration sur le métabolisme splanchnique et en particulier hépatique des AA.

3.2. Synthèse protéique par les tissus splanchniques

3.2.1. Tissus drainés par la veine porte

Chez le Monogastrique, la synthèse protéique et la masse du tube digestif augmentent avec le niveau d'alimentation et diminuent avec le jeûne (McNurlan & Garlick, 1980; Davis et coll., 1996; Samuels et coll., 1996). Au niveau de l'ensemble des tissus composant le système digestif, la protéolyse est également impliquée dans la régulation de la masse tissulaire car une augmentation des ARNm de certaines cathepsines, de la m-calpaïne et de certains composants de la voie ATP-Ubiquitine protéasome dépendante sont stimulés au cours du jeûne chez le rat (Samuels et coll., 1996). Les données sont moins nombreuses chez les ruminants mais la vitesse de synthèse fractionnaire des protéines dans la majorité des compartiments du tube digestif est augmentée avec le niveau d'alimentation chez des moutons (Lobley et coll., 1994). D'autres études, toujours chez le

mouton, ont également montré une augmentation de la synthèse protéique dans l'intestin grêle (Neutze et coll., 1997) ou au travers des tissus drainés par la veine porte (MacRae et coll., 1997b) lors d'une augmentation du niveau d'alimentation. Cette augmentation de synthèse protéique pourrait participer à l'augmentation de captage net d'AA par les TDVP, cependant, il est difficile d'émettre des hypothèses plus précises en l'absence de données sur la protéolyse de ces tissus et de l'émission en AA associée.

Nygren & Nair (2003) montrent qu'une augmentation d'apport d'AA par perfusion intraveineuse chez l'Homme induit une stimulation de la synthèse protéique dans l'aire splanchnique (attention, l'aire splanchnique comprend aussi le foie, il faut donc être prudent sur l'interprétation de telles données). De même, Adegoke et coll. (2003) ont également montré une diminution des ARNm de certains composants de la voie ATP ubiquitine protéasome dépendante lors d'un apport exogène d'AA (par voie entérale ou périphérique), suggérant un impact des AA sur la protéolyse. Davis et coll. (2002) suggèrent que la voie d'apport des AA (voie luminale vs voie périphérique) peut augmenter ou non la synthèse protéique du tube digestif. Les AA alimentaires présentent une contribution plus importante que les AA artériels à la synthèse des protéines jéjunales chez le porc selon Stoll et coll. (1999b). L'apport en thréonine alimentaire semble en particulier crucial pour la synthèse des mucines (riches en cet AA) mais pas des protéines constitutives du tube digestif (Law et coll., 2007; Faure et coll., 2007). L'impact réel de l'apport entéral *vs* parentéral d'AA sur la synthèse des protéines du tube digestif reste cependant à approfondir car les données de la littérature peuvent se contredire. Concernant les Ruminants, Lapierre et coll. (2002) n'ont montré, chez des vaches laitières cathétérisées au niveau de l'aire splanchnique, aucun effet de l'apport de protéines dans le régime sur la synthèse protéique dans les TDVP.

Contrairement à l'effet de l'apport alimentaire, la perfusion d'AA (clamp eu-insulinémique eu-glycémique) chez des porcelets n'a pas d'impact sur la vitesse fractionnaire de synthèse des protéines jéjunales (Davis et coll., 2002). Ceci a été confirmé par Adegoke et coll. (2003), toujours sur le porc. En effet, et contrairement aux hypothèses soulevées précédemment, Adegoke et coll. (1999) ont montré une diminution (et non une augmentation) de la synthèse des protéines du tube digestif suite à un apport entéral d'AA.

Il n'existe pas de données sur l'effet de nutriments énergétiques sur la synthèse protéique du tube digestif chez le Ruminant. Chez le porc, une perfusion intraveineuse de glucose s'est traduite par une augmentation de la synthèse protéique fractionnaire dans le jéjunum (Adegoke et coll., 2003) alors qu'une infusion de glucose par voie luminale n'a eu aucun effet (Adegoke et coll., 1999). Les augmentations de concentrations périphériques en nutriments énergétiques semblent

donc essentielles pour moduler la synthèse des protéines du tube digestif. Cependant, la perfusion intraveineuse de glucose était accompagnée d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'insuline (Adegoke et coll., 2003). Des études sur porcelets clampés (euglycémie, euaminoacidémie, hyperinsulinémie) ont montré une absence d'effet de l'insuline sur la synthèse protéique dans le jéjunum (Davis et coll., 2001 et 2002). Par conséquent, l'effet du glucose constaté par Adegoke et coll. (2003) n'est probablement pas médié par l'insuline à moins que la présence d'insuline et de glucose soit nécessaire pour stimuler la synthèse protéique. Ce type de résultat, très spécifique du Monogastrique, est difficile à transposer chez le Ruminant qui présente un métabolisme du glucose très différent.

3.2.2. Foie

Une augmentation de l'apport alimentaire stimule la synthèse protéique hépatique chez le monogastrique (Mosoni et coll., 1996). Ceci est particulièrement vrai chez les jeunes animaux en croissance (Burrin et coll., 1992) mais cet effet est fortement diminué chez les adultes (Davis et coll., 2000; Birchenall-Sparks et coll., 1985). Chez le Ruminant, le niveau d'alimentation influe peu sur la synthèse des protéines constitutives hépatiques (Lobley et coll., 1994; Connell et coll., 1997). La forte variation du contenu protéique hépatique observée durant des phases d'alimentation/restriction (Burrin et coll., 1990; Lobley et coll., 1994) ne peut s'expliquer que très partiellement par une modulation de la synthèse protéique (Hutson et coll., 1982; Merry et coll., 1987; Burrin et coll., 1990; Lobley et coll., 1994). Ainsi, la perte de masse hépatique observée lors d'une restriction alimentaire s'explique plus par une augmentation de la protéolyse des protéines constitutives chez le rongeur (Hutson et coll., 1982; Surmacz et coll., 1987; Ferland et coll., 1992) et le Ruminant (Connell et coll., 1997). Chez l'Humain comme chez le Ruminant, la synthèse d'albumine est stimulée par la prise alimentaire (De Feo et coll., 1992; Caso et coll., 2007; Connell et coll., 1997). On assiste cependant à des réponses variables selon les protéines exportées par le foie (De Feo & Lucidi, 2002). En effet, chez les Monogastriques, la synthèse de fibrinogène n'est pas augmentée suite à une augmentation de l'apport alimentaire (Cayol et coll., 1996; De Feo et coll., 1992).

La synthèse des protéines hépatiques et d'albumine répond également à l'apport de protéines chez le porc (Frank et coll., 2005; Caso et coll., 2007). Des baisses importantes du taux de protéines dans l'alimentation (ex : de 16 % à 0 % de protéines) diminuent la synthèse d'albumine (Cayol et coll., 1997). Cependant, des modifications plus faibles de l'apport protéique ou des adaptations sur une durée plus longue aux régimes déficitaires en protéines n'induisent pas de modification majeure de la synthèse d'albumine chez l'homme (Thalacker-Mercer et coll., 2007) et les bovins (Raggio et

coll., 2007). En effet, chez les Ruminants, une augmentation de 20 % à 31 % de l'apport protéique dans la ration n'augmente ni la synthèse des protéines totales exportées par le foie ni celle de l'albumine malgré une augmentation de prélèvement hépatique d'AA par le foie. Les AA captés sont donc utilisés dans d'autres voies métaboliques (oxydation en particulier) (Raggio et coll., 2007). Il semble, comme pour le tube digestif, que la voie par laquelle les AA arrivent au foie est prédominante dans la régulation de la synthèse des protéines hépatiques constitutives et exportées. En effet, sauf dans le cas du Monogastrique nouveau né très sensible aux AA (Davis et coll., 2001 et 2002), des perfusions intraveineuses d'AA chez des adultes ne montrent aucun effet stimulateur des AA ou de l'insuline sur la synthèse protéique hépatique (Mosoni et coll., 1993b; Ballmer et coll., 1995). Par contre, la synthèse d'albumine répond, toujours chez l'Homme l'adulte, à un apport alimentaire d'AA (De Feo et coll., 1992; Hunter et coll., 1995; Volpi et coll., 1996).

A notre connaissance, aucun effet strict des apports énergétiques n'a été étudié sur la synthèse protéique hépatique. Encore une fois, l'augmentation de l'apport en nutriments énergétiques dans le repas des monogastriques se traduit par des modulations des niveaux hormonaux telle qu'une augmentation des taux d'insuline plasmatiques. Cependant, comme dans le cas du tube digestif, l'insuline semble jouer plus un rôle permissif qu'un rôle régulateur direct sur la synthèse des protéines hépatiques (Davis et coll., 1998).

Par conséquent, la synthèse des protéines constitutives du tube digestif et du foie est modulée de manière limitée par les divers facteurs nutritionnels testés, en particulier chez le Ruminant. La protéolyse semble par contre impliquée fortement dans les variations de masse du tube digestif ou du foie survenant lors de réductions / augmentations d'apports alimentaires. Cependant, la voie par laquelle les nutriments sont apportés aux tissus splanchniques (voie entérale vs parentérale) semble jouer un rôle important sur la régulation de la synthèse protéique dans l'aire splanchnique. Les AA alimentaires semblent avoir un effet plus stimulateur sur la synthèse protéique digestive et hépatique que les AA endogènes (périphériques). Ces données, relativement récentes et limitées au Monogastriques, nécessiteraient d'être confirmées chez les Ruminants pour lesquels les variations post-prandiales d'apport d'AA sont fortement limitées par le fonctionnement ruminal. En conclusion, la synthèse protéique semble maintenue dans l'aire splanchnique dans diverses situations de stress nutritionnels (comme des baisses de l'apport en nutriments azotés), indiquant qu'une activité de synthèse protéique minimale est nécessaire au bon fonctionnement de ces tissus.

3.3. Oxydation des AA dans les tissus splanchniques

3.3.1. Tissus drainés par la veine porte

Dans le tube digestif du préruminant, une charge en leucine active son oxydation par la dehydrogénase des céto-acides à chaîne ramifiée (Papet et coll., 1988). De même, une augmentation de l'apport de protéines dans la ration (et donc de leucine) induit une augmentation de l'oxydation de la leucine dans les TDVP (Lapierre et coll., 2002b). L'oxydation de la leucine dans les TDVP est également modulée avec un régime supplémenté en orge (vs régime à base d'herbe) (Lobley et coll., 1996a), lors d'infestation par des parasites intestinaux (Yu et coll., 2000) ou lorsque l'activité fermentaire ruminale est diminuée suite à un traitement à la flavomycine (MacRae et coll., 1999). Des études sur porc apportent des informations complémentaires sur l'utilisation des AA à des fins énergétiques par les TDVP. En effet, suite à une restriction protéique (-40 % *vs* régime témoin isocalorique) sur porcelet perfusé avec du glutamate et du glucose marqués, la production de CO_2 à partir du glutamate alimentaire et de la leucine diminue (de 50 à 10 % de la production de CO_2), et est compensée par une augmentation de l'oxydation du glucose alimentaire (van der Schoor et coll., 2001). Cette compensation n'est pas complète et l'utilisation d'autres sources énergétiques (lipides, galactose ?) est suspectée et estimée à 11 % pour le régime riche en protéines et à 40 % pour le régime pauvre en protéines (van der Schoor et coll., 2001). A l'inverse, lors d'un excès d'apport de glutamate, celui-ci reste le substrat préférentiellement utilisé par le tube digestif (Janeczko et coll., 2007). Par conséquent, chez le porcelet, les TDVP sont capables d'adapter l'utilisation de leurs substrats énergétiques, et notamment des AA, en fonction de l'apport. Il est délicat d'extrapoler ces données obtenues sur porcelets au Ruminant, cependant, la possibilité de phénomènes compensatoires en cas de déficits en certains AA au sein des TDVP chez le ruminant n'est pas à exclure. Ces mécanismes restent cependant à confirmer car une supplémentation en glutamine chez la vache laitière (Doepel et coll., 2007) n'a pas permis de favoriser l'apparition nette de glutamine ni de glucose en veine porte. Par contre, chez le mouton, une perfusion de propionate dans le rumen semble diminuer le prélèvement des AACR par les TDVP (Savary-Auzeloux et coll., 2003b; Nozière et coll., 2000) mais il est impossible, avec la méthode des bilans artério-veineux, de déterminer si le métabolisme des TDVP ou les fermentations ruminales sont responsables de ces modulations d'apparition des AA. *In vitro*, dans des entérocytes de moutons, la présence de propionate dans le milieu d'incubation permet une diminution de l'oxydation du glucose et du glutamate (Oba et coll., 2004). Ceci tendrait donc à prouver une flexibilité du tube digestif des Ruminants pour l'utilisation de ses substrats énergétiques (comme dans le cas des porcelets) mais ceci reste à prouver *in vivo*.

3.3.2. Foie

La plupart des données disponibles dans cette partie sont issues d'infusion de leucine marquée, or nous avons vu que cet AA n'est que peu ou n'est pas oxydé par le foie. A l'inverse du tube digestif, l'oxydation de la leucine est peu sensible à la nature de la ration (Lobley et coll., 1996a; Lapierre et coll., 2002b) ou à la charge en leucine (Papet et coll., 1988) et explique le faible prélèvement par le foie et la forte émission de cet AA vers les tissus périphériques (Lobley & Lapierre, 2003). Comme la leucine, les autres AACR et la lysine sont peu oxydés par le foie.

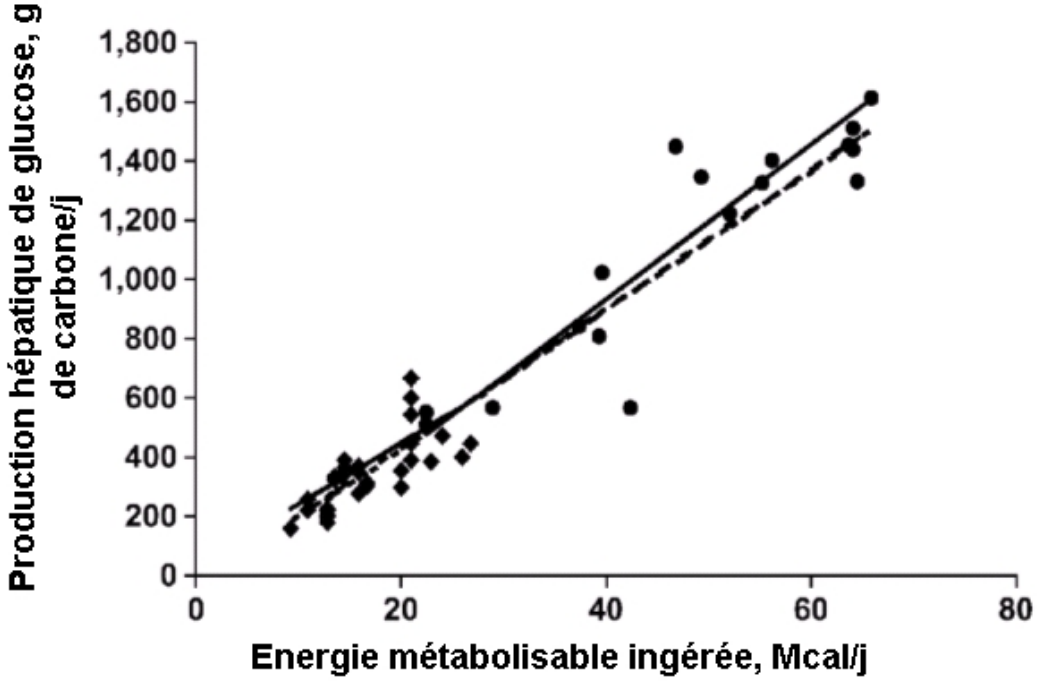
Par contre, comme montré par les études de bilans artérioveineux (**parties 3.1.1. et 3.1.2.**), le prélèvement hépatique d'AA et l'uréogenèse augmentent généralement avec le niveau d'alimentation et avec une augmentation de l'apport d'AA en veine porte : ceci a pour but d'éliminer l'excès d'AA et d'éviter une hyperaminoacidémie (Lapierre et coll., 2005). Une augmentation de l'oxydation hépatique de la phénylalanine a d'ailleurs été montrée directement chez la vache laitière perfusée avec de la phénylalanine [$^2H_5$] lors d'une supplémentation en protéines dans la ration (Raggio et coll., 2007). De nombreuses oxydations et transaminations hépatiques participent au catabolisme des AANI mais leur métabolisme est très peu étudié.

L'oxydation des AA par le tube digestif peut être modulée selon l'apport en nutriments dans la ration du monogastrique. Certains AA comme la glutamine et la leucine sont particulièrement concernés par ces processus. Le tube digestif est en effet capable de remplacer un substrat énergétique par un autre dans certaines situations de déficit ou surcharge en nutriments. Pour l'oxydation des AA dans les TDVP, un phénomène similaire à celui constaté dans le foie vis-à-vis de la synthèse protéique semble se mettre en place. En effet, une oxydation minimale de nutriments semble nécessaire pour assurer le métabolisme de base des TDVP comme en témoigne la grande plasticité du tube digestif à utiliser divers nutriments énergétiques en fonction de l'apport en nutriments. Ces réponses restent à démontrer chez les ruminants. Dans le cas du foie, le prélèvement d'AA et leur oxydation (sauf pour les AACR peu oxydés dans le foie) sont fortement liés à l'apport en AA au foie. Ceci explique les prélèvements hépatiques importants en AA lors de supplémentations en azote dans la ration où ils sont majoritairement catabolisés.

3.4. Néoglucogenèse hépatique

La production hépatique de glucose chez le Ruminant augmente avec le niveau d'alimentation (Baird et coll., 1980; Danfaer et coll., 1995) (Figure 35) et décroît avec le jeûne (Lomax & Baird, 1983).

Figure 35 Emission hépatique de glucose chez la vache laitière (●) et le bovin en croissance (■) en fonction de l'énergie métabolisable ingérée, n=49. La pente pour les deux groupes est similaire (Huntington et coll., 2006)



Bien que *in vitro* Leng & Annison (1963) et Demigné et coll. (1991) aient montré que l'apport de propionate augmentait la néoglucogenèse dans les hépatocytes, l'apport de propionate ou d'autres précurseurs du glucose (comme les AA) n'induit pas nécessairement une augmentation de l'émission nette de glucose ou du flux corporel de glucose *in vivo* (Majdoub et coll., 2003; Lemosquet et coll., 2004; Ortigues et coll., 2003b; Reynolds et coll., 1994b). Cependant, Lozano et coll. (2000) ont montré que l'augmentation d'apport de propionate chez des bouvillons (par une augmentation de la fermentation ruminale de l'amidon provenant de graines de sorgho) tendait à augmenter l'absorption de propionate et de lactate et l'émission nette hépatique de glucose. Ainsi, l'impact de la fourniture en propionate (ou en autres précurseurs) sur la production nette hépatique de glucose reste sujet à débat; il semblerait que lorsque l'apport en précurseurs du glucose n'est pas limitant, une modulation de ceux-ci aurait peu d'impact sur la production de glucose (Majdoub et coll., 2003).

Par contre, de nombreux auteurs s'accordent sur la plasticité du foie à utiliser les différents précurseurs du glucose. Par exemple, lors du jeûne, la contribution potentielle du propionate à la

néoglucogenèse chute alors que celle d'autres précurseurs comme les AA, le lactate et le glycérol augmente (*in vivo* : Baird et coll., 1980; Danfaer et coll., 1995; *in vitro* : Demigné et coll., 1991). L'expression d'enzymes clés de la néoglucogenèse confirme ce résultat avec une augmentation spécifique des ARNm de la pyruvate carboxylase (responsable de l'incorporation de l'alanine et du lactate dans la néoglucogenèse) sans modification de l'expression et de l'activité de la phosphoenol pyruvate carboxykinase (qui catalyse la transformation de l'oxaloacetate en phosphoenol pyruvate et n'est pas spécifique d'un précurseur particulier) lors d'une restriction alimentaire chez la vache laitière (Velez & Donkin 2005).

La nature du régime influe également de manière importante sur la contribution potentielle des divers précurseurs du glucose: Reynolds et coll. (1991) montrent en particulier que la contribution des AA passe de 33 % chez des bovins nourris avec un régime à base de foin à 24 % chez des animaux nourris avec un régime à base de maïs sans modification de la production de glucose.

4. Régulation de l'utilisation des acides aminés dans l'aire splanchnique par la demande en nutriments des tissus périphériques (mamelle et muscle)

Chez les Ruminants, les besoins en AA par l'organisme sont particulièrement intenses chez la vache laitière en lactation (ou en gestation) ou chez les bovins en forte croissance. Un exemple extrême d'augmentation de l'utilisation des AA par les tissus périphériques est le traitement à l'hormone de croissance (**GH**) (ou somatotropine) qui favorise la croissance et l'efficacité d'utilisation des AA alimentaires vers l'accrétion protéique musculaire (Caperna et coll., 1991; Etherton & Bauman, 1998). Nous nous intéresserons à savoir dans quelle mesure des modifications de besoin en AA des tissus périphériques influencent les prélèvements nets d'AA par les tissus splanchniques puis les voies métaboliques et les tissus ou organes potentiellement responsables des modulations de prélèvement. La majorité des études rapportées dans cette partie concernent l'impact de la GH sur l'utilisation des AA (catabolisme et synthèse protéique); les données comparatives entre vaches en lactation et vaches taries sont en effet moins nombreuses.

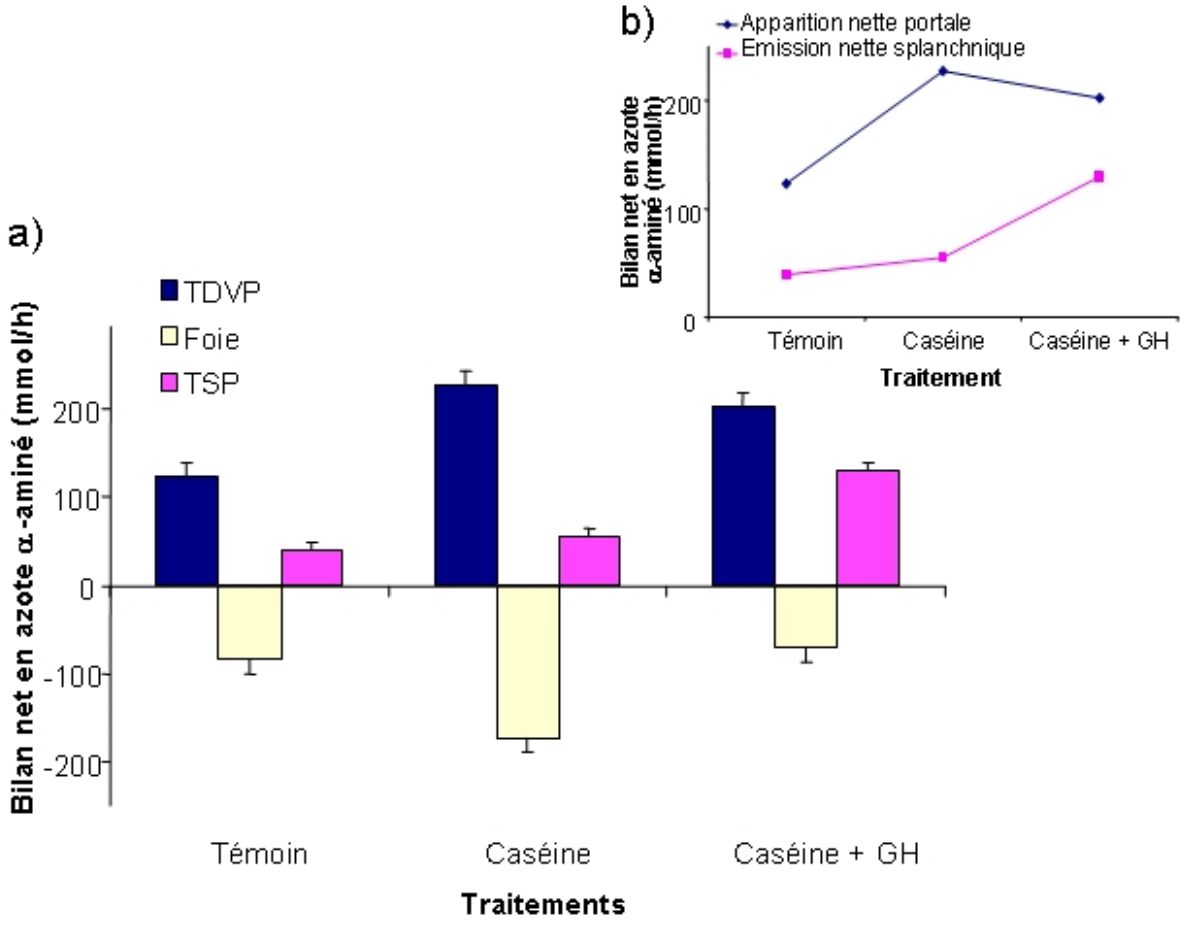
Toujours chez la vache en lactation, les besoins en glucose sont également intenses, ce qui peut avoir des répercussions sur l'utilisation des AA pour la néoglucogenèse. Ces phénomènes ont été étudiés chez des vaches laitières en période pré- et post-partum ou sur des modèles expérimentaux d'animaux excrétant des quantités importantes de glucose dans l'urine (injection de phlorizine) (Overton et coll., 1998).

4.1. Emission nette et catabolisme splanchnique des AA

Sauf conditions nutritionnelles particulières (ex : niveau d'alimentation inférieur à l'entretien), l'apparition nette d'AA en veine porte et le captage hépatique d'AA répond globalement à une loi d'action de masse. C'est-à-dire que plus les AA sont fournis dans l'alimentation, plus on voit apparaître d'AA en veine porte et plus ils sont captés par le foie. Ceci conduit à des taux stables d'extraction hépatique d'AA en fonction de l'apparition nette portale (Reynolds, 2006) (Tableau 7). Il existe cependant des cas pour lesquels l'extraction hépatique d'AA est clairement diminuée : lorsque les vaches sont en lactation ou lorsque des animaux sont en forte croissance et/ou soumis à un traitement à la GH (Reynolds, 2006). En effet, chez des taurillons, le pourcentage de prélèvement hépatique d'AA passe de 76 à 36 % de l'apparition nette portale suite à un traitement à la GH ou de 63 à 27 % à faible niveau d'alimentation (Reynolds et coll., 1992a). De même, les taux d'extraction hépatique sont de l'ordre de 20 - 40 % chez des vaches en lactation (Reynolds, 2006; Blouin et coll., 2002) alors que ces valeurs sont plus élevées chez les vaches taries ou les bouvillons en croissance (de 40 à 100 %, Reynolds et coll., 1991 et 1992a; Reynolds, 2006;

Taniguchi et coll., 1995; Lapierre et coll., 2000) (Tableau 7). Ceci se traduit par une émission nette splanchnique très importante en AA pour fournir les AA nécessaires aux processus anaboliques et ainsi favoriser la croissance ou la lactation (Figure 36). En parallèle d'une émission splanchnique d'AA accrue, l'émission hépatique d'urée est diminuée (Reynolds et coll., 1992a; Bruckental et coll., 1997) sans modification majeure du recyclage de l'urée ni de la digestibilité de la ration (Bruckental et coll., 1997). Une diminution du catabolisme des AA, comme de la phénylalanine (en particulier dans le foie), a d'ailleurs été démontrée suite aux traitements à la GH chez le porcelet perfusé avec de la phénylalanine marquée (Bush et coll., 2003) ainsi qu'une réduction de l'activité des enzymes de l'uréogenèse hépatique (carbamyol phosphate synthase I, arginosuccinate synthase …) (Bush et coll., 2003). Concernant le tube digestif, l'impact du traitement à la GH est mineur relativement aux effets sur le foie. Les apparitions nettes portales d'AA (Reynolds et coll., 1992a; Bruckental et coll., 1997) mais aussi les activités d'enzymes cataboliques (données sur porcelet : Bush et coll., 2002) étaient peu modifiées.

Figure 36 Effet de la demande des tissus périphériques sur a) le bilan net en azote α-aminé (mmol/h) au niveau splanchnique (tissus drainés par la veine porte (TDVP), foie et tissus splanchniques (TSP = TDVP + Foie)) b) l'apparition nette portale et l'émission nette splanchnique d'azote α-aminé (mmol/h) chez des bouvillons (d'après Bruckental et coll., 1997). L'infusion de hormone de croissance (GH) engendre une demande accrue des tissus périphériques en nutriments.



Ainsi, une profonde réorientation de l'utilisation des AA entre l'aire splanchnique (et en particulier le foie) et les tissus périphériques (mamelle, muscle) s'est mise en place d'une manière totalement indépendante de l'afflux alimentaire de substrats. Cependant, l'effet de la GH sur le foie et les muscles peut être modulé en fonction de l'état nutritionnel des animaux (Reynolds et coll., 1992a; Davis et coll., 2004) ainsi que par de nombreux autres facteurs (âge des animaux, mode d'apport de la GH et durée du traitement….) (Davis et coll., 2004). Une étude récente de Wilson et coll. (2008) montre en effet, chez des porcelets, par une technique de clamps en glucose, insuline et AA, qu'un apport en AA correspondant à un état nourri était nécessaire pour permettre une stimulation de la synthèse protéique musculaire par la GH. L'augmentation de la synthèse protéique musculaire étant substantielle, un apport accru de substrats (AA) au muscle est nécessaire et il est probable que les réponses splanchniques sus-citées dépendent du niveau d'apport alimentaire azoté. Il faut rappeler ici que, bien que cohérents avec les hypothèses formulées chez les ruminants (Reynolds et coll., 1992a), les résultats présentés sur Monogastrique concernent le porcelet et ne sont pas nécessairement extrapolables au Ruminant.

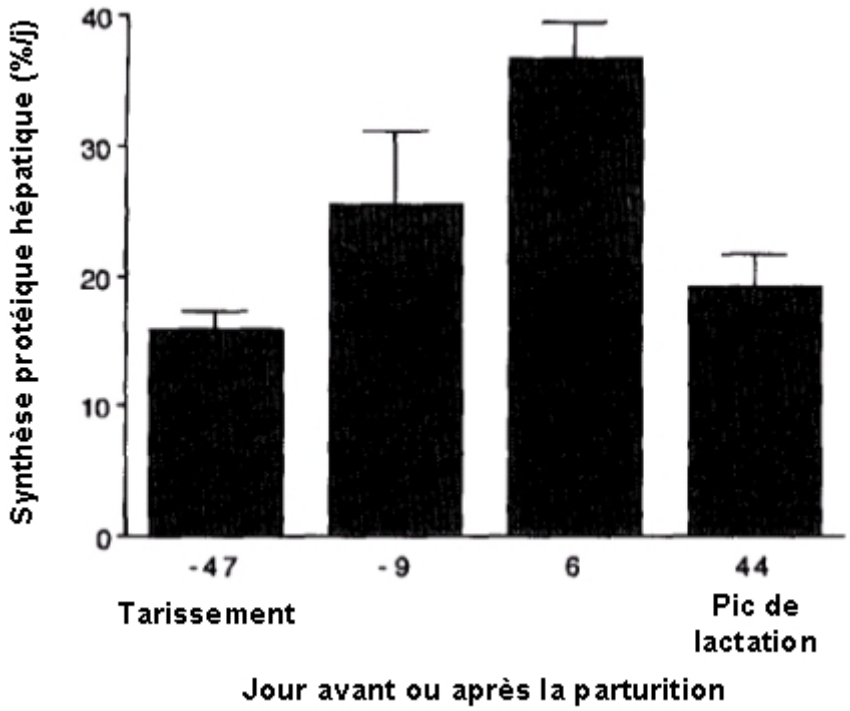
4.2. Synthèse protéique splanchnique

L'impact de la GH sur la croissance et la synthèse des protéines musculaires n'est plus contesté chez les Ruminants et les Monogastriques dans un bon état nutritionnel (Eisemann et coll., 1989; Fryburg & Barrett, 1993; Boisclair et coll., 1994; Bush et coll., 2003), ce qui crée un besoin intense en AA pour ces tissus. En parallèle, la synthèse protéique dans les TDVP est augmentée chez le porcelet sans impact sur la dégradation (Bush et coll., 2003). Chez les bouvillons traités à la GH, une augmentation de la synthèse protéique absolue (en g / jour) dans l'intestin grêle a été montrée sans aucun impact sur le foie (Eisemann et coll., 1989). Cependant, le poids du foie est augmenté après traitement à la GH, suggérant une diminution de la dégradation protéique. Par conséquent, comme pour l'oxydation développée plus haut, la synthèse protéique splanchnique répond à l'apport de GH de manière différente selon les tissus et semble agir principalement sur le foie.

Il existe très peu de données concernant le métabolisme protéique des tissus splanchniques en fin de gestation ou de lactation chez les ruminants. Cependant, il a été montré chez la vache laitière (Bell, 1995) et le rat (Ling et coll., 1987), une augmentation de la synthèse des protéines hépatiques dans la période de mise bas malgré une absence de modification majeure de l'ingéré (Figure 37). Les modifications importantes de l'état inflammatoire et le stress métabolique liés à la

parturition peuvent expliquer cette augmentation de synthèse protéique hépatique, en particulier les protéines de la réaction inflammatoire.

Figure 37 Synthèse protéique fractionnaire (% / j) dans le foie de vaches Holstein à différents stades du cycle reproduction-lactation. (Bell, 1995)

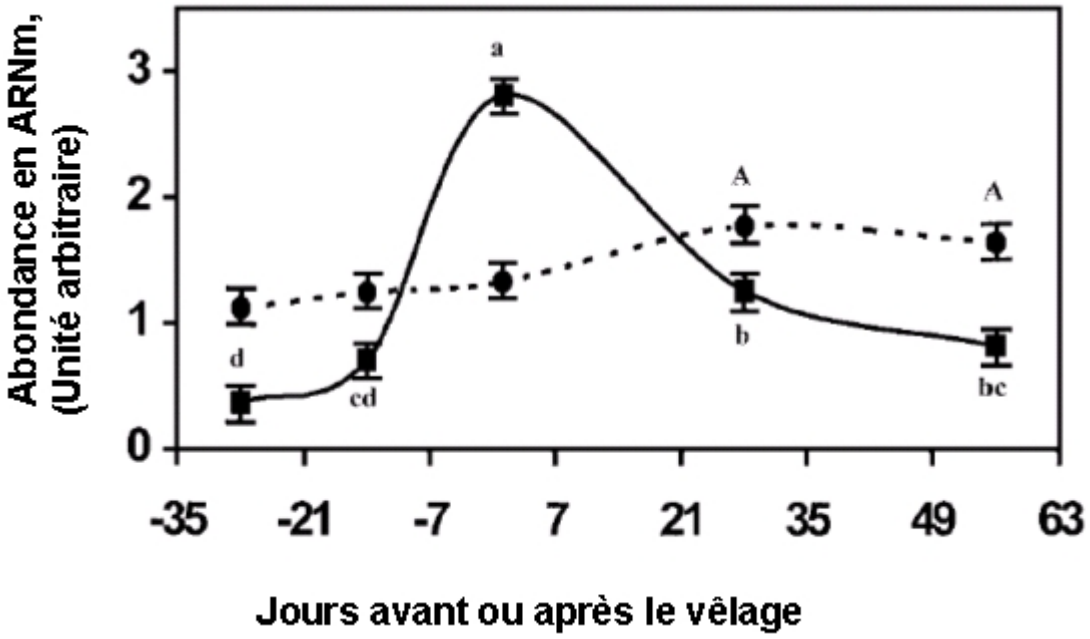


4.3. Néoglucogenèse

Des agnelles soumises à une perfusion de phlorizine présentent une excrétion urinaire de glucose représentant environ 50 % de leur flux corporel (Overton et coll., 1998), ce qui, expérimentalement, crée un besoin en glucose important chez ces animaux. De même, chez des agnelles en début de lactation, la production de glucose corporel augmente pour subvenir aux besoins en glucose de la mamelle (Wilson et coll., 1983; Bell, 1995). Le traitement à la phlorizine se traduit par une augmentation de l'urée plasmatique, suggérant un catabolisme (en particulier hépatique) accru des AA. Une augmentation de l'utilisation des AA pour maintenir la néoglucogenèse chez ces animaux a été confirmée sur hépatocytes d'agnelles traitées ou non à la phlorizine. En effet, après 72 heures de traitement à la phlorizine, la conversion de l'alanine en glucose augmente plus (+ 285 % *vs* témoin) que celle du propionate en glucose (+166 % *vs* témoin), suggérant une contribution accrue des AA pour la néoglucogenèse lorsque la demande en glucose augmente fortement. L'augmentation d'utilisation des AA pour la néoglucogenèse peut s'expliquer par une augmentation de l'expression de la pyruvate carboxylase qui intervient dans la synthèse de glucose à partir du lactate et des AA néoglucogéniques (comme l'alanine) (Bradford & Allen,

2005). Or, l'expression de la pyruvate carboxylase est fortement corrélée à l'activité de cette enzyme (Greenfield et coll., 2000). Une forte augmentation de l'ARNm de la pyruvate carboxylase est également constatée dans les jours qui suivent la mise bas chez la vache laitière sans modification de l'ARNm de la phosphoenol pyruvate carboxykinase (Greenfield et coll., 2000) (Figure 38). Ceci implique une modulation du métabolisme hépatique du glucose en faveur d'une utilisation accrue du lactate et/ou des AA pour la néoglucogenèse.

Figure 38 Effet du jours pré ou post vêlage sur l'abondance des ARNm de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK ; ●) et de la pyruvate carboxylase (PC ; ■) (Greenfield et coll., 2000).



Les lettres majuscules différentes indiquent des différences (P<0.05) entre les jours pour la quantité d'ARNm de PEPCK. Les lettres minuscules différentes indiquent des différences (P<0.05) entre les jours pour la quantité d'ARNm de PC.

Dans le cas où les besoins des tissus périphériques en AA ou en glucose sont augmentés (ex : lors d'une forte croissance ou lors du pic de lactation), une modification importante de l'utilisation splanchnique des AA est constatée, essentiellement au niveau hépatique avec une diminution forte du catabolisme des AA (et donc de l'uréogenèse). Les modifications de synthèse protéique dans l'aire splanchnique sont plus modérées. Lors d'une augmentation des besoins en glucose, les données convergent vers une augmentation de l'utilisation hépatique des AA à des fins de néoglucogenèse. Dans ces situations de besoins accrus en nutriments, le métabolisme splanchnique répond moins à l'apport de nutriments. Les mécanismes de régulation mis en jeu sont différents de ceux intervenant lors de modifications de l'ingéré.

Comme nous l'avons vu à diverses reprises dans cette revue bibliographique, les facteurs nutritionnels et les besoins en nutriments des tissus périphériques (mamelle et muscle) ont des répercussions sur la biodisponibilité en nutriments. Cependant, des modifications de niveaux hormonaux et/ou de sensibilité des tissus ou organes aux hormones ont été constatés en parallèle. La régulation du captage des nutriments est donc complexe. Les nutriments sont-ils capables de réguler directement leur propre utilisation par les tissus et organes ? Quels en seraient les mécanismes ? Et quel est le rôle des hormones dans ce contexte ? Ces questions sont abordées dans la dernière partie de cette revue bibliographique.

5. Mecanismes de régulation de l'impact des facteurs nutritionnels sur le métabolisme splanchnique des acides aminés

Nous avons montré, dans la partie précédente, la plasticité des voies métaboliques et de l'utilisation des AA par les tissus splanchniques suite à des modifications quantitatives ou qualitatives de la ration ou lors de modulations des besoins des animaux. La coordination du métabolisme entre tissus et organes pour atteindre un équilibre homéostatique peut être gérée directement par l'apport de nutriments mais aussi par l'intermédiaire les hormones. Ces mécanismes de régulation permettent à l'organisme de définir des priorités en terme d'utilisation des AA. Nous nous intéresserons plus spécifiquement ici 1) à l'action des hormones et 2) à la régulation des AA eux-mêmes permettant en particulier d'expliquer pourquoi leur utilisation hépatique est différente entre un apport alimentaire ou périphérique d'AA : « le signal porte ».

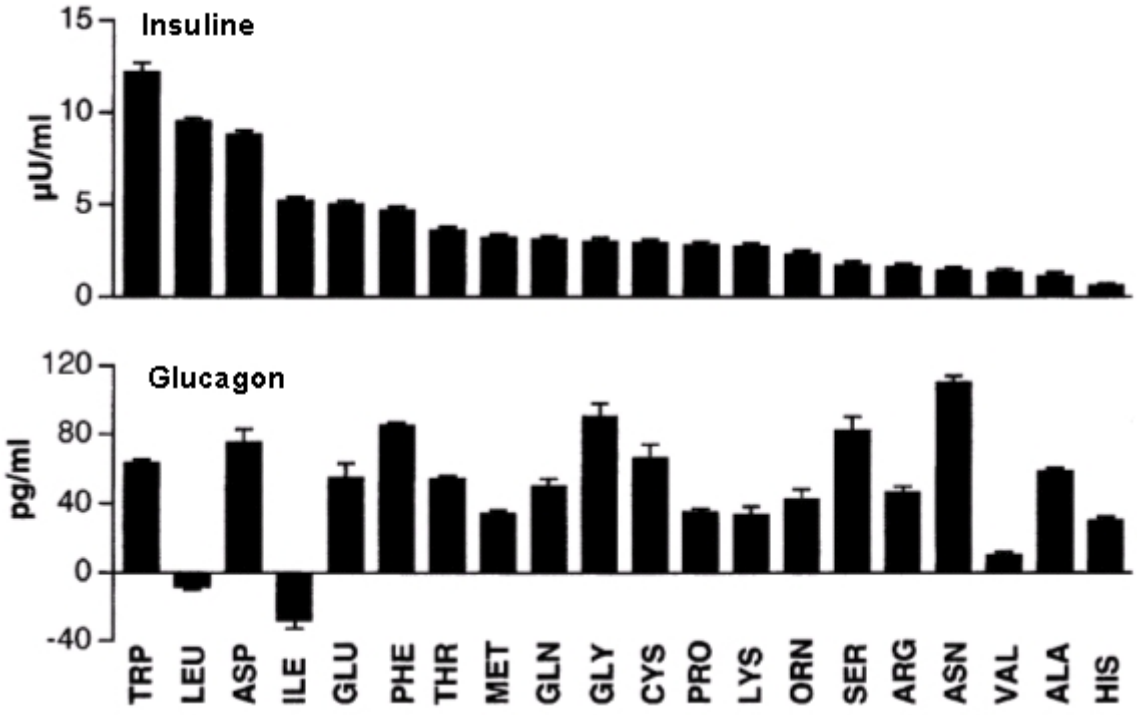
5.1. Régulations hormonales

5.1.1. Synthèse et prélèvement d'hormones par les tissus splanchniques, impact sur les bilans nets en AA

La restriction alimentaire chez les ruminants se traduit par une réduction des concentrations plasmatiques en hormones anaboliques (insuline, 3.5.3'-triiodothyronine (**T3**), thyroxine (**T4**) et insulin-like-growth factor-I (**IGF-I**)) et une augmentation des hormones cataboliques (cortisol et GH) (Hornick et coll., 2000). A l'inverse, l'augmentation de l'ingéré se traduit par une augmentation des concentrations artérielles en insuline et en glucagon (Lapierre et coll., 2000). Plus précisément, les AGV chez le Ruminant ou le glucose chez le Monogastrique (Majdoub et coll., 2003; Harmon, 1992) induisent une augmentation de l'insulinémie et de la glucagonémie en veine porte avec des effets moins marqués au niveau artériel chez le Ruminant (Majdoub, 2002). Les niveaux hormonaux en artère dépendent aussi de l'état physiologique et des besoins en glucose des

animaux puisque Lomax et coll. (1979) ont montré une augmentation des niveaux d'insuline chez des vaches taries après perfusion de propionate mais pas chez des vaches en lactation. De même, les AA sont connus pour stimuler la secrétion d'insuline, glucagon, GH et IGF-I (Nair & Short, 2005). Rocha et coll. (1972) ont montré chez le chien que chaque AA avait un impact différent sur la secrétion d'insuline et du glucagon (Figure 39). En effet, le tryptophane, la leucine et l'aspartate produisent un effet maximum sur la secrétion d'insuline ; la valine, l'histidine et l'alanine ayant un impact minimum. Glycine, alanine, serine et aspartate stimulent la secrétion de glucagon avec un impact mineur sur l'insuline. Leucine et isoleucine présentent la particularité de stimuler la secrétion d'insuline tout en inhibant celle du glucagon. Ainsi, les AA jouent un rôle sur la secrétion des hormones qui influent elles-mêmes sur le métabolisme des AA.

Figure 39 Modifications de concentrations circulantes en insuline et en glucagon 30 minutes après l'injection intra veineuse d'AA individuels à 1mmol/L chez le chien conscient (n= 4-5) (Nair & Short, 2005)



Les hormones les plus étudiées dans le contexte des régulations nutritionnelles sont l'insuline et le glucagon; l'essentiel des données qui vont suivre concerneront donc principalement ces deux hormones. Les tissus splanchniques jouent un rôle important dans l'émission et le prélèvement d'hormones. En effet, les TDVP (le pancréas) secrètent l'insuline et le glucagon. Le foie secrète des hormones telles que l'IGF-I et dégrade d'autres hormones circulantes. Il détruit en effet 50% du glucagon, noradrénaline, cortisol et 80 % de l'adrénaline chez le Monogastrique (Jungermann & Kietzmann, 1996). Le prélèvement d'insuline peut varier de 80 % entre les repas à seulement 15 % après un repas chez le Monogastrique (Jungermann & Kietzmann, 1996). Dans le cas de Lapierre et coll. (2000), les prélèvements nets hépatiques d'insuline et glucagon représentent respectivement 48 % et 26 % de l'émission nette des TDVP en ces deux hormones à un niveau élevé d'alimentation chez des bouvillons. Ainsi, les tissus de l'aire splanchnique jouent un rôle majeur dans la synthèse et le catabolisme de nombreuses hormones, ce qui a nécessairement des répercussions sur le biodisponibilité de ces hormones auprès des tissus périphériques comme le muscle. A notre connaissance aucune donnée n'est disponible concernant les facteurs qui régulent la dégradation d'insuline et de glucagon par le foie.

Bien qu'intervenant dans la synthèse et le catabolisme de nombreuses hormones, les tissus splanchniques répondent aussi à ces hormones avec des niveaux de sensibilité et de réponse qui peuvent varier selon l'état nutritionnel ou physiologique (Hornick et coll., 2000; Bell, 1995). Les Ruminants sont souvent considérés comme plus insulino-résistants que les non Ruminants (Tesseraud et coll., 2007). A cause de la complexité et des interconnections entre les phénomènes digestifs et métaboliques au niveau du tube digestif, l'impact des hormones sur l'utilisation des AA par les TDVP est mal documenté. Par contre, il semble que le prélèvement hépatique en AA soit mieux corrélé aux concentrations portales en insuline et glucagon qu'aux concentrations artérielles en ces hormones (Bergman et Pell, 1985; Lapierre et coll., 2000) mais ceci reste à confirmer.

De même, Freyse et coll. (2006) ont montré sur le chien que la perfusion d'insuline au niveau portal induisait une augmentation de la synthèse protéique hépatique alors que l'insuline perfusée au niveau périphérique n'induisait pas cet effet.

5.1.2. Impact sur le métabolisme protéique splanchnique

Parmi toutes les variations de concentration en nutriments et hormones après l'ingestion d'un repas chez le Monogastrique ou avec le niveau d'alimentation chez les Ruminants, les AA et l'insuline sont considérés comme essentiels pour l'anabolisme protéique, et en particulier au niveau du muscle (Prod'homme et coll., 2004 et 2005; Dardevet et coll., 2006; Tesseraud et coll., 2007). La grande difficulté lors de l'étude de l'impact de l'insuline sur le métabolisme des AA par exemple

est qu'une perfusion d'insuline se traduit par une hypoglycémie et une hypoaminoacidémie qui ont eux-mêmes des répercussions sur le métabolisme protéique (Kimball et coll., 1994; Sinaud, 1997). Par conséquent, des études de « clamp » consistant en une infusion d'AA, de glucose et d'insuline ont été développées chez le Monogastrique (Wray-Cahen et coll., 1998) et le Ruminant pour maintenir la concentration des nutriments à un niveau voulu.

A l'exception notable du nouveau né (Davis et coll., 2001), la synthèse protéique musculaire ne répond pas ou peu à l'insuline chez les Monogastiques adultes ou plus âgés (Davis et coll., 1996; Tessari et coll., 1996) ou les Ruminants (Teleni et coll., 1986; Tesseraud et coll., 1993). Cependant, les AA et l'insuline semble agir de concert pour stimuler la synthèse protéique musculaire (Balage et coll., 2001). Ces effets faibles de d'insuline exogène sur la protéosynthèse musculaire semble s'expliquer par le fait que la synthèse est déjà stimulée au maximum avec des concentrations physiologiques en insuline (Tesseraud et coll., 2006). Par contre, l'insuline inhibe clairement la protéolyse corporelle et musculaire (Tesseraud et coll., 1993; Larbaud et coll., 1996).

Au niveau des TDVP, les données sont moins nombreuses. Il a été montré néanmoins, chez le porcelet une absence d'effet de l'insuline sur la synthèse protéique dans le jéjunum (Davis et coll., 2001; Suryawan et coll., 2008) alors que les AA, en particulier les AA entéraux semblent avoir un effet stimulateur sur cette synthèse (Suryawan et coll., 2008). Aucun impact sur la protéolyse dans le jéjunum n'a été montré chez le ruminant soumis à un clamp euglycémique, hyperaminoacidémique et hyperinsulinémique (Larbaud et coll., 1996).

L'impact de l'insuline sur la synthèse protéique hépatique a été plus étudié dans la littérature. Comme pour le tube digestif, une absence d'effet de l'insuline sur la synthèse protéique hépatique est montrée chez le Ruminant (soumis à un clamp hyperinsulinémique, euglycémique et hyperaminoacidémique; Tauveron et coll., 1994), le porcelet (également soumis à un clamp; Davis et coll., 2001 et 2002), le rat (Mosoni et coll., 1993b) et la truie (Ahlman et coll., 2001). Il a également été montré que les AA induisaient une stimulation de la synthèse protéique hépatique indépendamment de l'insuline (O'Connor et coll., 2004). Comme pour le tube digestif, la protéolyse hépatique n'a pas été modulée chez la chèvre soumise à un clamp euglycémique, hyperaminoacidémique et hyperinsulinémique (Larbaud et coll., 1996). Toutefois, l'insuline semble avoir un impact sur la synthèse des protéines exportées par le foie avec une augmentation de la synthèse d'albumine chez l'Homme perfusé avec de l'insuline (De Feo et coll., 1993; Volpi et coll., 1996) ou une diminution de cette synthèse chez des patients diabétiques (en insulinodéficience) (De Feo et coll., 1991). *In vitro*, les résultats sont plus contradictoires avec une synthèse d'albumine qui est stimulée (Flaim et coll., 1985; Kimball et coll., 1995) ou non modifiée (O'Riordain et coll.,

1995) lors d'un ajout d'insuline dans le milieu d'incubation. Cet effet de l'insuline sur les protéines exportées mériterait d'être confirmé lors d'expérimentations sur animaux clampés.

5.1.3. Impact sur la néoglucogenèse

L'insuline a un effet inhibiteur sur la néoglucogenèse hépatique, en particulier à partir du lactate, du glycérol et des AA (estimé à partir des contributions potentielles de chaque nutriment à la production hépatique nette de glucose) et stimule la glycogénèse (*in vivo*: Brockman, 1990; *in vitro*: Donkin & Armentano, 1995). Cet effet de l'insuline est augmenté au cours de la lactation (Debras et coll., 1989) alors qu'il est diminué chez le Ruminant par rapport au pré-ruminant (Donkin et Armentano, 1995). Comme pour la synthèse protéique, une interaction forte existe entre les hormones et d'autres facteurs comme l'âge des animaux ou le stade physiologique.

Au contraire, le glucagon stimule la néoglucogenèse chez les Ruminants (Brockman & Bergman, 1975) mais, comme pour l'insuline, l'effet du glucagon est plus important chez le pré-ruminant que chez le Ruminant (Donkin & Armentano, 1995). Une interaction entre insuline et glucagon pour la régulation de la néoglucogenèse a été montrée par Donkin et coll. (1997).

L'impact direct des hormones sur le prélèvement des AA par les tissus de l'aire splanchnique et leur métabolisme est délicat à interpréter chez des animaux en condition de production. Ainsi, l'alimentation a un effet sur le prélèvement et le métabolisme des AA par les tissus splanchnique (comme nous l'avons vu par ailleurs) mais également sur la synthèse et la dégradation des hormones. Or ces hormones peuvent également avoir à leur tour un effet sur le prélèvement et le métabolisme des AA par les tissus splanchniques. Seules des études sur animaux clampés, modèle plus éloigné d'une situation « pratique », permettent de clarifier le rôle spécifique d'une hormone ou d'un nutriment sur le métabolisme.

L'effet de l'insuline a été plus étudié et il semble que cette hormone seule ait peu d'impact direct sur le prélèvement d'AA par l'aire splanchnique et la synthèse des protéines constitutives des TDVP et du foie. Le prélèvement des AA par le foie semble cependant assez bien corrélé aux niveaux d'insuline en veine porte et non aux niveaux artériels. Cette hypothèse mériterait d'être vérifiée dans diverses situations nutritionnelles et/ou physiologiques.

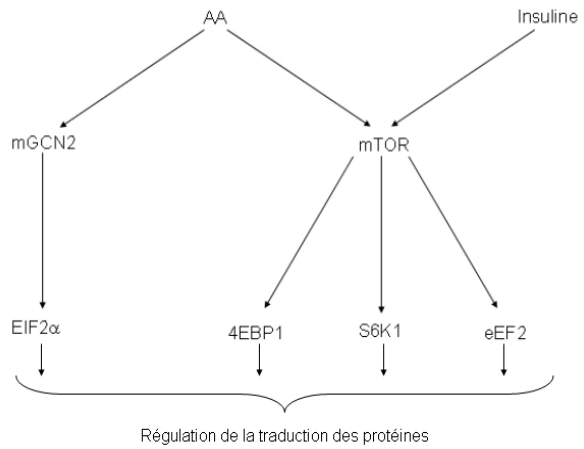
5.2. Les nutriments « signaux »

5.2.1. Notion de nutriment signal

5.2.1.1. AA et transduction du signal

Les acides aminés sont utilisés dans les cellules comme des structures de base pour la synthèse des protéines mais également comme nutriments énergétiques ou précurseurs de composés comme des peptides, hormones... Cependant, les AA ont également un rôle direct sur la régulation de leur propre métabolisme (Proud, 2002). L'ensemble des données relatées dans ce paragraphe concernent le Monogastrique et nécessiteraient d'être confirmées chez le Ruminant. Il a été montré que les AA (et en particulier la leucine) simulaient la synthèse protéique musculaire (Anthony et coll., 2001a; Dardevet et coll., 2000) en empruntant des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation de la synthèse protéique rappelant celle de l'insuline (Figure 40) (Yoshizawa, 2004; Rennie et coll., 2006). Deux voies de signalisation majeures ont été identifiées. La première est la voie mGCN2 qui est surtout régulée en cas de carences en AA. Dans ce cas, il y a accumulation des ARNt non liés à des AA, ce qui stimule mGCN2 (kinase qui phosphoryle le facteur d'initiation eIF2α induisant l'inhibition de eIF2B et de l'initiation de la traduction des protéines). Cette voie interviendrait aussi dans la régulation de la transcription de certains gènes impliqués dans le métabolisme des AA et/ou la protéolyse. La deuxième voie est la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui est une protéine centrale dans la régulation de la synthèse protéique. Elle entraîne la phosphorylation de 1) 4EBP1 qui, sous forme phosphorylée libère eIF4E et favorise la formation de eIF4F, 2) S6K1, kinase qui phosphoryle la protéine ribosomale S6 impliquée dans la traduction des ARNm particuliers, 3) eEF2 kinase qui active eEF2 en le déphosphorylant et intervient dans la stimulation de l'élongation. Les voies de signalisation pour la régulation de la protéolyse sont moins bien connues.

Figure 40 Voies de signalisation impliquées dans le mécanisme d'action des acides aminés (AA) sur la traduction protéique (Tesseraud et coll., 2007; Proud, 2002, Balage, Cours Master 2, Université Clermont-Ferrand 2)



AA : Acides Aminés
mGCN2 : Kinase phsophorylant eIF2a
EIF2α : Eukaryotic initiation factor 2 α
mTOR : Mammalian target of rapamycin
4EBP1 : Eukaryotic initiation factor 4E binding protein
S6K1 : Ribosomal protein S6 kinase 1
eEF2 : Eukaryotic elongation factor 2

La protéine mTOR est un point de convergence de la signalisation de l'insuline et des AA concernant la régulation de la synthèse protéique et une interaction entre insuline et AA dans la stimulation de la synthèse protéique musculaire a été montrée (Anthony et coll., 2002; Yoshizawa, 2004). En effet, la leucine stimule la secrétion d'insuline (Rennie et coll., 2004) et Anthony et coll. (2002) ont montré que l'insuline facilitait la synthèse protéique musculaire stimulée par le leucine et la phosphorylation de 4EBP1 et S6K1. Par contre, la formation du complexe eIF4G-eIF4E est indépendante des niveaux d'insuline dans le muscle suite à une administration de leucine chez le rat (Anthony et coll., 2002). Au niveau musculaire, le rôle de l'insuline semble donc plutôt permissif (Yoshizawa et coll., 2004; Anthony et coll., 2002).

Les mécanismes semblent différents au niveau du foie mais ont été moins étudiés. En effet, la leucine ne permet pas, à la différence du muscle, de stimuler seule la synthèse protéique hépatique globale chez le rat (Anthony et coll., 2001b). Par contre, les AACR sont capables de stimuler la phosphorylation de 4EBP1 et la leucine seule (mais pas la valine et l'isoleucine) favorise l'association de eIF4G et eIF4E, stimulant ainsi l'initiation de la traduction (Shah et coll., 1999; Anthony et coll., 2001b). Ainsi, malgré l'activation de ces voies de signalisation, la synthèse protéique hépatique n'est pas stimulée par la leucine, c'est pourquoi l'activation d'autres voies de signalisation, et l'action de l'insuline en particulier, (Yoshizawa et coll., 2002) est nécessaire pour permettre une stimulation effective de la synthèse protéique hépatique. Cependant, comme présenté dans le paragraphe précédent, l'insuline seule n'est pas suffisante pour stimuler la synthèse protéique hépatique, suggérant une interaction forte entre AA et insuline dans ce tissu (Meijer et coll., 1999).

Comme nous l'avons vu, le glucose et les AA jouent donc un rôle signal dans divers tissus et organes comme le muscle et le foie. Plus récemment, des études sur bovins en croissance (Gingras et coll., 2007) ont montré que des acides gras polyinsaturés (famille des n-3) induisaient une augmentation de la sensibilité des muscles à l'insuline, tendant à favoriser par ce biais l'efficacité de l'utilisation des aliments pour la croissance. Ceci a été confirmé sur porcelets (Bergeron et coll., 2007). Cet effet passerait par les mêmes voies de signalisation que celles précédemment décrites pour les autres nutriments: mTOR et S6K1. L'effet de ces acides gras pourrait ne pas se limiter au muscle dans la mesure où l'oxydation de la phénylalanine au niveau du corps entier est diminuée significativement (ce qui est en accord avec l'augmentation de l'utilisation des AA par les muscles) (Gingras et coll., 2007). Or comme nous l'avons vu précédemment, la phénylalanine est fortement oxydée par le foie, suggérant que le foie pourrait également être impliqué dans l'épargne d'AA lors d'une supplémentation en acides gras polyinsaturés de type n-3. Les mécanismes mis en jeu au niveau hépatique restent à élucider. Le foie se contente-t-il de ne pas oxyder des AA qui sont

utilisés prioritairement par le muscle ou a-t-il un rôle plus actif en diminuant spécifiquement son oxydation via une action directe des acides gras polyinsaturée n-3 ou via l'insuline?

5.2.1.2. AA et hydratation cellulaire (« cell swelling » en anglais) :

Une augmentation de l'apport d'AA dans la veine porte n'induit que peu d'effet sur l'osmolarité extracellulaire, par contre, l'osmolarité dans les hépatocytes change fortement. Les AA (ex : glutamine), transportés par des systèmes Na^+ dépendants, sont concentrés dans les cellules (en parallèle d'une accumulation de Na^+) et un flux d'eau entre dans la cellule (Meijer et coll., 1999). Cette entrée de Na^+ est compensée rapidement par une sortie de K^+ mais l'hépatocyte reste légèrement gonflé tant que l'AA est présent. Les hépatocytes restent plus ou moins gonflés selon l'activité des transporteurs d'AA dans la membrane cellulaire et le métabolisme intracellulaire des AA (et ses conséquences sur l'osmolarité) (Häussinger et coll., 2001). Cette hydratation cellulaire a des conséquences directes sur de nombreuses activités métaboliques des hépatocytes dont la stimulation de la synthèse de glycogène (Peak et coll., 1992) et de la synthèse protéique (Häussinger, 1996) et l'inhibition de la glycogénolyse et de la protéolyse (Häussinger, 1996; Häussinger et coll., 2001). L'expression de nombreux gènes est également modulée par l'hydratation cellulaire : enzymes de l'uréogenèse (arginosuccinate synthase ….), enzymes de la néoglucogenèse (phosphoenolpyruvate carboxykinase …), protéines de structure ou exportées (β-actine, tubuline, α2-macroglobuline) (Meijer et coll., 1999). Des interactions entre le volume cellulaire et l'insuline existent puisque la deshydratation cellulaire se traduit, entre autres effets, par une résistance à l'insuline (Schliess et coll., 2007) et une inactivation de la voie mTOR. Cependant, l'effet antiprotéolytique de l'hydratation cellulaire semblerait passer par d'autres voies de signalisation cellulaire (p38MAPK en particulier). Des mécanismes similaires dans d'autres types cellulaires (dont les entérocytes) sont probables (Haussinger et coll., 2001) en particulier dans le cas de la glutamine qui est fortement utilisée par les TDVP.

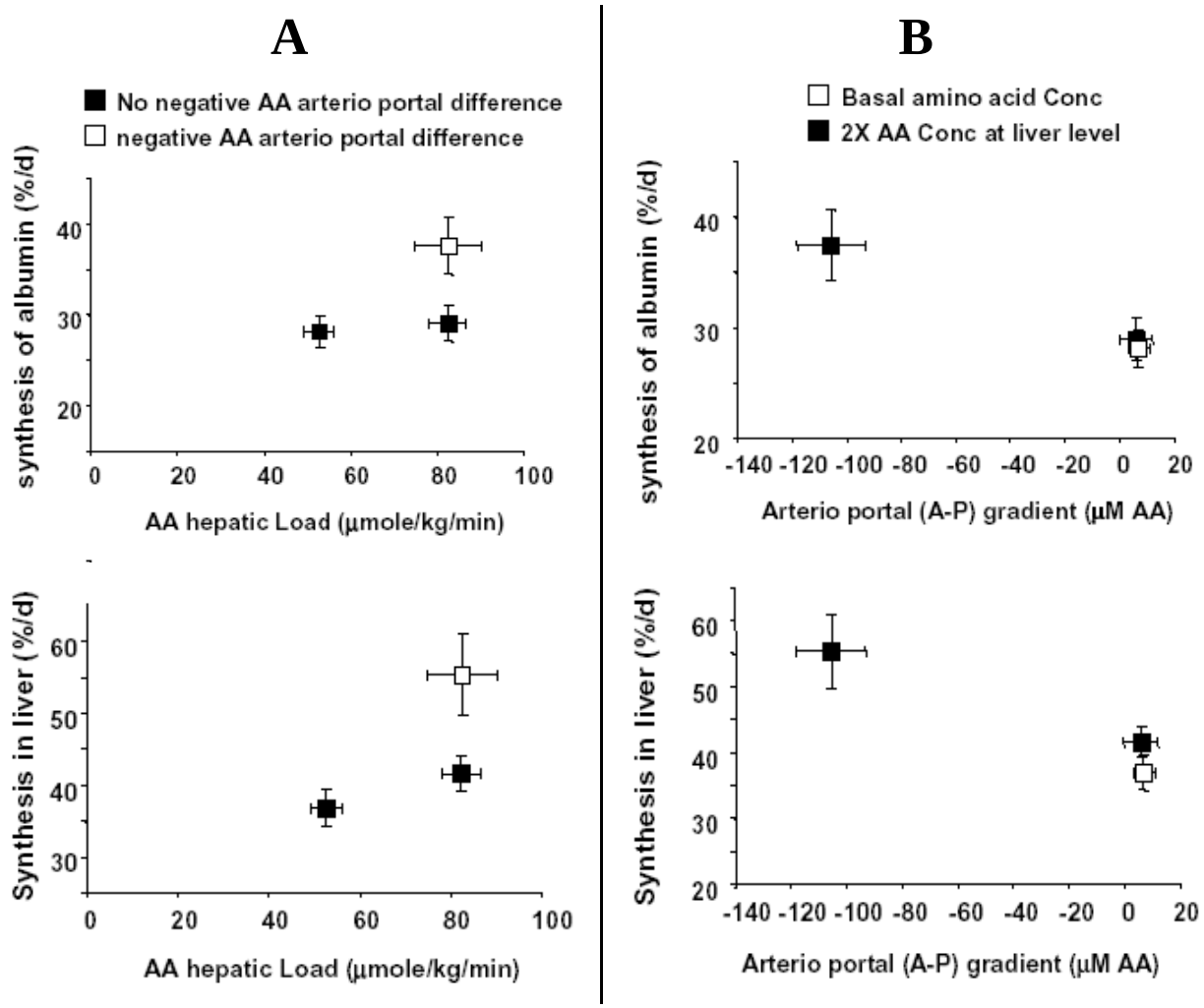
5.2.2. Le signal porte

La réponse du foie aux AA et aux hormones semble donc particulièrement complexe étant donné l'ensemble des voies de régulation potentiellement activées. Cependant, ces mécanismes de régulation n'expliquent pas nécessairement la différence de réponse de la synthèse protéique hépatique à l'apport de nutriments par voie entérale ou parentérale (car dans les deux cas, insuline et AA sont augmentés simultanément). En effet, deFronzo et coll. (1978) ont mis en évidence que chez le Monogastrique, le prélèvement net hépatique en glucose était plus augmenté lorsque le

glucose était fourni par voie entérale plutôt que par voie parentérale malgré une glycémie similaire et une perfusion d'insuline (clamp euglycémique hyperinsulinémique). Ce phénomène a été attribué à une différence artério-portale négative dans le cas de l'ingestion de glucose, alors que cette différence n'existe pas lors de la perfusion de glucose (DiConstanzo et coll., 2006). Ce mécanisme est communément appelé le « signal porte » même si ce signal est en fait généré par une différence artério-portale en nutriments. Le prélèvement net hépatique de glucose répond également à la perfusion d'AA néoglucogéniques (c'est-à-dire que le prélèvement net de glucose induit par la perfusion porte en glucose est annihilée par les AA) (Moore et coll., 1999a). Enfin, les mêmes AA perfusés en veine porte sont capables de stimuler le prélèvement de glutamine et donc stimuler la néoglucogenèse et la synthèse de glycogène (Moore et coll., 1999b).

L'ensemble de ces données sur le métabolisme du glucose et l'interaction avec les AA néoglucogéniques a amené Dardevet et coll. (2006) à envisager la présence d'un « signal porte » induit par les AA sur d'autres métabolismes hépatiques que celui du glucose, et en particulier la synthèse protéique. Cette hypothèse de la présence d'un « signal porte » impliquant les AA permettrait d'expliquer pourquoi les AA apportés dans le repas stimulent la synthèse de l'albumine alors que la perfusion d'AA par voie intraveineuse n'induit pas de stimulation (Ballmer et coll., 1995) (**Partie 3.2.2**). De même elle permettrait d'expliquer pourquoi le taux d'extraction net des AA par le foie (relativement à l'apparition nette portale) reste assez constant dans des situations nutritionnelles variées chez le ruminant (Tableau 7). En effet dans ce calcul, l'apparition nette portale est calculée par différence entre les concentrations artérielles et portales en AA (multipliées par le débit). Un taux d'extraction net hépatique constant implique une bonne corrélation entre le prélèvement net en AA hépatique et l'apparition nette portale en AA et renforce l'hypothèse de la présence de ce « signal porte ». Des données récentes de Dardevet et coll. (2008) (Figure 41) ont montré, sur chien soumis à un clamp euaminoacidémique, euglycémique et hyper aminoacidémique que la synthèse d'albumine était augmentée uniquement en présence d'une différence artério-portale en AA et non lorsque ces mêmes AA étaient perfusés en voie périphérique (c'est-à-dire en l'absence d'une différence artério-portale), et ceci à des niveaux d'AA artériels identiques.

Figure 41 Synthèse protéique fractionnaire d'albumine et de protéines constitutives au foie (% / j) en présence ou absence d'un gradient artério-portal en acides aminés (AA) (Dardevet et coll., 2008).
A : Un gradient artério-portal négatif augmente la synthèse protéique d'albumine et de protéines hépatiques endogènes (+30 %) comparativement à un groupe également perfusé en AA mais sans gradient artério-portal.
B : En euaminoacidémie, la perfusion d'AA n'augmente pas la synthèse protéique hépatique. Par contre, un doublement de la charge en AA combinée avec un gradient artério- portal négatif induit une augmentation de la synthèse de l'albumine et des protéines hépatiques endogènes (+30%).



Il faut toutefois préciser que même si nos données sur Ruminants s'accordent bien avec l'hypothèse de la présence d'un « signal porte », celui-ci reste à démontrer car toutes les études explicitées ci-dessus ont été réalisées dans leur grande majorité chez le chien. De plus, comme nous l'avons montré en **partie 3.1.1.**, les taux d'extraction hépatique ne sont pas constants lors de restrictions alimentaires sévères ou lorsque les besoins en AA sont importants (animaux en lactation ou en forte croissance, Tableau 7). Dans ces situations particulières, le « signal porte » n'explique

plus à lui seul le prélèvement hépatique en AA d'autres nutriments et une intéraction avec les hormones doit jouer un rôle prépondérant.

La régulation du métabolisme hépatique des AA commence donc à être relativement bien documentée dans le cas du foie : effet des hormones, des AA signaux, hydratation cellulaire, concept du signal porte. Cependant ces mécanismes sont, pour certains d'entre eux, fortement interdépendants. Il est donc difficile, à partir de résultats in vivo, d'attribuer ces modifications à un facteur de régulation particulier. Concernant le tube digestif, et comme précisé par Reeds et coll. (1999), on peut être étonné de voir le manque de données concernant les mécanismse de régulation du métabolisme des entérocytes et des TDVP lors de modulation d'apport ou de composition du régime chez les animaux. Récemment, certains peptides ont été particulièrement étudiés : les glucagon-like peptides (GLP-1 et 2) produits par les cellules L entérales, et secrétés en fonction de l'apport en nutriments (et en particulier suite à la consommation de fibres et acides gras à chaine courte). Ces peptides pourraient stimuler la croissance des cellules de la muqueuse intestinale (Drucker, 2001). L'étude de ces peptides chez les Ruminants (secrétion, impacts sur le métabolisme du tube digestif) pourrait avoir des répercussions potentiellement positives en terme d'efficacité d'utilisation des AA alimentaires (Burrin et coll., 2003).

Conclusion de l'étude bibliographique

Les données bibliographiques montrent donc clairement que :

- Un déséquilibre entre les apports azotés et énergétiques dans la ration a un impact important sur l'efficacité métabolique d'utilisation de l'azote.

- Les tissus de l'aire splanchnique, et en particulier le foie, jouent un rôle primordial dans la régulation de nombreux processus homéostatique comme le maintien de l'aminoacidémie, la glycémie et la détoxification de l'ammoniaque. Ces processus sont dépendants des apports alimentaires d'AA (et d'énergie) et des besoins des tissus (muscle et mamelle) qui constituent un drain d'AA.

- Le prélèvement net splanchnique et les voies métaboliques utilisant les AA au niveau du tube digestif et du foie sont régulés par la fourniture en AA aux tissus (et en autres nutriments), la nature de l'alimentation, l'utilisation des AA par les autres tissus et organes, les hormones et les nutriments « signaux ». Les modifications nutritionnelles étudiées modulant

souvent plusieurs de ces facteurs simultanément, la part relative de chacun dans les processus de régulation est souvent délicate à estimer. Par exemple, une augmentation de l'apport d'énergie dans la ration de ruminants se traduit souvent par une augmentation de l'insulinémie mais aussi par l'augmentation de l'effet « nutriment signal » lié à l'apport de nutriments.

L'ensemble de ce travail de bibliographie, dont une partie s'est focalisé sur le métabolisme hépatique des AA et sa régulation a été valorisé sous forme de la revue de synthèse suivante : Régulation nutritionnelle du devenir anabolique des acides aminés dans le foie (synthèse protéique et néoglucogenèse).

Publication de synthèse bibliographique

Publication de synthèse bibliographique

Régulation nutritionnelle du devenir anabolique des acides aminés dans le foie (synthèse protéique et néoglucogenèse)

Guillaume Kraft, Tim Wester, Dominique Dardevet, Didier Rémond, Isabelle Ortigues-Marty et Isabelle Savary-Auzeloux.

En préparation pour Nutrition Research Reviews

Résumé : A l'interface entre l'apport et les besoins en nutriments, le foie joue un rôle central dans la répartition des nutriments azotés entre les différents tissus et organes chez les mammifères. Le prélèvement net en acides aminés par le foie dépend essentiellement de l'apparition nette portale en ces mêmes acides aminés. Cependant, la réponse du foie est moins dépendante de l'apport en nutriments lorsque le besoin en acides aminés est fort (ex : croissance intense ou lactation) ou lorsque certaines voies du métabolisme hépatique deviennent prioritaires (comme la synthèse des protéines de la réaction inflammatoire lors d'un sepsis). L'oxydation des acides aminés ou la synthèse des protéines exportées semble, comme dans le cas du prélèvement net en acides aminés, répondre à l'apport de nutriments au foie. Les données obtenues dans ce domaine sont très cohérentes entre les espèces mammifères (du carnivore à l'herbivore en passant par le monogastrique). Par contre, la néoglucogenèse à partir des acides aminés est moins dépendante de l'apport d'acides aminés et dans ce cas, la nature des nutriments apportés (ratio énergie / azote, nature des nutriments azotés) et les hormones comme l'insuline peuvent jouer un rôle plus central dans les régulations. La néoglucogenèse est également modulée par les facteurs nutritionnels de manière très différente entre monogastriques d'une part (dont le glucose sanguin provient en grande partie de l'apport alimentaire) et ruminants / carnivores d'autre part (dont le glucose sanguin est essentiellement d'origine endogène: néoglucogenèse, glycogénolyse).

Une compilation de données provenant d'expériences réalisées sur moutons et bovins a montré que le prélèvement net en acides aminés par le foie répondait plus à l'apparition nette portale en acides aminés qu'à l'influx d'acides aminés en veine porte (concentration en acides aminés en veine porte x débit plasmatique), ce qui tend à confirmer la présence d'un "signal porte" qui régulerait le prélèvement net en acides aminés et la synthèse protéique dans le foie. Cependant, ce signal ne semble plus réguler le prélèvement net d'acides aminés par le foie lorsque les besoins des tissus périphériques sont augmentés (ex: vaches en lactation ou animaux traités aux hormones de croissance). Dans ce cas, la nature des nutriments apportés au foie et / ou les hormones pourraient devenir essentiels mais les mécanismes mis en jeu restent à élucider. Comme les concentrations en insuline et glucagon en veine porte (et rarement dans le sang artériel) sont souvent modulées dans diverses situations nutritionnelles, l'impact de ces hormones présentes en veine porte sur le métabolisme hépatique des AA serait à approfondir.

Nutritional regulation of the anabolic fate of amino acids within the liver (protein synthesis and gluconeogenesis).

G. Kraft[1], T Wester[2], D Dardevet[3], D Rémond[3], I Ortigues-Marty[1], I Savary-Auzeloux[1]

[1] Herbivores Research Unit, Institut National de la Recherche Agronomique, Clermont Ferrand, F-63122 Ceyrat
[2] Institute of Food, Nutrition and Human Health, Massey University, Palmerston North, New Zealand
[3] Human Nutrition Research Unit, Institut National de la Recherche Agronomique, Clermont Ferrand, F-63122 Ceyrat

Abstract

At the junction between nutrients supply and requirements, the liver is playing a central role in nitrogenous nutrients partitionning between the various tissues and organs of mammals. The net amino acids uptake by the liver is driven mainly by the net portal appearance of amino acids in various nutritional situations. However, the liver response is less dependant on the nutrients supply when the requirements by the peripheral tissues is substantial (i.e. intense growth or lactation) or when some metabolic pathways within the liver become a priority (such as the synthesis of acute phase proteins during sepsis). Oxidation of amino acids and exported protein synthesis seem, such as the net amino acid hepatic uptake, to respond to the nutrients supply. To that respect, the data obtained in various species (from carnivores to ruminants, including monogastrics) are consistant. On the contrary, gluconeogenesis from amino acids is less dependant on amino acids hepatic supply and in this case, the nature of nutrients supplied (ratio nitrogen / energy, nature of nitrogenous nutrients) and hormones such as insulin may play a more prominent role in these regulatory processes. Gluconeogenesis is also regulated by nutritional factors very differently between monogastrics on one side (where glucose can be extensively absorbed by the digestive tract) and ruminants/carnivores on the other side (where blood glucose is mainly from endogenous origin: via gluconeogenesis or glycogenolysis).

The compilation of data from several experiments performed in sheep and bovines show that the hepatic net amino acids uptake is more responsive to the net portal appearance of amino acids than to the portal amino acids influx (portal amino acids concontrations x plasma flow), which sustains the concept of the presence of a “portal signal” driving the net amino acids uptake and protein synthesis within the liver. However, this signal is blunted when the amino acids requirements by the peripheral tissues are increased (i.e. lactating cows or growth hormone-treated

animals). In that case, the role of the nature of nutrients supplied and/or hormones may be prominent but the mechanisms involved remain to be determined. Because insulin and glucagon concentration in the portal vein (and rarely in arterial blood) may be modified in the various nutritional situations tested, the impact of these hormones supply to the liver via the portal vein is questioned.

Introduction

Whatever the species and objectives, coordinating nutrient supply and requirement is a priority for nutritionists. This is especially true for animal production where a deficit or an excess of nutrients can lead to a lower level of production (e.g., milk or meat) or an increased loss of nutrients into the environment as effluent (Hanigan, 2005; Reynolds, 2002; Lobley, 2003). In both cases, the economic loss can be substantial for the farmer. Similarly, a balance between nutrient supply and requirement is desired in Human nutrition, for example, to allow optimal growth in premature infants, avoid muscle loss during ageing and cachexia, and prevent obesity (Leverve, 2001; Boirie et al., 1997; Burrin and Davis, 2004). The high metabolic activity of the splanchnic tissues, chiefly the small intestine and liver, are largely responsible for setting the maintenance energy and protein requirements of the whole animal (Jourdan et al., 2007; Volpi et al., 1999; Lobley and Lapierre, 2003). In ruminants, the splanchnic tissues (gut + liver) contribute to about 50% of the energy expenditure whereas they represent less than 10% of the whole body protein mass (Lobley, 2003). Similar contributions have been shown in monogastrics (Stoll & Burrin, 2006). Among the various metabolic event which use energy, protein synthesis and amino acids (AA) metabolism in general participate greatly to overall energy expenditure (Lobley, 2003; van Milgen, 2002). Indeed, in chicks, the use of protein synthesis inhibitors *in vivo* lower oxygen consumption by more than 30% (Aoyagi et al., 1988; Lobley, 2003). Consistent results are obtained in sheep tissues *in vitro* (Early et al., 1988; Lobley, 2003). In addition, AA can be used as energetic nutrients in the portal drained viscera (oxidation) (van der Schoor et al., 2001) and are used for gluconeogenesis (Nuttall et al., 2008).

The liver specifically represents an inproportionately high metabolic rate (25% of whole body energy expenditure and 4-15% of protein synthesis) in relation to its small contribution to body protein mass (2%) (Lobley, 2003) in ruminants, which reflects its central role in the maintenance of glucose and amino acid homeostasis (see Dardevet et al., 2006 for Review). Associated with this high metabolic activity, the fate of nutrients, and particularly amino acids (AA) within the liver can be various due to the numerous interconnected metabolic pathways. Because they contain nitrogen but also a carbon chain, the AA can be used for protein synthesis (exported

and constitutive proteins), gluconeogenesis, oxidation, ureagenesis, transamination and synthesis of specific molecules (peptides, nucleic acids, hormones, hippuric acid …) (Lobley and Milano, 1997). The activity (absolute or relative to others) of each of these numerous pathways is conditioning the nutrients availability to the peripheral tissues (muscle, udder, embryo, etc.).

Because of the complexity of the various fates of AA within the liver, we focused this review on the nutritional regulation of the anabolic fates of AA: protein synthesis and gluconeogenesis. Of course, the liver is also known to play an important role in regulating plasma-AA concentration via AA catabolism and ureagenesis (Meijer et al., 1999); consequently, AA in excess are catabolised within the liver into urea (Lapierre and Lobley, 2001) to maintain AA homeostasis, for instance. Ureagenesis is also essential, particularly in ruminants, in allowing ammonia (toxic when present peripherally) to be detoxified into urea and excreted safely. The catabolism of AA into urea and CO_2 and its regulation has been extensively reviewed elsewhere and will not be detailed here (Olde Damink et al., 2002; Lapierre and Lobley, 2001; Baker et al., 2005). This review will give an overall view of the nutritional regulation of protein synthesis and gluconeogenesis in various species, combining data from ruminants and monogastrics which is seldom, if ever, done in the litterature. This cross-species approach will help explain how the liver's metabolic plasticity can maintain nitrogen homeostasis and what potential mechanisms can regulate this plasticity.

Net hepatic uptake of AA by the liver

Technical issues

To assess the *in vivo* hepatic utilization of nitrogen, many studies have used the 'black box' approach (Reynolds, 2006) on multicatheterized animals in which the net hepatic uptake of nitrogen (AA, ammonia, urea, sometimes peptides) can be measured. This approach has been coupled more recently to the infusion of labeled AA (radiolabeled molecules or stable isotopes) to better estimate the metabolic fate of AA (Stoll and Burrin, 2006). In the case of the liver, these combined techniques have been used in monogastrics (Bruins et al., 2003; Stoll et al., 1997; de Blaauw et al., 1996) and ruminants (Lobley et al., 1996; Raggio et al., 2007; Savary-Auzeloux et al., 2008, unpublished) and have provided an estimate of protein synthesis or export protein synthesis as well as AA oxidation. However, such approaches cannot be easily applied in humans where hepatic export protein synthesis (index of hepatic protein synthesis rate) and overall splanchnic (digestive tract plus liver) extraction using enteral and venous labeled AA infusion (Boirie et al., 1997) are only accessible and where direct *in vivo* hepatic metabolism can only be measured in specific situations such as during hepatic surgeries (van de Pool et al., 2007; Barle et al., 1997).

Regulation by nutrient supply and whole body AA requirements

Response to AA supply

The net hepatic uptake of AA represents a substantial amount of the net portal drained viscera (PDV) AA release (average 30% for BCAA and Lys and between 50-80% for the other EAA in ruminants and monogastrics). However, this does not mean that this average of 50% AA hepatic uptake results from a "first pass" metabolism of AA. Indeed, the ratio of net hepatic AA uptake is lower (below 30%) when expressed relative to the total AA influx to the liver in ruminants (i.e., AA concentration in portal vein and artery x blood flow, as extensively discussed by Lobley et al., 2000; Reynolds, 2006, Hanigan, 2005). Accordingly, the first pass extraction rate by the liver has been estimated at less than 15% of intragastrically infused tracer in piglets (Stoll et al., 1998). This means that the 'first pass' AA extraction rate within the liver, even if still significant, allows substantial amounts of AA to remain available to the peripheral tissues (muscle, udder, etc.). This implies, in terms of regulation, that the liver "senses" the alterations of supply of nutrients from the diet ("push" effect) (via the portal vein), but also integrates the requirements by other tissues and organs ("pull" effect) (via the arterial and portal supply of nutrients). To this complex integrative system must be added hormones (e.g., insulin and glucagon) whose plasma concentrations are also altered by nutritional factors.

More data on the impact of nutritional factors on the net hepatic uptake of AA are available in ruminants relative to monogastrics. It is generally accepted that the essential AA (EAA) and total AA (TAA) uptake by the liver is responsive to the AA supply in ruminants and monogastrics (Lapierre et al., 2000; Savary-Auzeloux et al., 2003; Rerat, 1995; Bloomgarden et al., 1981; Moore et al., 1994). Extensive data obtained in multicatheterized ruminants allow to understand how the AA supply to the liver can affect its net AA uptake. Results from our group combined with data taken from the literature were used to calculate the net TAA hepatic uptake relative to various variables in growing or adult sheep (Figure 1). The lines correspond to the regression curves obtained between experimental diets within each study. This figure shows that the net hepatic uptake increases as net PDV release in AA increases (i.e., mass action effect) in ruminants, as suggested by Reynolds (2006). Hence, when expressed as a percentage of the net PDV release, the net hepatic uptake remains fairly stable when the level of intake or AA supply to the liver is altered (Table 1). Still, this ratio can be altered in extreme nutritional situations such as starvation or low intakes in ruminants (Eisemann and Nienaber, 1990; Lapierre et al., 2000).

In addition to an overall uptake of AA, the hepatic metabolic activity also affects the plasma concentration of individual AA. Indeed, the net hepatic removal of AA is highly variable between

AA : 0-30% for BCAA, >50% for Phe and Met, 60 to >100% for Ala, Gly and Gln (Wray-Cahen et al., 1997; Lapierre et al., 2000; Lobley et al., 2000). Such as for the PDV, the liver affects the AA profile released in the hepatic vein. As shown above, the uptake of EAA by the liver is highly responsive to the supply (Hanigan, 2005), except for BCAA and Lys whose extraction rate is very small (Reynolds, 2006; Kraft et al., 2008, submitted). Only the non-essential amino acids (NEAA) involved in the interorgan nitrogen and carbon cycling (Asn, Asp, Ala, Gln and Glu) are less responsive to the supply (Hanigan, 2005).

Response to AA demand

There are physiological / pathological situations where, contrarily to what shown in Figure 1, the net hepatic uptake of AA is less dependant on AA supply. Two situations have been studied in the literature where an intense utilization of AA by specific tissues, organs or metabolic pathways has been created: 1) when the production rate is intense (i.e., growth or lactation) and these studies concern ruminants mainly, and 2) during hypermetabolic sepsis which has been mainly studied in pigs or rats (as models for humans).

The majority of the data concerning the effect of an increased production rate come from steers (with or without exogenous growth hormone (GH)) and lactating vs. non lactating cows. As shown in Table 1, when the demand for AA is increased (i.e., lactation or GH administration), the hepatic net AA removal (relative to the net PDV release) is decreased, probably via decreased AA oxidation within the liver since the net hepatic urea release is also decreased (Reynolds et al., 1992; Bruckental et al., 1997). A decreased oxidation of phenylalanine has been directly demonstrated in GH-treated piglets infused with labelled phenylalanine (Bush et al., 2003). This phenomenon is enhanced when the AA availability is low and the necessity to spare AA maximum (i.e., with low intake and/or GH administration, Reynolds et al., 1992).

Pathological situations can also induce a specific alteration of hepatic AA uptake and metabolism. For instance, in hypermetabolic sepsis in pigs (Bruins et al., 2003), the EAA (and some non essential AA) net hepatic uptake was strongly increased, due to an increased utilization of AA by the liver for protein synthesis (particularly the secreted proteins involved in the acute phase response, Vary and Kimball, 1992) and gluconeogenesis. Similarly, the contribution of the liver to whole body protein synthesis is also increased in rats infected with E. coli (Obled et al., 2002). Consequently, in the case of diseases, the hepatic requirements for all AA are increased for the synthesis of acute phase proteins and gluconeogenesis. Because Phe and sulfur-AA are relatively abundant in acute phase proteins, the hepatic requirement for these AA is exaggerated (Ortigues-Marty et al., 2003). Some specific AA can also be considered as conditionally essential in

hypermetabolic sepsis. For instance, the three following AA present a higher flux and a pool depletion in acute diseases: Cys (involved in the synthesis of taurine and glutathione), Arg (involved in nitric oxide synthesis, and degradation by the urea cycle), and Gln (increased catabolism via the urea cycle, transport of nitrogen from the periphery to viscera, glutathione synthesis, immune cell energy substrate) (Obled et al., 2002; Luiking and Deutz, 2007).

Consequently, the liver generally responds to the majority of the nutritional stimuli (and particularly AA supply) according to a "mass action law". However the net uptake of AA by the liver becomes more complex 1) when the requirements by the tissues and organs is intensified (i.e., during intense growth stimulated by GH, or lactation), or 2) when some of the hepatic AA metabolic pathways become a priority (such as export protein synthesis or glutathione synthesis) in some stress situations such as sepsis or in extreme nutritional situations (below maintenance or during fasting). Two questions can arise from these observations: 1) which hepatic metabolic pathways are regulated following nutritional, physiological or pathological challenges, and 2) what regulatory mechanisms allow the liver to respond to these challenges and maintain homeostasis.

Hepatic protein synthesis

Tracer methodologies: limitations

Whatever the technique used for measurement of hepatic protein synthesis, several authors have pointed out the issue of the assessment of the specific activity or enrichment of the free amino acid pool (i.e., precursor pool) used for calculation of absolute or fractional synthesis rates of constitutive and exported protein synthesis. This comes from tracer-associated difficulties but also from the specificity of the hepatic physiology and metabolism. Indeed, the tRNA-AA which is supposed to be the 'true precursor pool' of protein synthesis (Watt et al., 1991) is not always accessible (especially in humans) and is technically difficult to measure. Any other AA specific activity or enrichment measured (i.e., intracellular AA or AA and metabolite in plasma withdrawn from various sites) is then *de facto* an estimate. The fact that the liver is perfused via arterial and portal blood adds some complexity to the whole system. The liver is also partitioned between the periportal and perivenous hepatocytes which adds biochemical heterogeneity, with a zonation of the enzymes linked to AA catabolism, ammonia and urea metabolism, and plasma proteins synthesis (see Lobley et al., 2000 for review). This means that the precursor pool for endogenous vs. exported but also between specific exported proteins may be different (discussed by Cayol et al., 1996). In addition, the precursor pool AA enrichment may vary depending in the nutritional state, particularly because no labeled AA coming from proteolysis induce a substantial isotopic dilution which affects

the calculation of protein metabolism within the liver (discussed by Stoll et al., 1998). Consequently, and for all the reasons cited above, there is no clear consensus on which precursor pool is most appropriate for the synthesis of hepatic proteins.

Yet, and knowing that, several authors have compared tRNA-AA enrichments with various enrichments in the hepatic free AA, in blood withdrawn from the artery, portal and hepatic veins, and apolipoprotein B-100 very low density lipoproteins (apoB-100 VLDL) in order to determine the 'best' available estimate for the precursor pool. Several studies suggest that intrahepatic AA precursor pool enrichment can be properly estimated using apoB-100 VLDL enrichment as an indicator (Reeds et al., 1992; Jahoor et al., 1994; Cayol et al., 1996, Connell et al., 1997). The free AA enrichment in the hepatic vein (limited to studies in catheterized animals) has been shown to be close to the ApoB-100 enrichments and the intracellular AA enrichment and, hence, may be an appropriate estimate in ruminants (Connell et al., 1997; Raggio et al., 2007; Savary-Auzeloux et al., unpublished) and monogastrics (Baumann et al., 1994; Barazzoni et al., 1999). However, apoB-100 may, especially in the fed state, preferentially incorporate portal AA (i.e., extravascular space) (Cayol et al., 1996; Stoll et al., 1997 and 1998), suggesting that apoB-100 enrichment may represent different precursor pools depending on the nutritional state. Other studies have shown that KIC (keto-isocaproate) enrichments (in the case of labeled leucine infusion) can be an appropriate estimate of leucyl-tRNA within the liver for endogenous and exported protein synthesis (Ahlman et al., 2001; Barazzoni et al., 1999). However, the fact that KIC, mainly released by the skeletal muscle, renders its utilization as an estimate questionable for the liver, especially in the fed state (Cayol et al., 1996; Baumann et al., 1994, Connell et al., 1997). Lastly, and to overcome the problems of precursor pool enrichments, some studies have used the flooding dose technique which homogenizes the enrichments in the various pools of AA within the liver, including the tRNA-AA (Caso et al., 2000 and 2002; Barle et al., 1997 and 2001). One can hypothesize a stimulation of hepatic protein synthesis by the flooding dose itself but the fractional synthesis rates obtained for albumin for instance are quite close whatever the technique (flooding dose or constant infusion) employed (as discussed by Caso et al., 2002 and Barle et al., 1997).

Impact of the level of intake or meal ingestion on hepatic protein synthesis

The contribution of the potential net AA uptake to export protein synthesis has been estimated in ruminants. These values vary between AA with greater than 50% of BCAA and Lys net hepatic uptake directed towards exported protein synthesis, whereas the contribution from Phe, which is also extensively oxidized within the liver, is 10 - 20% (Lobley and Milano, 1997; Connell

et al., 1997; Raggio et al., 2007; Savary-Auzeloux et al., unpublished). Nevertheless, even for AA extensively oxidized within the liver, the utilization of AA for protein synthesis is substantial.

Food intake has been shown to stimulate hepatic protein synthesis in monogastrics (Mosoni et al., 1996) and ruminants (Connell et al., 1997). This stimulation occurs especially in young animals (Burrin et al., 1992) via the m-TOR dependant process (Kimball et al., 2000) and declines with age (Davis et al., 2000). However, the stimulation of protein synthesis by feeding (or the level of intake in ruminants) cannot explain alone the high lability of liver protein content observed during food deprivation and refeeding (Lobley et al., 1994; Merry et al., 1987; Burrin et al., 1990; Hutson et al., 1982). This suggests that the constitutive liver protein pool is primarily regulated by protein degradation (Hutson et al., 1982; Surmacz et al., 1987; Ferland et al., 1992).

On the contrary, there is less doubt of the stimulatory effect of food intake on albumin synthesis (fractional and absolute rates) in monogastrics (De Feo et al., 1992; Caso et al., 2007; de Meer et al., 2000; Thalacker-Mercer et al., 2007; Hunter et al., 1995; Barber et al., 2000) and ruminants (Connell et al., 1997). However, the kinetics of other plasma proteins like fibrinogen can respond differently (Jahoor et al., 1996 and 1999; Jaleel & Nair, 2004; Giordano et al., 2001). For instance, contrary to albumin, fibrinogen synthesis is not increased by feeding (Cayol et al., 1996; De Feo et al., 1992). So, why is albumin so extensively studied in the literature? Several explanations can account for this. First, albumin is quantitatively the most important plasma protein (30% and more than 50% of total plasma proteins in ruminants and humans, respectively (Ruot, 2001; Connell et al., 1997; Savary-Auzeloux et al., 2008, unpublished). Second, albumin is considered as a biomarker of the nutritional state and its concentration is modified in various nutritional or pathological states (Barber et al., 2000). And third, because albumin is abundant and easily accessible in humans in whom its metabolism is considered to be an easily measured index of hepatic metabolic activity.

Level of protein intake and hepatic protein synthesis

Hepatic protein synthesis is also responsive to dietary protein intake (Frank et al., 2005). The ingestion of protein, more so than fat and carbohydrate, explains the variations in albumin synthesis induced by feeding or food restriction (Caso et al., 2007). Acute changes in dietary protein, such as after a meal (Fouillet et al., 2002) or between 0 and 16% protein content in the diet (Cayol et al., 1997), clearly increase albumin fractional synthesis rate (+56% for Cayol et al., 1997). However, more subtle variation in nitrogen or protein supply in the diet, or a long term adaptation to diets with variable levels of protein, results in an attenuated or absent stimulation of albumin synthesis in humans (Thalacker-Mercer et al., 2007) and ruminants (Raggio et al., 2007; Savary-

Auzeloux et al., 2008, unpublished). Indeed, in ruminant studies, a 20% to 31% increase in nitrogen supply did not alter the total export or synthesis of albumin. Even when hepatic uptake of EAA increased, albumin synthesis was not stimulated, suggesting that either the exported protein synthesis was already at its maximum even at the lowest nitrogen intakes, or that exported protein synthesis was not prioritized relative to hepatic catabolic pathways (oxidation) (Raggio et al., 2007; Kraft et al., 2008, submitted) (Figure 2).

Effects of AA, other dietary macronutrients, and insulin on hepatic protein synthesis

Among the plethora of nutrients and hormones whose concentrations are altered after food ingestion, AA and insulin are essential for the stimulation of postprandial protein anabolism, particularly in muscle (Dardevet et al., 2006; Prod'homme et al., 2004 and 2005). Because of this key role of AA and insulin on protein metabolism, their effects (taken together or separately) have been specifically studied on liver.

In the majority of studies in adult and young monogastrics and ruminants, insulin has no effect on overall hepatic protein synthesis measured *in vivo* (Mosoni et al., 1993; Ahlman et al., 2001; O'Connor et al., 2004; Tauveron et al., 1994; Davis et al., 1998, 2001 and 2002). Boirie et al. (2001), however, found a trend for decreased hepatic mitochondrial protein fractional synthesis rate after infusion of insulin in pigs. In contrast to decreased mitochondrial protein synthesis, other authors demonstrated either that insulin stimulated exported protein synthesis with an increased albumin fractional synthesis rate in normal humans administered insulin (De Feo et al., 1993, Volpi et al., 1996), or decreased albumin fractional synthesis rate in insulin deficient (diabetic) patients (De Feo et al., 1991). The effect of insulin on albumin production *in vitro* was equivocal, with either no effect (O'Riordain et al., 1995; Dardevet et al., unpublished) or a stimulatory effect similar to what was observed *in vivo* (Kimball et al., 1995; Flaim et al., 1985). *In vitro* results also show that insulin may act by regulating the levels of albumin mRNA and secretion as well as act on various steps of mRNA translation (Jefferson et al., 1983; Kimball et al., 1995; O'Connor et al., 2004). Similarly to their response to food intake, synthesis of fibrinogen and other positive acute phase proteins respond to insulin *in vitro* (O'Riordain et al., 1995) and *in vivo* in the opposite direction of insulin's effect on albumin synthesis (DeFeo et al., 1991 and 1993; Volpi et al., 1996).

Even if the action of insulin is a permissive regulator of protein synthesis in the liver (at least for the exported ones), AA are presumably its most potent regulator (Davis et al., 1998). Indeed, AA given orally (Burrin et al., 1992 and 1995) or parenterally (Davis et al., 2002; Hellerstein et al., 2002), increase hepatic endogenous and exported protein synthesis during neonatal life. This effect appears blunted with age (Davis et al., 2002), at least for endogenous

proteins (Mosoni et al., 1993; Anthony et al., 2001a) where regulation of hepatic proteolysis by AA seems predominant (Kadowaki & Kanazawa, 2003). This concept is valid when the AA supply fits globally with the requirements. However, when the diets were selectively deficient in one or several essential AA, such as BCAA or Trp, (Anthony et al., 2001b; Cayol et al., 1996) or when the demand for AA is elevated (such as in the growing or during lactating ruminant (Tauveron et al., 1996)), the AA supplied in the diet are capable of stimulating endogenous hepatic protein synthesis. This means that endogenous protein synthesis is maintained at a stable level (because it is necessary for optimum hepatic function) in adults and is only regulated in extreme situations when the competition for the utilization of AA by the body is increased (such as in fasting or lactation).

Contrarily to synthesis of endogenous proteins, albumin synthesis is more clearly responsive to the dietary AA supply in monogastrics (Volpi et al., 1996; Hunter et al., 1995). This can be explained as the AA supplied in the diet are specifically channeled to hepatic synthesis, particularly in the fed state in monogastrics (Stoll et al., 1998). However, when the AA supply is mildly decreased, their oxidation rate within the liver is primarily decreased while protein synthesis is preserved, as shown in lactating cows (Raggio et al., 1997) and sheep (Savary-Auzeloux et al., unpublished). The efficiency of AA utilization towards protein synthesis is hence increased, as shown *in vivo* by sustained export protein synthesis when the nitrogen supply in the diet is decreased (Raggio et al., 2007; Kraft et al., 2008, submitted) (Figure 2). Recent data from our group on liver slices incubated in a minimum medium (without hormones but with physiological concentrations of nutrients) confirm this hypothesis as hepatic protein synthesis was greater when the liver slices were from lambs fed a nitrogen-deficient diet (Figure 3). This increased efficiency, revealed clearly *ex vivo* where the nutrient supply to the hepatocytes is fully controlled, shows a long-term adaptation of the hepatic cells (i.e., an increased efficiency of AA transport systems or an increased sensitivity of hepatocytes to the nutrients present in the incubation medium). Hence, and whatever the underlying mechanisms, albumin can be considered as temporary storage of AA which protects them from oxidation. This view has also been proposed by other authors (Fouillet et al., 2002; Caso et al., 2007; Volpi et al., 1996). In other words, albumin synthesis may be a means to spare AA from hepatic oxidation and act a reserve for use in peripheral tissues such as the muscle (Maxwell et al., 1990; Lobley et al., 2000). Even if AA from albumin may not be necessary to support mammary gland metabolism and milk protein production in lactating cows (Raggio et al., 2007; Lobley, 2003), it may represent a substantial supply of phenylalanine in particular in growing animals (Kraft et al., 2008, submitted).

Gluconeogenesis

Another anabolic fate of AA within the liver is the utilization of their carbon skeleton for glucose synthesis. The net hepatic glucose release is the consequence of the activity of two metabolic pathways: glycogen breakdown (glycogenolysis) and *de novo* synthesis of glucose (gluconeogenesis) (Postic et al., 2004). In addition, the *de novo* synthesis of glucose can be derived from other precursors, such as lactate and glycerol for monogastrics, and also propionate, lactate and glycerol in ruminants. Consequently, two questions arise, 1) what are the actual rates of gluconeogenesis by the liver in various physiological and nutritional states and, 2) what is the true contribution of AA in this *de novo* glucose production?

The measurement of gluconeogenesis by the whole body and the liver has been done using various methodologies (Nuttall et al., 2008; Wahren and Ekberg, 2007). Briefly, gluconeogenesis has been estimated in many species *in vivo* using the hepatic arterio-venous difference technique. This technique did not allow the estimation of gluconeogenesis *per se,* but the measurement of the net hepatic glucose production and the potential contribution of various precursors for glucose synthesis in several nutritional or physiological states could be calculated (Wahren et al., 1977 and 1981 in humans, Goetsch et al., 1994 and 1997; Reynolds et al., 1992 and 1994; Majdoub et al., 2003 in ruminants). Of course, each precursor is also used within the liver in other metabolic pathways, which leads to an overestimation of the actual contribution from each precursor. Later, the utilization of tracers was utilized to estimate gluconeogenesis. Addition of ^{14}C or ^{13}C labeled gluconeogenic substrates or glucose *in vivo* or to an incubation medium of hepatic cells has been used to measure directly glucose turnover and gluconeogenesis from different substrates (Danfaer et al., 1995; Demigne et al., 1986 and 1991; Overton et al., 1999). Alternatively, Landau et al. (1995) used $^{2}H_2O$ ingestion and the incorporation of ^{2}H on C_5 and C_2 of glucose for total gluconeogenesis measurement. The infusion of ^{13}C-labelled gluconeogenic precursors (glycerol, lactate, pyruvate) or U-^{13}C glucose and mass isotopomer distribution analysis was also used to estimate total gluconeogenesis and relative contribution of precursors *in vivo*, especially in humans (Reeds et al., 1997; Bequette et al., 2006). All these methodologies used *in vitro* or *in vivo* are subject to limitations (as reviewed by Nuttall et al., 2008, Wahren and Ekberg, 2007 and Reeds et al., 1997) and are still a matter of debate presently due to the difficulty in measuring accurately the labeling of the true gluconeogenic precursors and the loss of labeled carbons within intermediary metabolism (i.e., primarily the Krebs cycle). To place results of the *in vivo* studies in context with established metabolic pathways, key limiting gluconeogenic enzymes (phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase), fructose 1-, 6-biphosphatase and pyruvate carboxylase (PC) have also been examined (Postic et al., 2004; Burgess et al., 2007; Velez & Donkin, 2005). The expression (mRNA) and activity of these enzymes are good indicators the gluconeogenic

activity (Velez and Donkin, 2005). In addition, a specific alteration of the activity or mRNA levels for PC (which is involved in the utilisation of alanine and lactate in gluconeogenesis) relatively to PEPCK (which is not related to the utilisation of a specific precursor in gluconeogenesis) can give some informations on a potential swap/redistribution in the utilisation of gluconeogenic nutrients (Velez and Donkin, 2005). Lastly, and even if this review is focussed on liver, another site of gluconeogenesis within the body of ruminants and monogastrics has to be mentioned: the kidney (Stumvoll et al., 1999; Bergman, 1973; Brockman, 1993). Indeed, the proportion of glucose produced by the kidney in ruminants has been shown to be relatively small (8-10%) (Bergman, 1973; Brockman, 1993), but these values may be underestimated in ruminants (data obtained by arterio-venous difference) since rats injected with ^{14}C glucose presented a renal contribution or whole body glucose synthesis of 25% (Kida et al., 1978; Stumvoll et al., 1999). In humans, these values are even higher in the postprandial period with a contribution of the kidney to the endogenous glucose release of 60% (Meyer et al., 2002).

Whereas net AA uptake and protein metabolism present similarities between species, this is not at all the case for gluconeogenesis. Indeed, in monogastrics, glucose is essentially from exogenous, i.e., dietary, origin (Wahren and Ekberg, 2007), and the liver plays an important role in the uptake of glucose released by the digestive tract postprandially. On the contrary, in ruminants and carnivores, essentially all circulating glucose is from endogenous origin and is synthesized via gluconeogenesis from nutrients such as propionate, AA, and glycerol for ruminants and AA and glycerol for cats. Consequently, gluconeogenesis (from propionate and amino acids) is relatively of less importance in monogastrics compared to ruminants and cats; however it becomes substantial in the post absorptive state and early fasting (i.e., when the glycogen stores are decreased substantially). For instance, it contributes to about 50% (including kidney) to glucose turnover after an overnight fast in healthy humans (Landau et al., 1996).

Ruminants

In ruminants, 85% of the glucose is synthesized *de novo* in the liver (Ortigues-Marty et al., 2003) and direct glucose absorption from the gut is limited to diets rich in starch where ruminal capacity for starch digestion is exceeded (Huntington, 2006). Propionate is the major precursor for glucose synthesis in ruminants and *in vitro* (Demigne et al., 1986 and 1991) and *in vivo* (Veenhuizen et al., 1988) data show that the contribution of propionate to glucose synthesis could be 50-70%. This is due to a high affinity of hepatocytes for propionate compared to the other gluconeogenic precursors (Demigne et al., 1991). The regulation in gluconeogenesis is also different between monogastrics and other species. Gluconeogenesis is maximum in the fed state in

ruminants because it mainly depends on the supply of glucogenic precursors such as propionate and AA (Demigné et al., 1988 and 1991; Danfaer et al., 1995), and hence, decreases with fasting (Lomax et al., 1986). Even if propionate is the main glucose precursor, its contribution to gluconeogenesis decreases dramatically during feed restriction, whereas, the contribution of endogenous gluconeogenic precursors (AA in particular from proteolysis) increases (Lomax and Baird, 1983). However, the exact regulatory role of propionate on the regulation of its utilization for gluconeogenesis is not clear since Majdoub et al. (2003) showed that propionate infusion in lambs failed to increase glucose production by the liver. The modification of the mRNA levels of enzymes (PEPCK and PC) involved in gluconeogenesis during restricted vs. *ad libitum* intake showed an adaptation of enzyme expression to the profile of the precursors (Velez and Donkin, 2005). An increased utilization of gluconeogenic precursors other than propionate, such as AA, also occurs during lactation where propionate supply is not sufficient to meet the glucose requirements alone (Demigne et al., 1988; Greenfield et al., 2000). This is confirmed by increased glucose flux rate and milk protein secretion in lactating cows infused abomasally with casein (Clark et al., 1977). Similarly, when the glucose demand is experimentally increased such as after phlorizin treatment of lactating ruminants, overall hepatic glucose production and gluconeogenesis are increased (Veenhuizen et al., 1988; Overton et al., 1988) and AA have the potential to increase in importance as precursors for glucose production (Overton et al., 1999). On the contrary, when the AA are strongly diverted towards protein synthesis such as after growth hormone infusion, the increased milk production and gluconeogenesis (Knapp et al., 1992) is not accounted for an increased utilization of AA (Velez and Donkin, 2004; Pocius and Herbein, 1986) which are consequentially spared for protein anabolism. This important plasticity in the utilization of gluconeogenic precursors (i.e., propionate vs. the others) depending on the supply and demand in nutrients in ruminants can explain why the contribution of AA to gluconeogenesis is highly variable (2-40%, Danfaer et al., 1995).

Insulin is involved in net hepatic glucose uptake in ruminants (Danfaer et al., 1995) and may regulate hepatic gluconeogenesis in pre-ruminant calves (Donkin and Armentano, 1993 and 1995) and sheep (from lactate, glycerol and amino acids; Brockman et al., 1990 and 1985). Indeed, an intramesenteric infusion of insulin in fed or fasted sheep led to a 70% reduction of net hepatic glucose uptake associated with a reduction of the contribution of glucose precursor uptake by 30-50%, except for propionate (Brockman et al., 1990). Concerning glucagon, it is involved in glucose homeostasis in ruminants (Danfaer et al., 1995). However, the role of these two hormones seem reduced in ruminants relative to preruminant animals. Indeed, *in vitro*, Donkin and Armentano (1995) have shown that gluconeogenesis in hepatocytes from preruminant calves was responsive to

insulin and glucagon, whereas the sensitivity to glucagon and insulin were respectively dramatically decreased or even ablated in ruminating animals.

Mammalian Carnivores

Carnivores present a unique situation where they have evolved on diets high in animal tissues and, thus, high in protein, moderate in fat, and low in carbohydrates. It should be remembered that carnivore in its phylogenetic sense refers to the order Carnivora. The order Carnivora itself consists of many different species consuming just as varied diets. The terrestrial branch ranges from the Ailurids which are herbivores, to Canids, Ursids, and Procyanids which are omnivorous, to the Felids and Mustelids which are carnivores. When carnivore is used in the nutritional sense, it is as a "true" or "obligate" carnivore that is defined as those animals that evolved on diets high in animal tissue such that their metabolism has developed so that their diets must be obtained from animal sources, higher in protein than plants, or else be supplemented with the nutrients they can not convert from plant sources. For example, the domestic cat (*Felis catus*) has dietary requirements for taurine, vitamin A, niacin, and arachidonic acid) (MacDonald et al., 1984; Morris, 2002). In addition, an animal that receives little dietary carbohydrate will intuitively have to depend on gluconeogenesis to meet its metabolic requirement for glucose.

True carnivores have a higher requirement for N than omnivores. For example, house cats (the only domesticated carnivore) lack the ability to regulate AA catabolic and urea cycle enzymes and, thus, have a high obligate loss of nonessential AA via these pathways (Rogers et al, 1977). This is perfectly suited to animals that normally eat diets high in protein. Indeed, the effect of evolving on high protein diets is also expressed as very high levels of hepatic gluconeogenic enzyme activity in the cat (Rogers et al., 1977) and American mink (*Mustela vison*; Sorensen et al., 1995), indicating a large capacity for glucose synthesis from AA. In gluconeogenesis also, carnivores show little regulation by dietary protein intake where hepatocytes isolated from cats fed either a 17.5 or 70% crude protein diet did not differ in rates of gluconeogenesis from pyruvate, Ala, and Thr, although cells from high-protein cats converted Gln faster than those fed a lower protein diet (Silva and Mercer, 1985).

Little direct research has been performed on carnivores, however, a few studies suggest that gluconeogenesis in carnivores is at least superficially regulated similarly to ruminants based on their lack of dietary carbohydrate to supply glucose requirements (MacDonald et al., 1984). Maximal rates of gluconeogenesis in carnivores occur in the postprandial phase to coincide with AA absorption. In ruminants also, maximal gluconeogenesis occurs after a meal, and like the carnivore is continually operating.

Having gluconeogenic pathways permanently "on," coupled with the carnivore's inability to regulate aminotransferases, enables them to maintain blood glucose levels during starvation much better than omnivores. Kettlehut et al. (1980) found that cats (along with rats fed a high-protein diet) had lower circulating glucose concentrations and lower hepatic glycogen stores than those fed a high carbohydrate diet, but both hepatic glycogen stores and blood glucose concentrations were little altered by fasting in animals fed high-protein. Rate of gluconeogenesis (as measured *in vitro* by synthesis of glucose from [^{14}C] Ala in liver slices) did not differ between cats fed a high protein diet and those fasted for 72 h (Kettlehut et al., 1980). Likewise, American mink fasted for 2, 3, 5, or 7 d remained normoglycemic (Mustonen et al., 2005).

Another difference between carnivores and omnivores occurs in the pathway for gluconeogenesis from Ser. Inhibiting cytosolic PEPCK did not depress gluconeogenesis from Ser in cat hepatocytes, while it did in hepatocytes from rats (Beliveau and Freedland, 1982). This suggests that Ser is converted to glucose via a pathway that does not involve pyruvate and the enzyme Ser dehydratase (MacDonald et al., 1984). The metabolic implications of this alternate pathway have yet to be elucidated.

Humans (and animal models)

By contrast, gluconeogenesis remains fairly stable or is slightly stimulated by fasting in humans (as reviewed extensively by Wahren and Ekberg, 2007; Nuttall et al., 2008, Kaplan et al., 2008). Of course the ratio gluconeogenesis to glycogenolysis is increased drastically after fasting because of the depletion of the glycogen stores within the liver. This remarkable stability of gluconeogenesis in monogastrics has been shown in situations when nutrient supply is altered (as reviewed by Wahren and Ekberg, 2007) such as during 60 hours fasting (Ekberg et al., 1999) where an increased utilization of AA and especially gluconeogenic AA has been observed (Eriksson et al., 1988). When fasting is prolonged (several weeks), the administration of gluconeogenic nutrients such as Ala results in hyperglycemia, suggesting that the gluconeogenic nutrient supply is becoming the limiting step for gluconeogenesis (Wahren and Ekberg, 2007). In the few studies where the supply of gluconeogenic nutrients via parenteral administration or enteral ingestion of specific substrates or a mixed meal was increased, the utilization of gluconeogenic precursors increased without any (or a small increase) in glucose production by the liver (Reviewed by Nuttall et al., 2008). This can be explained by a relative decreased utilization of other gluconeogenic precursors or a channeling of the glucose produced into glycogen. The latter possibility is more likely, at least in the case of a high protein diet as shown by Azzout-Marniche et al. (2007), where the AA excess present in the portal vein of the rats used may be at least partially channeled towards

gluconeogenesis followed by glycogenesis (as shown by up regulation of PEPCK, down regulation of G6P and the absence of glucose release in the medium of isolated hepatocytes). This linked regulation allows the liver to avoid both hyperaminoacidemia and hyperglycemia. In addition, this fits with the concept that gluconeogenesis and glycogen synthesis can be connected and aided by the metabolic zonation of the liver, i.e., gluconeogenesis is located in periportal while glycogen synthesis occurs in perivenous hepatocytes (Meijer et al., 1999).
The regulatory processes are still to be investigated (Radziuk and Pye, 2001). These phenomena do not seem connected with the concentration of hormones known to regulate glucose homeostasis nor with the glucose plasma concentration and, thus, suggests an auto-regulatory process (Jenssen et al., 1990).

The role of hormones (insulin and particularly glucagon) in hepatic glucose uptake in monogastrics is not straightforward. Indeed, even if insulin seems necessary to allow an increased hepatic uptake of glucose in case of hyperglycemia (Davidson, 1981 cited by Wahren and Ekberg, 2007), hyperinsulinemia is not an efficient means to increase net glucose uptake (i.e., permissive effect, Wahren and Ekberg, 2007), except in the case of pharmacological levels of insulin (McGuiness et al., 1990). However, a direct action of insulin on gluconeogenic gene expression during refeeding in mice was demonstrated (Dentin et al., 2007). As a counterregulatory hormone of insulin, glucagon is also a key hormone involved in glucose homeostasis (Wahren and Ekberg, 2007). Examination of the literature on the effect of glucagon on gluconeogenesis is contradictory. Indeed, glucagon has been demonstrated to stimulate gluconeogenic enzymes in monogastrics and ruminants (Jiang and Zhang, 2003; Christ et al., 1988; Brockman et al., 1975), but not always (Williams et al., 2006).

How can the liver play a role of metabolic knot and adapt its metabolism to variations in nutritional factors or requirements and maintain nitrogen homeostasis?

Regulation of hepatic AA uptake and protein synthesis

Within a normal range of nitrogen supply in the diet in ruminants, Figure 1 illustrates the concept that, at least in growing and adult sheep, net hepatic uptake responds quite well to the net PDV release in AA and arterio-portal AA concentration difference, whereas the picture is less clear when the net hepatic AA uptake is expressed relative to the amino-N portal influx to the liver. This means that when the nutrient supply is altered in the diet, the regulation of net hepatic uptake of AA is partially under the control of the difference in AA concentration between the hepatic artery and

the portal vein. The mechanism involved may be the presence of "sensors" of the arterio-venous difference in AA concentrations as previously detailed (Dardevet et al., 2006). With the arterial concentrations in nutrients being a consequence of the metabolic activity of all the tissues and organs of the body, the arterio-portal difference can be considered as a good device for the liver to integrate the variations of supply and the requirements by the whole body. This concept has been developed in dogs, but according to the data we and others have obtained, it is probable that such mechanisms can also occur in ruminant species. However, even if the arterio-portal difference in AA concentration is a mechanism potentially involved in the regulation of net hepatic AA uptake, the role of hormones (insulin, glucagon, IGF-1) and other nutrients cannot be excluded.

A similar mechanism of regulation may also explain why the AA supplied in the diets in adult humans stimulate albumin synthesis, whereas no effect on albumin synthesis is observed when AA are infused intravenously (Ballmer et al., 1995). This difference in response of liver protein synthesis to enteral vs. parenteral delivery of AA may be explained, as hypothesized previously, by the presence of a 'signal' (induced by the difference between the portal and arterial concentrations of AA in the case of the AA delivered orally) to the liver that stimulates hepatic protein synthesis. Recent data from Dardevet et al. (2008) in multicatheterized hyperinsulinemic, hyperglucagonemic, hyperglycemic and eu or hyper aminoacidemic clamped dogs (Figure 4) clearly show that endogenous and export (albumin) protein synthesis are increased only in presence of a negative arterio portal difference, but not when the hepatic AA load only was increased (without an arterio portal difference) (Figure 4). This fits entirely with the fact that the net uptake of AA by the liver of sheep was more responsive to the net PDV release (which takes into account the arterio portal difference) than to the AA flow to the liver (which only takes into account of the portal concentration and blood flow) (Figure 4).

Another possibility would be a complex interaction between AA and the other macronutrients from the diet (linked or not with insulin) for the regulation of postprandial (or nutritional) stimulation of protein synthesis in the liver of monogastrics (Volpi et al., 1996) or ruminants (Savary-Auzeloux et al., 2008, unpublished). At the molecular level, an interaction between Leu and insulin has been demonstrated in the induction of 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation which are essential steps for the initiation of translation in protein synthesis (Yoshizawa et al., 2002). Anthony et al. (2001) have also shown that Leu alone alters 4E-BP1 and S6K1 phosphorylation, but this was not sufficient to stimulate hepatic protein synthesis, suggesting that other regulating components (other AA or nutrients or hormones?) must be involved. In addition, recent data from our group in ruminants have shown that decreasing the supply of AA to the liver while maintaining the flow of insulin and energy in the portal vein did not induce a

reduction of overall exported protein synthesis, whereas a reduction of insulin in the portal vein associated with a reduction of propionate concentration without substantial reduction of AA concentrations reduced export hepatic protein synthesis (Figure 2). This is consistent with recent results from Freyse et al. (2006) where portal infusion of insulin stimulated export protein synthesis to a greater extent in dogs compared to a systemic infusion and fits with the data from Lapierre et coll (2000) in beef steers where a better correlation between the net AA hepatic uptake and the portal concentration in insulin and glucagon was obtained compared to the arterial concentration in the same hormones. Consequently, the ratio AA/energy (Kraft et al., 2008, submitted; Savary-Auzeloux et al., 2008, unpublished), the quality of dietary AA (Deutz et al., 1998) and the associated concentration of insulin and glucagon in the portal vein (De Feo & Lucidi, 2002) are, in addition to the "portal signal", essential in the regulation of hepatic protein synthesis. Because the liver is an important site of catabolism of hormones such as insulin and glucagon (Jungermann & Keitzmann, 1996), important alteration of portal hormones concentrations can occur (for instance a decreased insulin concentration following a decreased energy supply in the diet) without any visible alteration of the concentrations peripherally. Consequently, the role of hormones on the hepatic metabolism should be reassessed looking at their portal supply instead of their arterial concentration.

These latter regulatory factors (ratio AA/energy, AA-peptides profile or hormones concentrations) in the portal vein may become dominant over the AA "portal signal" in extreme nutritional situations (fasting or very low intake) and when the requirements are severe (such as lactation or rapid growth). Indeed, we clearly showed, looking at the correlation between the net AA PDV release and the net AA hepatic uptake, Table1), that in these situations, the portal signal was not explaining the variations in AA uptake by the liver.

Regulation of gluconeogenesis

As shown previously, hormones (such as insulin or glucagon), even if permissive, are probably not the most potent regulators of hepatic gluconeogenesis from AA in monogastrics and ruminants. The supply (or more probably the ratio of gluconeogenic nutrients) and more importantly the requirement for glucose by the peripheral tissues, are probably the main regulatory factors. The remaining question is how the supply of these nutrients can regulate the gluconeogenic process? Again, as hypothesized for protein synthesis earlier, the presence of a 'portal signal' may be a good candidate. Indeed, data from DeFronzo et al. (1978) have shown that after an oral glucose supply, the net splanchnic glucose uptake was increased to a much greater extent than after intravenous glucose infusion, despite unchanged plasma glucose and insulin concentrations. This

can be explained by the presence of a negative arterio-portal difference in glucose concentration (Di Constanzo et al., 2006, reviewed by Dardevet et al., 2006). Glucose uptake is also responsive to a similar mechanism activated by infusion of gluconeogenic AA (i.e., the net hepatic glucose uptake stimulated by portal glucose infusion in blunted by AA) (Moore et al., 1999). Lastly, the same AA infused portally are capable of stimulating glutamine uptake, and hence, stimulate gluconeogenesis and glycogen synthesis (Moore et al., 1999). In the case of ruminants with their particular glucose metabolism and the different gluconeogenic precursors utilized, occurrence of such mechanisms remains to be investigated. Whether or not the portal delivery of insulin and glucagon to the liver (contrarily to the arterial concentration of these hormones) can, as suggested for AA hepatic metabolism, play a role in the regulation of hepatic gluconeogenesis remains to be investigated.

Conclusion

Because of its role in various metabolic functions: ammonia detoxification, prevention against hyperaminoacidemia, synthesis of exported proteins (some of them are strongly involved in the acute phase response), gluconeogenesis …..), the liver has to integrate the informations coming from various tissues and organs and sustain homeostasis at the whole body level. The presence of the "portal signal" for energetic nutrients (glucose in monogastrics, propionate/glucose in ruminants ?) and AA can explain much of the net AA and glucose hepatic uptake as well as the regulation of protein synthesis and gluconeogenesis in the liver. In this context, the importance and role of the hormones such as insulin and glucagon (as permissive or necessary regulatory factors) needs to be reassessed due to the lack of information concerning their actual concentration in the portal vein in various nutritional situations (very few data in ruminants and monogastrics).

However, the "portal signal" is not sufficient to explain the alterations in the net AA uptake and protein/AA metabolism within the liver in extreme nutritional situations (e.g. fasting) or when the requirement for nutrients is increased (lactation, GH treatement, spesis). In those cases, other regulatory factors (IGF-1, Interleukins, specific nutrients ???) must be involved and require further investigations.

REFERENCES

Ahlman B, Charlton M, Fu A, Berg C, O'Brien P and Nair KS (2001). Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis. *Diabetes* **50**, 947-954.

Anthony TG, Anthony JC, Yoshizawa F, Kimball SR & Jefferson LS (2001a). Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. *J Nutr* **131**, 1171-1176.

Anthony TG, Reiter AK, Anthony JC, Kimball SR & Jefferson LS (2001b). Deficiency of dietary EAA preferentially inhibits mRNA translation of ribosomal proteins in liver of meal-fed rats. *Am J Physiol* **281**, E430-439.

Aoyagi Y., Tasaki I., Okumura J. & Muramatsu T. 1988. Energy cost of whole body protein synthesis measured in vivo in chicks. Comp. Biochem. Physiol. A 91:765-768

Azzout-Marniche D, Gaudichon C, Blouet C, Bos C, Mathé V, Huneau JF & Tomé D (2007). Liver neoglucogenesis: a pathway to cope with postprandial amino acid excess in high-protein fed rats. *Am J Physiol* **292**, R1400-1407.

Baker DH (2005). Comparative nutrition and metabolism: explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. *PNAS* **102**, 17897-17902.

Ballmer PE, McNurlan MA, Essen P, Anderson SE & Garlick PJ (1995). Albumin synthesis rates measured with [2H5ring]Phenylalanine are not responsive to short-term intravenous nutrients in healthy humans. *J Nutr* **125**, 512-519.

Barazzoni R, Meek SE, Ekberg K, Wahren J & Nair KS (1999). Arterial KIC as marker of liver and muscle intracellular pools in healthy and type 1 diabetic humans. *Am J Physiol* **277**, E238-244.

Barber MD, Fearon KCH, McMillan DC, Slater C, Ross JA & Preston T (2000). Liver export protein synthetic rates are increased by oral meal feeding in weight-losing cancer patients. *Am J Phys* **279**, E707-714.

Barle H, Nyberg B, Essen P, Andersson K, McNurlan MA, Wernerman J & Garlick PJ (1997). The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously in vivo in humans. *Hepatology* **25**, 154-158.

Barle H, Rahlen L, Essen P, McNurlan MA, Garlick PJ, Holgersson J, Wernerman J (2001). Stimulation of human albumin synthesis and gene expression by growth hormone treatment. *Clin Nutr*, **20**, 59-67.

Baumann PQ, Stirewalt WS, O'Rourke BD, Howard, D and Nair KS (1994). Precursor pools of protein synthesis: a stable isotope study in a swine model. *Am J Physiol* **267**, E203-209.

Beliveau, GP & Freedland RA. (1982). Metabolism of serine, glycine and threonine in isolated cat hepatocytes *Felis domestica*. *Comp Biochem Physiol* **71B**, 13-18.

Bequette BJ, Sunny NE, El-Kadi SW & Owens SL (2006). Application of stable isotopes and mass isotopomer distribution analysis to the study of intermediary metabolism of nutrients. *J Anim Sci* **84**, E50-E59.

Bergman EN (1973). Glucose metabolism in ruminants as related to hypoglycemia and ketosis. *Cornell Veterinary* **63**, 341-382.

Bloomgarden ZT, Liljenquist J, Lacy W & Rabin D (1981). Amino acid disposition by liver and gastrointestinal tract after protein and glucose ingestion. *Am J Physiol* **241**, E90-99.

Blouin JP, Bernier JF, Reynolds CK, Lobley GE, Dubreuil P & Lapierre H (2002). Effect of supply of metabolizable protein on splanchnic fluxes of nutrients and hormones in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **85**, 2618-2630.

Boirie Y, Gachon P & Beaufrere B (1997). Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* **65**, 489-495.

Boirie Y, Short KR, Ahlman B, Charlton M & Nair KS (2001). Tissue-specific regulation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesis rates by insulin. *Diabetes* **50**, 2652-2658.

Bradford BJ & Allen MS (2005). Phlorizin administration increases hepatic gluconeogenic enzyme mRNA abundance but not feed intake in late lactation dairy cows. *J Nutr* **135**, 2206-2211.

Brockman RP, Bergman EN, Joo PK & Manns JG (1975). Effects of glucagon and insulin on net hepatic metabolism of glucose precursors in sheep. *Am J Physiol* **229**, 1344-1349.

Brockman RP (1985). Role of insulin in regulating hepatic gluconeogenesis in sheep. *Can J Physiol Pharmacol* **63**, 1460-1464.

Brockman RP (1990). Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. *Brit J Nutr* **64**, 95-101.

Brockman RP (1993). Glucose and short-chain fatty acid metabolism. In : Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism Cambridge pp 249-265. [J.M. Forbes, editor]

Bruckental I, Huntington GB, Baer CK & Erdman RA (1997). The effect of abomasal infusion of casein and recombinant somatotropin hormone injection on nitrogen balance and amino acid fluxes in portal-drained viscera and net hepatic and total splanchnic blood in holstein steers. *J Anim Sci* **75**, 1119-1129.

Bruins MJ, Deutz NEP & Soeters PB (2003). Aspects of organ protein, amino acid and glucose metabolism in a porcine model of hypermetabolic sepsis. *Clin Sci* **104**, 127-141.

Burgess SC, He TH, Yan ZY, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD & Magnuson MA (2007). Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab* **5**,313-320.

Burrin DG, Ferrell CL, Britton RA & Bauer M (1990). Level of nutrition and visceral organ size and metabolic activity in sheep. *Brit J Nutr* **64**, 439-448.

Burrin DG, Shulman RJ, Reeds PJ, Davis TA & Gravitt KR (1992). Porcine colostrum and milk stimulate visceral organ and skeletal muscle protein synthesis in neonatal piglets. *J Nutr* **122**, 1205-1213.

Burrin DG, Davis TA, Ebner S, Schocknecht PA, Fiorotto ML, Reeds PJ & McAvoy S (1995). Nutrient-independent and nutrient-dependent factors stimulate protein synthesis in colostrum-fed newborn pigs. *Pediatr Res* **37**, 593-599.

Burrin DG & Davis TA (2004). Proteins and amino acids in enteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 79-87.

Bush J.A., Burrin D.G., Suryawan A., O'Connor P.M.J., Nguyen H.V., Reeds P.J., Steele N.C., Vna Goudeover J.B. & Davis T.A. 2003. Somatotropin-induced protein anabolism in hindquarters and protal-drained viscera of growing pigs. Am. J. Physiol. 284:E302-312.

Caso G, Scalfi L, Marra M, Covino A, Muscaritoli M, Mc Nurlan MA, Garlick PJ & Contaldo F (2000). Albumin synthesis is diminished in men consuming a predominantly vegeterian diet. *J Nutr*, **130**, 528-533.

Caso G, Ford GC, Nair KS, Garlick PJ, McNurlan MA (2002). Aminoacyl-tRNA enrichment after a flood of labeled phenylalanine: insulin effect on muscle protein synthesis. *Am J Physiol* **282**, E1029-1038.

Caso G, Feiner J, Mileva I, Bryan LJ, Kelly P, Autio K, Gelato MC & McNurlan MA (2007). Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. *Am J Clin Nutr* **85**, 446-451.

Cayol M, Boirie Y, Prugnaud J, Gachon P, Beaufrere B & Obled C (1996). Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans: effects of tracer route infusion and dietary proteins. *Am J Physiol* **270**, E980-987.

Cayol M, Boirie Y, Rambourdin F, Prugnaud J, Gachon P, Beaufrere B & Obled C (1997). Influence of of protein intake on whole body and splanchnic leucine kinetics in humans. *Am J Physiol* **272**, E584-591.

Christ B, Nath A, Bastian H & Jungermann K (1988). Regulation of the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in cultured rat hepatocytes by glucagon and insulin. *Eur J Biochem* **178**, 373-379.

Clark JH, Spires HR, Derrig RG & Bennink MR (1977). Milk production, nitrogen utilization and glucose synthesis in lactating cows infused portruminally with sodium caseinate and glucose. *J Nutr* **107**, 631-644.

Connell A, Calder AG, Anderson SE & Lobley GE (1997). Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. *Brit J Nutr*, **77**, 255-271.

Danfaer A, Tetens V & Agergaard N (1995). Review and experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. *Comp Biochem Physiol* **111**, 201-210.

Dardevet D, Moore MC, Remond D, Everett-Grueter CA, Cherrington AD (2006). Regulation of hepatic metabolism by enteral delivery of nutrients. *Nutr Res Rev* **19**, 161-173.

Dardevet D, Kimball SR, Jefferson LS, Cherrington AD, Rémond D, DiConstanzo CA & Moore MC (2008). Portal infusion of amino acids is more efficient than peripheral infusion in stimulating liver protein synthesis at the same hepatic amino acid load in dogs. *Am J Clin Nutr* **88**, 986-996.

Davis TA, Burrin DG, Fiorotto ML, Reeds PJ & Jahoor F (1998). Roles of insulin and amino acids in the regulation of protein synthesis in the neonate. *J Nutr* **128**, 347S-350S.

Davis TA, Nguyen HV, Suryawan A, Bush JA, Jefferson LS & Kimball SR (2000). Developmental changes in the feeding-induced stimulation of translation initiation in muscle of neonatal pigs. *Am J Physiol* **279**, E1226-1234.

Davis TA, Fiorotto ML, Beckett PR, Burrin DG, Reeds PJ, Wray-Cahen D & Nguyen HV (2001). Differential effects of insulin on peripheral and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs. *Am J Physiol* **280**, E770-779.

Davis TA, Fiorotto ML, Burrin DG, Reeds PJ, Nguyen HV, Beckett PR, Vann RC & O'Connor PMJ (2002). Stimulation of protein synthesis by both insulin and amino acids is unique to skeletal muscle in neonatal pigs. *Am J Physiol* **282**, E880-890.

de Blaauw I, Deutz NEP & Von Meyenfeldt MF (1996). In vivo amino acid metabolism of gut and liver during short and prolonged starvation. *Am J Physiol* **270**, G298-306.

De Feo P, Gan Gaisano M & Haymond MW (1991). Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. *J Clin Invest* **88**, 833-840.

De Feo P, Horber FF & Haymond MW (1992). Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. *Am J Physiol* **263**, E794-799.

De Feo P, Volpi E, Lucidi P, Cruciani G, Reboldi G, Siepi D, Mannarino E, Santeusanio F, Brunetti P & Bolli GB (1993). Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes* **42**, 995-1002.

De Feo P & Lucidi P (2002). Liver protein synthesis in physiology and in disease states. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 47-50.

DeFronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Wahren J & Felig P (1978). Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc Natl Acad Sci* **75**, 5173-5177.

De Meer K, Smolders HC, Meesterburrie J, de Sain-van der Velden M, Voorbij HA, Okken A, Reijngoud DJ & Kulik W (2000). A single food bolus stimulates albumin synthesis in growing piglets. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **31**, 251-257.

Demigne C, Yacoub C, Morand C & Remesy C (1988). Les orientations du métabolisme intermédiaire chez les ruminants. *Reprod Nutr Dev* **28**, 1-17.

Demigne C, Yacoub C, Morand C & Remesy C (1991). Interactions between propionate and amino acid metabolism in isolated sheep hepatocytes. *Brit J Nutr* **65**, 301-317.

Dentin R, Liu Y, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J, Montminy M (2007). Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* **449**, 366-369.

Deutz NEP, Welters CFM & Soeters PB (1996). Intragastric bolus feeding of meals containing elementary, partially hydrolyzed or intact protein causes comparable changes in interorgan substrate flux in the pig. *Clin Nutr* **15**, 119-128.

Deutz NEP, Bruins MJ & Soeters PB (1998). Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. *J Nutr* **128**, 2435-2445.

DiConstanzo CA, Dardevet DP, Neal DW, Lautz M, Allen E, Snead W & Cherrington AD (2006). Role of the hepatic sympathetic nerves in the regulation of net hepatic glucose uptake and the mediation of the portal glucose signal. *Am J Physiol* **290**, E9-16.

Donkin SS & Armentano LE (1993). Preparation of extended in vitro clutures of bovine hepaticytes that are hormonally responsive. *J Anim Sci* **71**, 2218-2227.

Donkin SS & Armentano LE (1995). Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminating and ruminating bovine. *J Anim Sci* **73**, 546-551.

Early R.J., McBride B.W. & Ball R.O. 1988. Phenylalanine metabolism in sheep infused with glucose plus insulin. II Effects of in vivo and in vitro protein synthesis and related energy expenditure. Can. J. Anim. Sci. 68:721-730.

Eisemann JH & Nienaber JA (1990). Tissue and whole-body oxygen uptake in fed and fasted steers. *Brit J Nutr* **64**, 399-411.

Ekberg K, Landau BR, Wajngot A, Chandramouli V, Efendic S, Brunengraber H & Wahren J (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60h fasting. *Diabetes* **48**, 292-298.

Eriksson LS, Olsson M & Bjorkman O (1988). Splanchnic metabolism of amino acids in healthy subjects: effect of 60 hours of fasting. *Metabolism* **37**, 1159-1162.

Ferland G, Audet M & Tuchweber B (1992). Effect of dietary restriction on lysosomal bodies and total protein synthesis in hepatocytes of aging rats. *Mech Ageing Dev* **64**, 49-59.

Ferrell CL, Kreikemeier KK & Freetly HC (1999). The effect of supplemental energy, nitrogen and protein on feed intake, digestibility, and nitrogen flux across the gut and liver in sheep fed low-quality forage. *J Anim Sci* **77**, 3353-3364.

Ferrell CL, Freetly HC, Goetsch AL & Kreikemeier KK (2001). The effect of dietary nitrogen and protein on feed intake, nutrient digestibility, and nitrogen flux across the portal-drained viscera and liver of sheep consuming high-concentrate diets ad libitum. *J Anim Sci* **79**, 1322-1328.

Flaim KE, Hutson SM, Lloyd CE, Taylor JM, Shiman R & Jefferson LS (1985). Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Physiol* **249**, E447-453.

Frank JW, Escobar J, Suryawan A, Kimball SR, Nguyen HV, Jefferson LS & Davis TA (2005). Protein synthesis and translation initiation factor activation in neonatal pigs fed increasing levels of dietary proteins. *J Nutr* **135**, 1374-1381.

Freyse EJ, Fischer U, Knospe S, Ford GC & Nair KS (2006). Differences in protein and energy metabolism following portal versus systemic administration of insulin in diabetic dogs. *Diabetologia* **49**, 543-551.

Giordano M, De Feo P, Lucidi P, DePasquale E, Giordano G, Cirillo D, Dardo G, Signorelli SS & Casellino P (2001). Effects of dietary protein restriction on fibrinogen and albumin metabolism in nephrotic patients. *Kidney Int* **60**, 235-242.

Goetsch AL, Ferrell CL & Freetly HC (1994). Effects of different supplements on splanchnic oxygen consumption and net fluxes of nutrients in sheep consuming bromegrass (Bromus inermis) hay ad libitum. *Brit J Nutr* **72**, 701-712.

Goetsch AL, Patil AR, Galloway DL, Kouakou B, Wang ZS, Park KK & Rossi JE (1997). Net flux of nutrients across splanchnic tissues in wethers consuming grasses of different sources and physical forms ad libitum. *Brit J Nutr* **77**, 769-781.

Greenfield RB, Cecava MJ & Donkin SS (2000). Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. *J Dairy Sci* **83**, 1228-1236.

Guerino F, Huntington GB & Erdman RA (1991). The net portal and hepatic flux of metabolites and oxygen consumption in growing beef steers given postruminal casein. *J Anim Sci* **69**, 387-395.

Hanigan MD (2005). Quantitative aspects of ruminant splanchnic metabolism as related to predicting animal performance. *Anim Sci* **80**, 23-32.

Hellstern G, Kaempf-Rotzoll D, Linderkamp O, Langhans KD & Rating D (2002). Parenteral amino acids increase albumin and skeletal muscle protein franctional synthetic rates in premature newborn minipigs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35**, 270-274.

Hunter KA, Ballmer PE, Anderson SE, Broom J, Garlick PJ & McNurlan MA (1995) Acute stimulation of albumin synthesis rate with oral meal feeding in healthy subjects measured with [ring-2H5]phenylalanine. *Clin Sci (Lond)* **88**, 235-242.

Huntington GB, Zetina EJ, Whitt JM & Potts W (1996). Effects of dietary concentrate level on nutrient absorption, liver metabolism, and urea kinetics of beef steers fed isonitrogenous and isoenergetic diets. *J Anim Sci* **74**, 908-916.

Huntington GB, Harmon DL & Richards CJ (2006). Sites, rate, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J Anim Sci* **84**, E14-E24.

Hutson NJ, Lloyd CE, Mortimore GE (1982). Degradation of intra- and extrahepatic protein by livers of normal and diabetic mice: differential responses to starvation. *Proc Natl Acad Sci* **79**, 1737-1741.

Jahoor F, Burrin DG, Reeds PJ & Frazer M (1994). Measurement of plasma protein synthesis rate in infant pig: an investigation of alternative tracer approaches. *Am J Physiol* **267**, R221-227.

Jahoor F, Bhattiprolu S, Del Rosario M, Burrin DG, Wykes L & Frazer M (1996). Chronic protein deficiency differentially affects the kinetics of plasma proteins in young pigs. *J Nutr* **126**, 1489-1495.

Jahoor F, Wykes L, Del Rosario M, Frazer M & Reeds PJ (1999). Chronic protein undernutrition and an acute inflammatory stimulus elicit different protien kinetic responses in plasma but not in muscle of piglets. *J Nutr* **129**, 693-699.

Jaleel A & Nair KS (2004). Identification of multiple proteins whose synthetic rates are enhanced by high amino acid levels in rat hepatocytes. *Am J Physiol* **286**, E950-957.

Jefferson LS, Liao WSL, Peavy DE, Miller TB, Appel MC & Taylor JM (1983). Diebetes-induced alterations in liver protein synthesis. *J Biol Chem* **258**, 1369-1375.

Jenssen T, Nurjhan N, Consoli A & Gerich JE (1990). Failure of substrate-induced gluconeogenesis to increase overall glucose appearance in normal humans. Demonstration of hepatic autoregulation without a change in plasma glucose concentration. *J Clin Invest* **86**, 489-497.

Jiang G & Zhang BB (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol* **284** E671-678.

Jourdan M, Cynober L, Moinard C, Blanc MC, Neveux N, De Bandt JP & Aussel C (2008). Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats : in vivo and ex vivo experiments using a model of isolated perfused liver. *Am J Physiol* **294**, R748-755.

Jungermann K, & Kietzmann T 1996. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* **16**, 179-203.

Kadowaki M & Kanazawa T (2003). Amino acids as regulators of proteolysis. *J Nutr* **133**, 2052S-2056S.

Kaplan W, Sunehag,AL, Dao H & Haymond MW (2008). Short-term effects of recombinant human growth hormone and feeding on gluconeogenesis in humans. *Met Clin Exp* **57**, 725-732.

Kettlehut IC, Foss MC & Migliorini RH (1980). Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and in rats fed a high-protein diet. *Am J Physiol* **239**, R437-R444.

Kida K., Nakago S., Kamiya F., Toyama Y., Takashi N. & Nakagawa H. (1978) Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J Clin Invest* **62**, 721-726.

Kimball SR, Horetsky RL & Jefferson LS (1995). Hormonal regulation of albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Physiol* **268**, E6-14.

Kimball SR, Jefferson LS, Nguyen HV, Suryawan A, Bush JA & Davis TA (2000). Feeding stimulates protein synthesis in muscle and liver of neonatal pigs through an mTOR-dependant process. *Am J Physiol* **279**, E1080-1087.

Knapp JR, Freetly HC, Reis BL, Calvert CC & Baldwin RL (1992). Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* **75**, 1025-1035.

Kraft G, Ortigues-Marty I, Durand D, Rémond D, Jardé T, Bequette B & Savary-Auzeloux I (2008a). Adaptation of hepatic amino acid metabolism contribute to the nitrogen economy in lambs fed nitrogen- or energy-imbalanced diets. Submitted to *Animal*.

Kraft G, Gruffat D, Dardevet D, Rémond D, Ortigues-Marty I & Savary-Auzeloux I (2008b). Nitrogen- and energy-imbalanced diets affect hepatic protein synthesis and gluconeogenesis differently in growong lambs. Submitted to *J Anim Sci*.

Landau BR, Wahren J, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K & Kalhan SC (1996). Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest* **98**, 378-385.

Lapierre H, Bernier JF, Dubreuil JF, Reynolds CK, Farmer C, Ouellet DR & Lobley GE (2000). The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. *J Anim Sci* **78**, 1084-1099.

Lapierre H & Lobley GE (2001). Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J Dairy Sci* **84**, E223-236.

Leverve XM (2001). Inter-organ substrate exchanges in the critically ill. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **4**, 137-142.

Lobley GE, Connell A, Milne E, Newman AM & Ewing TA (1994). Protein synthesis in splanchnic tissues of sheep offered two levels of intake. *Brit J Nutr* **71**, 3-12.

Lobley GE, Connell A, Revell DK, Bequette BJ, Brown DS & Calder AG (1996). Splanchnic-bed transfers of amino acids in sheep blood and plasma, as monitored through use of a multiple U-^{13}C-labelled amino acid mixture. *Brit J Nutr* **75**, 217-235.

Lobley GE & Milano GD (1997). Regulation of hepatic nitrogen metabolism in ruminants. *Proc Nutr Soc* **56**, 547-563.

Lobley GE, Milano GD & van der Walt JG (2000). The liver: integrator of nitrogen metabolism. pp 149-168 In : Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. [Cronje, PB, Ed]. CAB International, Wallingford, UK.

Lobley GE (2003). Protein turnover – What does that mean for animal production? *Can J Anim Sci* **83**, 327-340.

Lobley GE & Lapierre H (2003). Post-absorptive metabolism of amino acids. In Progress in Research on Energy and Protein Metabolism, pp 737- 756. Rostock-Warnemünde, Germany [Souffrant WB & Metges CC Eds]. EAAP publication. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

Lomax MA & Baird GD (1983). Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. *Brit J Nutr* **49**, 481-496.

Lomax MA, Donaldson IA & Pogson CI (1986). The effect of fatty acids and starvation on the metabolism of gluconeogenic procursors by isolated sheep liver cells. *Biochem J* **240**, 277-280.

Luiking YC & Deutz NEP (2007). Interorgan exchange of amino acids: what is the driving force? pp 319-328. In 2nd International Symposium on Energy and Protein metabolism and nutrition. Vichy, France. [Ortigues-Marty I, Ed], EAAP publication. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

MacDonald ML, Rogers QR & Morris JG (1984). Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore. *Ann Rev Nutr* **4**, 521–562.

McGuiness OP, Meyers S, Neal D & Cherrington AD (1990). Chronic hyperinsulinemia decreases insulin action but not insulin sensitivity. *Metabolism* **39**,931-937.

McLeod KR, Bauer ML, Harmon DL, Reynolds CK & Mitchell GE (1997). Effects of exogenous somatostatin and cysteamine on net nutrient flux across the portal drained viscera and liver of sheep during introduodenal infusion of starch hydrolysate and casein. *J Anim Sci* **75**, 3026-3037.

Majdoub L, Vermorel M & Ortigues-Marty I (2003). Intraruminal propionte supplementation modifies hindlimb energy metabolism without changing the splanchnic release of glucose in growing lambs. *Brit J Nutr* **89**, 39-50

Maxwell JL, Terracio L, Borg TK, Baynes JW & Thorpe SR (1990). A fluorescent residualizing label for studies on protein uptake and catabolism in vivo and in vitro. *Biochem J* **267**, 155-162.

Meijer AJ, Blommaart EFC, Dubbelhuis PF & van Sluijters DA (1999). Regulation of hepatic nitrogen metabolism. In Protein Metabolism and Nutrition, VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition. pp155-175. Aberdeen, United Kingdom. [Lobley GE, White A & MacRae JC, Eds]. EAAP publication. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

Merry BJ, Holehan AM, Lewis SE & Goldspink DF (1987). The effects of ageing and chronic dietary restriction on in vivo hepatic protein synthesis in rat. *Mech Ageing Dev* **39**, 189-199.

Meyer, C., J.M. Dostou, S.L. Welle, and J.E. Gerich. 2002. Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E419-E427.

Moore MC, Pagliassotti MJ, Swift LL, Asher J, Murrell J, Neal D & Cherrington AD (1994). Disposition of a mixed meal by the concious dog. *Am J Physiol* **266**, E666-675.

Moore MC, Hsieh PS, Flakoll PJ, Neal DW & Cherrington AD (1999). Net hepatic gluconeogenic amino acid uptake in response to peripheral versus portal amino acid infusion in conscious dogs. *J Nutr* **129**, 2218-2224.

Moore MC, Hsieh PS, Flakoll PJ, Neal DW & Cherrington AD (1999). Differential effect of amino acid infusion route on net hepatic glucose uptake in the dog. *Am J Physiol* **276**, E295-302.

Morris JG (2002). Idiosyncratic nutrient requirements of cats appear to be diet-induced evolutionary adaptations. *Nutr Res Rev* **15**, 153–168.

Mosoni L, Houlier ML, Patureau Mirand P, Bayle G & Grizard J (1993). Effect of amino acids alone or with insulin on muscle and liver protein synthesis in adult and old rats. *Am J Physiol* **264**, E614-620.

Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML & Patureau Mirand P (1996). Muscle and liver protein synthesis adapt efficiently to food deprivation and refeeding in 12-month-old rats. *J nutr* **126**, 516-522.

Mustonen AM, Pyykonen T, Paakkonen T, Ryokkynen A, Asikainen J, Aho J, Mononen J & Nieminen P (2005). Adaptations to fasting in the American mink (*Mustela vison*): carbohydrate and lipid metabolism. *Comp Biochem Physiol* **140A,** 195-205.

Nuttall FQ, Ngo A & Gannon MC (2008). Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev* **24**, 438-458.

Obled C, Papet I and Breuillé D (2002). Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**:189-197.

O'Connor PMJ, Kimball SR, Suryawan A, Bush JA, Nguyen HV, Jefferson LS & Davis TA (2004). Regulation of neonatal liver protein synthesis by insulin and amino acids in pigs. *Am J Physiol* **286**, E994-1003.

Olde Damink SWM, Deutz NEP, Dejong CHC, Soeters PB & Jalan R (2002). Interorgan ammonia metabolism in liver failure. *Neurochem Int* **41**, 177-188.

O'Riordain MG, Ross JA, Fearon KCH, Maingay J, Farouk M, Garden OJ & Carter DC (1995). Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. *Am J Physiol* **269**, E323-330.

Ortigues-Marty I, Vernet J & Majdoub L (2003). Whole body glucose turnover in growing and non-productive adult ruminants: meta-analysis and review. *Reprod Nutr Dev* **43**, 371-383.

Ortigues-Marty I, Obled C, Dardevet D & Savary-Auzeloux I (2003). Role of the liver in the regulation of energy and protein status. pp 83-98. Rostock-Warnemünde, Germany [Souffrant WB & Metges CC Eds]. EAAP publication. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.

Overton TR, Drackley JK, Ottemann-Abbamonte CJ, Beaulieu AD, Emmert LS & Clark JH (1999). Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *J Anim Sci* **77**, 1940-1951.

Pocius PA & Herbein JH (1986). Effects of in vivo administration of growth hormone on milk production and in vitro hepatic metabolism in dairy cattle. *J Dairy Sci* **69**, 713-720.

Postic C, Dentin R & Girard J (2004). Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* **30**, 398-408.

Prod'homme M, Rieu I, Balage M, Dardevet D, Grizard J (2004). Insulin and amino acids both strongly participate to the regulation of protein metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **7**, 71-77.

Prod'homme M, Balage M, Debras E, Farges MC, Kimball S, Jefferson L, Grizard J (2005). Differential effects of insulin and dietary amino acids on muscle protein synthesis in adult and old rats. *J Physiol* **563**, 235-248.

Radziuk J & Pye S (2001). Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab Res Rev* **17**, 250-272.

Raggio G, Lobley GE, Berthiaume R, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P & Lapierre H (2007). Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **90**, 352-359.

Rerat A, Simoes-Nunes C, Mendy F, Vaissade P & Vaugelade P (1992). Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *Brit J Nutr* **68**, 111-138.

Rerat A (1995). Nutritional value of protein hydrolysis products (oligopeptides and free amino acids) as a consequence of absorption and metabolism kinetics. *Arch Anim Nutr* **48**, 23-36.

Reynolds CK, Tyrrell HF & Reynolds PJ (1991). Effects of diet forage-to-concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: net nutrient metabolism by visceral tissues. *J Nutr* **121**, 1004-1015.

Reynolds CK, Tyrrell HF & Armentano LE (1992) Effects of mesenteric vein n-butyrate infusion on liver metabolism by beef steers. *J Anim Sci* **70**, 2250-2261.

Reynolds CK (2002). Economics of visceral energy metabolism in ruminants: Tool keeping or internal revenue service? *J Anim Sci* **80**, E74-84.

Reynolds CK, Harmon DL, Prior RL & Tyrell HF (1994). Effects of mesenteric vein L-alanine infusion on liver metabolism of organic acids in beef heifers fed diets differing in forage:concentrate ratio. *J Anim Sci* **72**, 3196-3206.

Reynolds CK (2006). Splanchnic amino acid metabolism in ruminants In Ruminant physiology : Digestion, metabolism and impact on gene expression, immunology and stress. Pp 225-248 [Eds K Sejrsen, T Hvelplund & MO Nielsen] Wageningen Academic Publisher The Netherlands.

Reeds PJ, Hachey DL, Patterson BW, Motil KJ & Klein PD (1992). VLDL Apolipoprotein B-100, a potential indicator of the isotopic labeling of the hepatic protein synthetic precursor pool in humans: studies with multiple stable isotopically labeled amino acids. *J Nutr* **122**, 457-466.

Reeds PJ, Berthold HK, Boza JJ, Burrin DG, Jahoor F, Jaksic T, Klein PD, Keshen T, Miller R, Stoll B & Wykes LJ (1997). Intagration of amino acid and carbon intermediary metabolism: studies with uniformly labeled tracers and mass isotopomer analysis. *Eur J Pediatr* **156**, S50-S58.

Savary-Auzeloux I, Kraft G, Bequette B, Papet I, Remond D & Ortigues-Marty I (2008). Dietary nitrogen to energy ratio alters amino acid partition in the whole body and amongst the splanchnic tissues in growing lambs. (in preparation for Journal of Animal Science).

Savary-Auzeloux I, Majdoub L, LeFloc'h N & Ortigues-Marty I (2003a). Ryegrass-Based diet and barley supplementation : Partition of nitrogenous nutrients among splanchnic tissues and hind limb in finishing lambs. *J Anim Sci* **81**:3160-3173.

Savary-Auzeloux I, Majdoub L, LeFloc'h N & Ortigues-Marty I (2003). Effects of intraruminal propionate supplementation on nitrogen utilisation by the portal drained viscera, the liver and the hindlimb in lambs fed frozen rye grass. *Brit J Nutr* **90**:939-952.

Savary-Auzeloux I, Durand D, Gruffat D, Bauchart D & Ortigues-Marty I (2008). Food restriction and refeeding in lambs influence muscle antioxidant status. *Animal* **2**, 738-745.

Silva SVPS & Mercer JR (1985). Effect of protein intake on amino acid catabolism and gluconeogenesis by isolated hepatocytes from the cat (Felis domestica). *Comp Biochem Physiol* **80B**, 603-607.

Sorensen PG, Petersen IM & Sand O (1995). Activities of carbohydrate and amino acid metabolizing enzymes from liver of mink (*Mustela vison*) and preliminary observations on steady state kinetics of the enzymes. *Comp Biochem Physiol* **112B**, 59-64.

Stoll B, Burrin DG, Henry J, Jahoor F, Reeds PJ (1997). Phenylalanine utilization by the gut and liver measured with intravenous and intragastric tracers in pigs. *Am J Phys* **273**, G1208-1217.

Stoll B, Burrin DG, Henry J, Yu H, Jahoor F & Reeds PJ (1998). Dietary amino acids are the preferential source of hepatic protein synthesis in piglets. *J Nutr* **128**, 1517-1524.

Stoll B & Burrin DG (2006). Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers. *J Anim Sci* **84**, E60-72.

Stumvoll M., Perriello G., Meyer C. & Gerich J. (1999). Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney Intern* **55**, 778-792.

Surmacz CA, Poso AR & Mortimore GE (1987). Regulation of lysosomal fusion during deprivation-induced autophagy in perfused rat liver. *Biochem J* **242**, 453-458.

Taniguchi K, Huntington GB & Glenn BP (1995). Net nutrient flux by visceral tissues of beef steers given abomasal and ruminal infusions of casein and starch. *J Anim Sci* **73**, 236-249.

Tauveron I, Larbaud D, Champredon C, Debras E, Teeseraud S, Bayle G, Bonnet Y, Thieblot P & Grizard J (1994). Effect of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on muscle and liver protein synthesis in lactating goats. *Am J Physiol* **267**, E877-885.

Thalacker-Mercer AE, Johnson CA, Yarasheski KE, Carnell NS & Campbell WW (2007). Nutrien ingestion, protein intake, and sex, but not age, affect the albumin synthesis rate in humans. *J Nutr* **137**, 1734-1740.

Van de Poll MCG, Wigmore SJ, Redhead DN, Beets-Tan RGH, Garden OJ, Greve JWM, Soeters PB, Deutz NEP, Fearon KCH & Dejong CHC (2007). Effect of major liver resection on hepatic ureagenesis in humans. *Am J Physiol* **293**, G956-962.

van Milgen J. 2002. Modeling biochemical aspects of energy metabolism in mammals. J. Nutr. 3195-3202.

Vary TC and Kimball SR (1992). Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *Am J Physiol* **262**, C445-452.

Veenhuizen JJ, Russell RW & Young JW (1988). Kinetics of metabolism of glucose, propionate and CO_2 in steers as affected by injecting phlorizin and feeding propionate. *J Nutr* **118**, 1366-1375.

Velez JC & Donkin SS (2004). Bovine somatotropin increases hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **87**, 1325-1335.

Velez JC & Donkin SS (2005). Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *J Dairy Sci* **88**, 2938-2948.

Volpi E, Lucidi P, Cruciani G, Monacchia F, Reboldi G, Brunetti P, Bolli GB & De Feo (1996). Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. *Diabetes* **45**, 1245-1252.

Volpi E, Mittendorfer B, Wolfe SE & Wolfe RR (1999). Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol* **277**, E513-520.

Wahren J, Efendic S, Luft R, Hagenfeldt L, Bjorkman O & Felig P (1977). Influence of somatostatin on splanchnic glucose metabolism in postabsorptive and 60-hour fasted humans. *J Clin Nutr* **59**, 299-307.

Wahren J, Wennlund A, Nilsson LH & Felig P (1981). Influence of hyperthyroidism on splanchnic exchange of glucose and gluconeogenic precursors. *J Clin Invest* **67**, 1056-1063.

Wahren J & Ekberg K (2007). Splanchnic regulation of glucose production. *Ann Rev Nutr* **27**, 329-345.

Watt PW, Lindsay Y, Scrimgeour CM, Chien PAF, Gibson JNA, Taylor DJ & Rennie MJ (1991). Isolation of aminoacyl-tRNA and its labeling with stable-isotope tracers: Use in studies of human tissue proteins synthesis. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 5892-5896.

Williams EL, Rodriguez SM, Beitz DC & Donkin SS (2006). Effect of short term glucagon administration on gluconeogenic enzymes in the liver of midlactation dairy cows. *J Dairy Sci* **89**, 693-703.

Wray-Cahen D, Metcalf JA, Backwell FRC, Bequette BJ, Brown DS, Sutton JD & Lobley GE (1997). Hepatic response to increased exogenous supply of plasma amino acids by infusion into the mesenteric vein of Holstein-Friesian cows in late gestation. *Brit J Nutr* **78**, 913-930.

Yoshizawa F, Hirayama S, Sekizawa H, Nagasawa T & Sugahara K (2002). Oral administration of leucine stimulates phosphorylation of 4E-BP1 and S6K1 in skeletal muscle but not liver of diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **48**, 59-64.

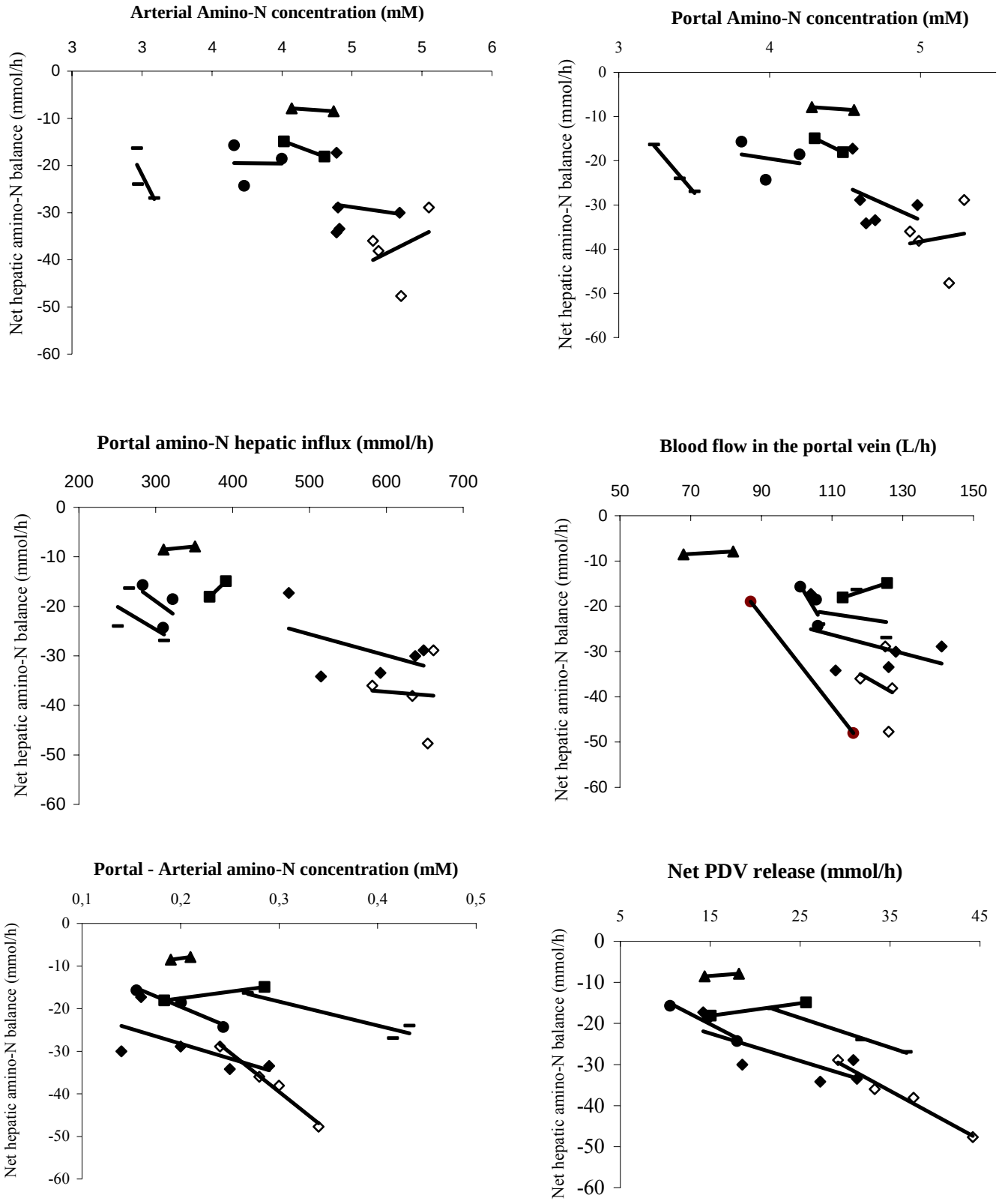


Figure 1: Response of net hepatic amino-N balance (mmol/h) to arterial amino-N concentration (mM), portal amino-N concentration (mM), portal amino-N influx (mmol/h), blood flow (L/h), difference between arterial and portal concentration (mM) and net PDV release (mmol/h) in sheep. Data from Savary et al., 2003a (■) and 2003b (●), Kraft et al., 2008 (unpublished) (-), Ferrell et al., 1999 (♦) and 2001(◊), Mc Leod et al., 1997(▲).

Publication	Animals	Experimental diets	Liver removal (% PDV release)
Reynolds, 2006	Beef steers	Intake 12% CP 690 MJ	54
		Intake 12% CP 904 MJ	33
		Intake 16% CP 690 MJ	51
		Intake 16% CP 904 MJ	66
Reynolds, 2006	Dairy cows Dry	Intake Low	116
		Intake High	96
	Dairy cows Lactating	Intake Low	***43***
		Intake High	***43***
Blouin et al., 2002	Lactating cows	High MP	***24***
		Low MP	***35***
Reynolds et al., 1991	Beef heifers	75% alfalfa low intake	79
		75% alfalfa high intake	77
		75% concentrate low intake	71
		75% concentrate high intake	69
Reynolds et al., 1992	Beef steers	Low intake	63
		Low intake + GH	***27***
		High intake	57
		High intake + GH	53
Bruckental et al., 1997	Beef steers	Control	69
		Control + abomasal casein	76
		Control + abomasal casein + GH	***36***
Taniguchi et al., 1995	Beef steers	Control (C)	73
		C + starch abomasum + casein abomasum	58
		C + starch abomasum + casein rumen	59
		C + starch rumen + casein abomasum	63
		C+ starch rumen + casein rumen	69
Guerino et al., 1991	Beef steers	Control	28
		Control + 300 g casein / d	49
Huntington et al., 1996	Beef steers	Diet 27% concentrate	52
		Diet 63% concentrate	47
Eisemann and Nienaber, 1990	Beef steers	Starved	***>>100***
		Fed	51
Lapierre et al., 2000	Beef steers	0.6 x Maintenance	***>>100***
		1 x Maintenance	46
		1.6 x Maintenance	40

Table 1: Liver TAA-N (or α-amino-N) removal (%) relatively to the net PDV release in growing beef steers/heifers and lactating cows. These ratio are calculated using the average net amino-N PDV release (mmol N / h) and hepatic amino-N uptake (mmol N / h) in the papers.

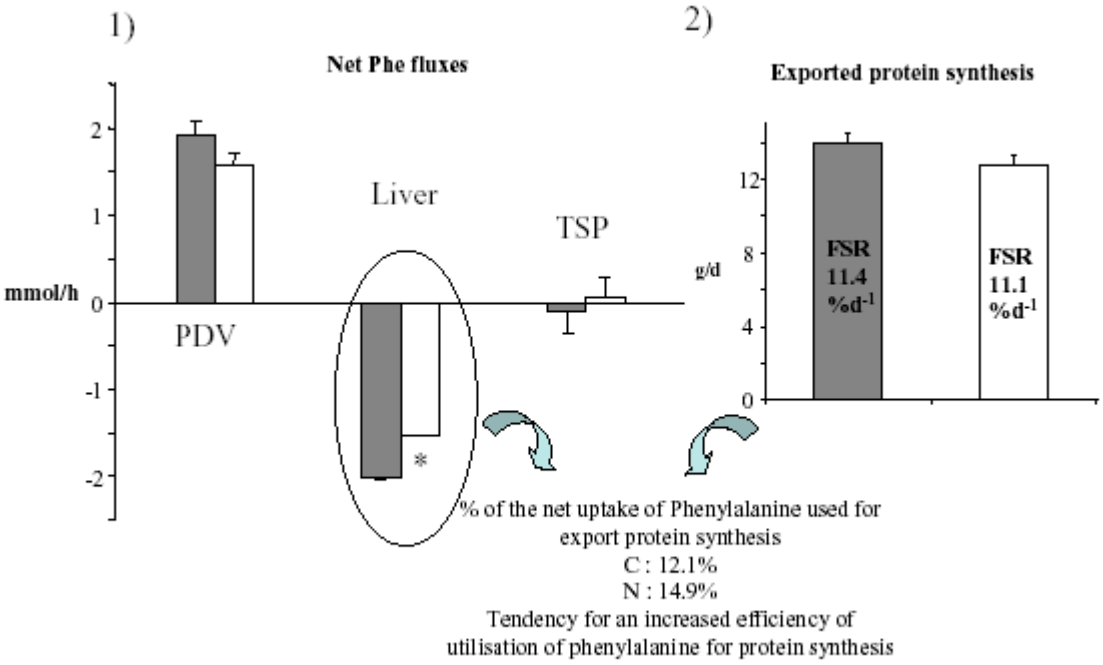


Figure 2: 1) Net phenylalanine fluxes across the portal drained viscera (PDV), liver and total splanchnic tissues (TSP) in lambs fed a control diet (C) ■ (70% concentrate, 30% hay) and a nitrogen deficient diet (N) □ (-23% of digested nitrogen relative to C)
2) Absolute synthesis rate (g/d) of total exported proteins measured *in vivo*
(* C vs. N, significantly different) (Kraft et al., 2008 submitted to Animal; Savary-Auzeloux et al., 2008, unpublished)

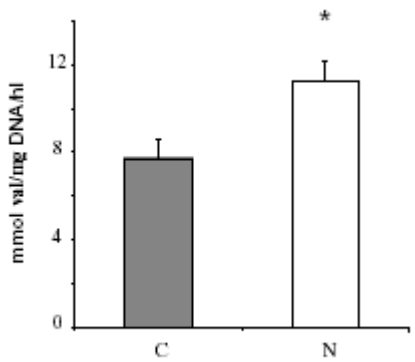


Figure 3: Total protein synthesis (nmol U-^{14}C valine incorporated / mg DNA /h) measured *ex vivo* on liver slices from lambs fed a control diet (C) ■ (70% concentrate, 30% hay) and a nitrogen deficient diet (N) □ (-36% of digested nitrogen relative to C). The liver slices from the C and N lambs were incubated in the same minimum incubation medium (no hormones and physiological concentrations of amino acids and propionate). (Kraft et al., 2008, Submitted to Journal of Animal Science)

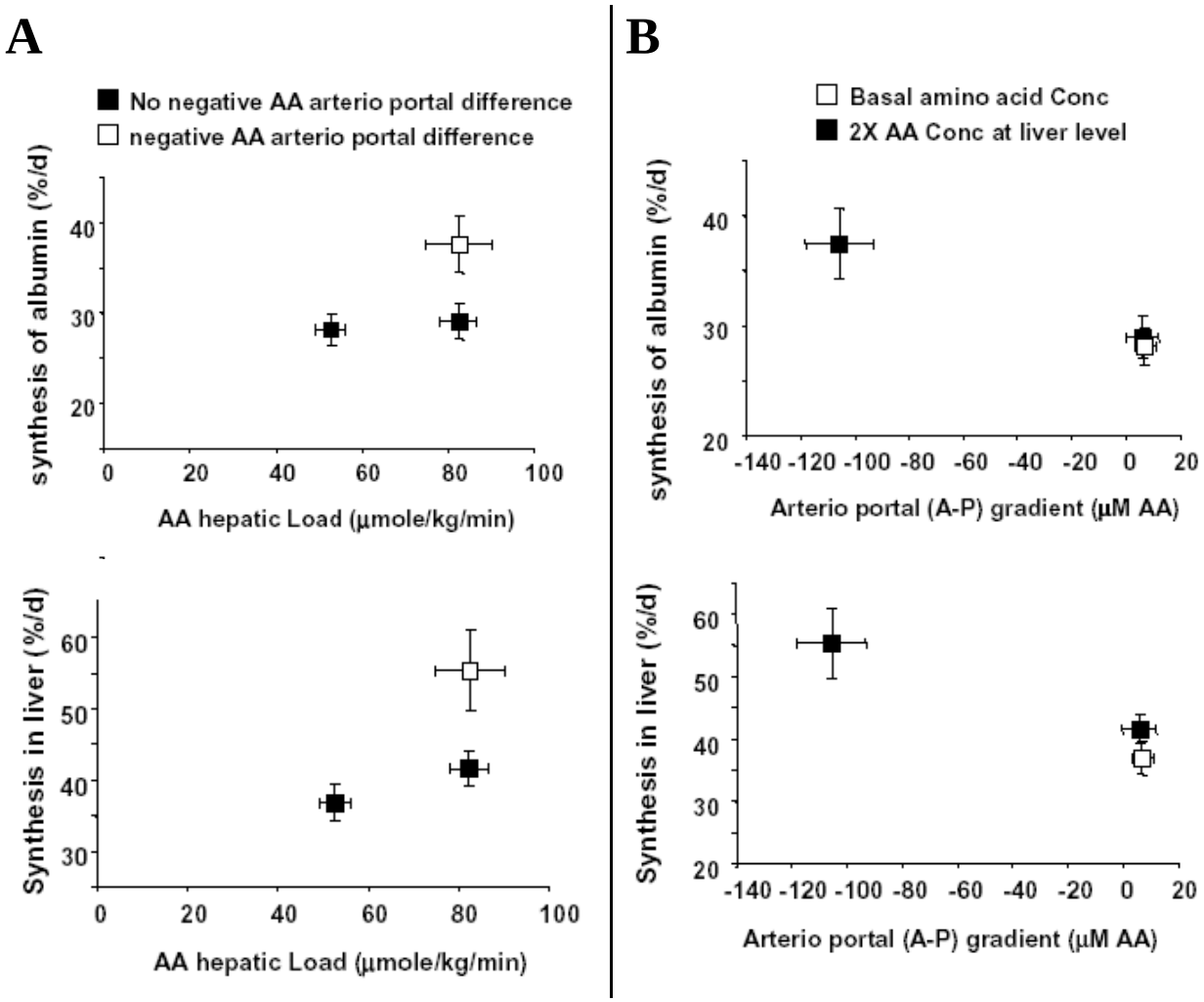


Figure 4: Hepatic and albumin synthesis rates (%/d) in presence or absence of a negative arterio-portal gradient.
A: A negative arterio portal gradient increased albumin and endogenous hepatic protein synthesis rates (+30%) compared with a group with an identical AA hepatic load but no negative arterio-portal gradient.
B: Compared with euaminoacidemia, a 2-fold increase of the hepatic AA load alone did not enhance protein synthesis substantially. A 2-fold increase of the hepatic load combined with a negative arterio portal gradient increased endogenous hepatic and albumin synthesis rates (+30%).
From Dardevet et al., 2008.

Objectifs et développement du travail de these

Objectifs et développement du travail de thèse

Dans le contexte decrit dans la partie bibliographique, mon travail de thèse a consisté à déterminer l'impact d'une modification du ratio énergie / azote dans la ration d'animaux, sur l'efficacité d'utilisation des nutriments azotés par l'animal. Ce travail a nécessité dans un premier temps la formulation des régimes expérimentaux. Deux expérimentations (*in vivo* et *ex vivo*) utilisant ces mêmes régimes ont ensuite permis de déterminer le devenir des nutriments azotés (et en particulier les AA) et la régulation de l'utilisation des AA dans l'aire splanchnique.

1) Formulation des régimes expérimentaux, difficultés rencontrées

Les caractéristiques recherchées des régimes alimentaires étaient une altération du ratio azote digéré / EM ingéré (g d'azote / MJ) sans modification du profil d'AA digestibles dans l'intestin et des autres nutriments. Nous avons donc utilisé les mêmes ingrédients dans les 3 régimes.

Avant mon arrivée en thèse, il a été décidé de nourrir des agneaux avec un régime constitué de concentré (70%) et de foin (30%). Les **régimes T (témoin), N (déséquilibré en azote) et E (déséquilibré en énergie)** ont été définis grâce à la formulation de 3 concentrés différents, le foin restant identique pour les trois régimes. Le régime T a été formulé pour apporter des quantités de PDI (protéines digestibles dans l'intestin) et d'EM (énergie métabolisable) recommandés pour des agneaux d'environ 30 kg ayant une croissance de 150-200g par jour (recommandations INRA, 1978) (Tableau 8). Chacun des concentrés a été formulé à partir du maïs et/ou de ses fractions azotées (corn gluten meal) et énergétiques (amidon de maïs). Pour le régime T, le concentré n°1 était utilisé. Le déficit relatif en azote du régime N a été obtenu par une substitution du corn gluten meal par du maïs grain (moins riche en azote) dans le concentré 2 (Tableau 8). Pour des apports identiques en EM / poids métabolique des animaux (**$kg^{0,75}$** = le poids métabolique est le poids en kg puissance 0,75) avec les régimes T et N, les quantités de matière sèche (par kg ^{0,75}) offertes aux animaux étaient identiques. Dans le cas du régime E, le concentré n°3 a été enrichi en maïs en remplacement de l'amidon de maïs afin de créer un concentré plus riche en azote. Ainsi pour des apports en PDI / $kg^{0,75}$ identiques entre les régimes T et E, les quantités de matière sèche offertes / $kg^{0,75}$ étaient plus faibles avec le régime E par rapport au régime T.

Tableau 8 Composition en ingrédients et composition chimique des concentrés (1, 2 et 3) et du fourrage utilisés respectivement dans les régimes témoin (T), déséquilibrés en azote (N) et déséquilibré en énergie (E), lors des deux expérimentations : Expérimentation 1 *in vivo* (sur agneaux cathétérisés au niveau de l'aire splanchnique), Expérimentation 2 *ex vivo* (avec incubation d'explants de foie).

	Expérimentation 1				Expérimentation 2			
	Concentrés			Fourrage	Concentrés			Fourrage
	1	2	3	Ray-gras	1	2	3	Ray-gras
Ingredients								
g/kg de matière sèche (pour le concentré)								
Maïs	0	120	560	-	500	500	580	-
Amidon de maïs	545	540	0	-	160	240	0	-
Corn gluten meal	100	40	100	-	55	10	100	-
Tourteau de soja 48	100	40	100	-	55	40	80	-
Huile de tournesol	15	20	0	-	0	0	0	-
Pulpe de bettraves deshydratées	70	70	70	-	65	55	70	-
Orge	70	70	70	-	65	55	70	-
Mélasse	40	40	40	-	40	40	40	-
Bicarbonate	20	20	20	-	20	20	20	-
Mineraux & mélange de vitamins [i]	40	40	40	-	40	40	40	-
Composition chimique								
MS [ii] g/kg	895	902	896	868	876	876	879	904
MM g/kg MS	74	78	75	93	71	62	67	65
Cellulose g/kg MS	34	47	37	308	55	38	59	306
MG g/kg MS	20	33	23	-	22	20	27	-
MAT g/kg MS	21,6	17,3	29,0	16,8	22,2	15,7	26,7	11,8
dMO (%) (estimé [iii])	88,1	88,5	85,9	56,0	-	-	-	-
EM MJ/kg MS (Estimé)	13,1	13,2	12,7	8,1	12,94	13,06	13,30	6,85

i Aliment Mineral poudre 2%, Agro-Base Bourg-en-Bresse, France. (22% Ca, 7.3% Na, 1% Mg, 0.99% S, Fe, Zn, Mn, I, Co, Se and Vitamine A, D, E, B1, B2 B6, B12, PP, K3, folates)
ii MS : Matière sèche; MM, Matière Minérale; MG : Matière grasse; MAT : Matière Azoté Totale ; dMO : digestibilité de la Matière Organique ; EM, Energie Métabolisable
iii Estimé selon Institut National de Recherches Agronomiques (1978)

La réalisation pratique de ces concentrés a posé deux difficultés lors de la première expérimentation (***Publication n°1***). Tout d'abord, le maïs utilisé pour la fabrication du régime E a présenté une teneur azotée inférieure à celle mesurée sur un échantillon prélevé préalablement. Par conséquent la matière azotée totale (MAT) du concentré 3 était inférieure de 12% à la valeur

attendue et les quantités de MAT ingérées par les animaux E étaient donc inférieures avec le régime E relativement à T (Tableau 9).

Tableau 9 Poids vifs, gain moyen quotidien (GMQ), quantités ingérées de matière sèche (MS), de matière azote totale (MAT), d'énergie métabolisable (EM), azote digéré, chez des agneaux recevant les régimes témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en énergie (E), lors des deux expérimentations : Expérimentation 1 *in vivo*, Expérimentation 2 *ex vivo*.

	Expérience 1 *In vivo*					Expérience 2 *Ex vivo*				
	T	N	E	*SEM*	*P*	T	N	E	*SEM*	*P*
Poids vifs, kg	42,2[a]	41,7[a]	40,7[b]	*0,30*	*0,02*	30,0	29,7	28,9	*0,45*	*0,20*
GMQ, g/j	265[a]	258[a]	191[b]	*0,02*	*0,07*	147,5[a]	88,3[b]	65,3[b]	*16,7*	*0,02*
Ingérés										
MS, kg/j	1,22[a]	1,21[a]	0,99[b]	*0,011*	*<0,001*	0,79a	0,78b	0,62c	*0,002*	*<0,001*
MAT, g/j	23,3[a]	18,7[b]	20,4[b]	*0,80*	*0,01*	14,1[a]	10,9[b]	14,3[a]	*0,08*	*<0,001*
EM, MJ/j	14,1[a]	14,2[a]	11,2[b]	*0,14*	*<0,001*	8,77[a]	8,69[b]	7,08[c]	*0,022*	*<0,001*
Azote digéré, g/j	16,2[a]	12,4[b]	14,7[a]	*0,65*	*0,009*	9,5[a]	6,1[b]	10,1[a]	*0,23*	*<0,001*
N digéré/EM ingéré	1,15	0,87	1,31	*0,05*	*0,001*	1,08	0,70	1,42	*0,03*	*<0,001*

a, b et c : des lettres différentes indiquent une différence significative (P < 0,05) au sein d'une expérience

Le deuxième problème rencontré concerne l'utilisation de grandes quantités (plus de 50%) de corn gluten meal et d'amidon de maïs dans la composition des concentrés 1 et 2. Ces deux aliments, sous forme de poudre, se sont révélés très difficiles à agglomérer lors de la fabrication des granulés en grande quantité (alors qu'un essai préalable de fabrication sur de petites quantités s'était révélé fructueux).

En conséquence, la composition des concentrés utilisés dans la seconde expérimentation (***Publication n°4***) a été modifiée et a inclus de plus grandes quantités de maïs (Tableau 8). Ceci a permis 1) d'éliminer les difficultés de fabrication des granulés et 2) d'obtenir des déséquilibres en azote et énergie conformes aux attentes.

Cependant, et malgré les difficultés de fabrication des régimes, les rapports azote digéré/ énergie métabolisable ingérée étaient conformes aux attentes (Tableau 9). De plus, l'analyse de l'apparition nette portale en nutriments obtenue dans la ***Publication 1*** montre que l'objectif fixé était également atteint : 1) diminution de l'apparition nette portale en AA pour le régime N relativement à T en E et 2) diminution de l'apparition nette portale en acides gras volatils pour le régime E relativement à T et N (Tableau 10).

Tableau 10 Apparition nette portale en acides aminés totaux (AAT) et acides gras volatils totaux (AGV) (en mmol/h) chez les agneaux recevant les régimes témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en énergie (E) (Expérimentation 1, *in vivo*)

	T	N	E	SEM	Probabilité
Apparition nette portale (mmol/h)					
AAT	30,9[a]	19,0[b]	25,4[a]	2,04	0,01
AGV	187,4[a]	186,4[a]	135,0[b]	8,81	0,004

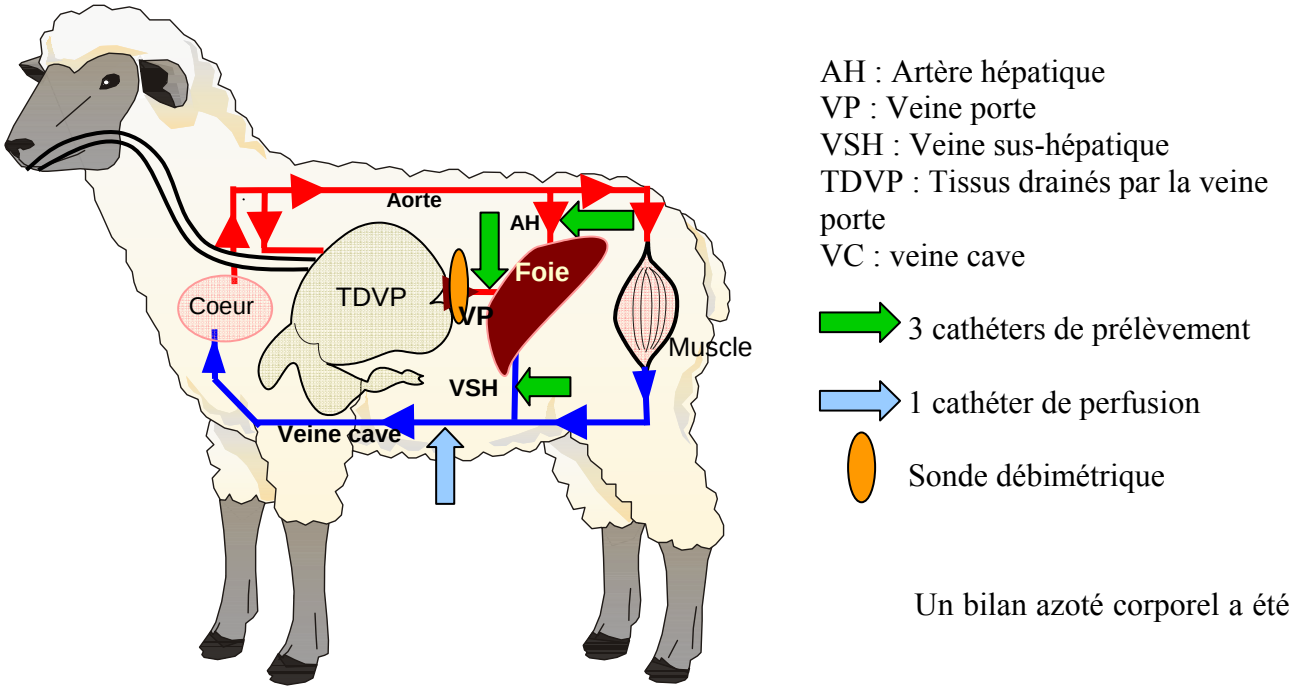
2) Déroulement du travail de thèse

Deux expérimentations complémentaires ont été réalisées au cours de mon travail de thèse. La première sur agneaux cathétérisés *in vivo* et la seconde sur explants de foie mis en survie *ex vivo*. Elles sont présentées dans l'ordre chronologique de leur réalisation.

1ère expérimentation

Les trois régimes expérimentaux T, N et E ont été donnés à 6 agneaux cathétérisés (4-6 mois, 41,5 kg) au niveau de l'aire splanchnique selon un double carré latin inversé. Les cathéters étaient chirurgicalement placés dans l'artère, la veine cave, la veine porte ainsi que dans l'une des veines sus-hépatiques. Une sonde débimétrique était placée autour de la veine porte (Figure 42).

Figure 42 Sites d'insertion des cathéters et de la sonde débimétrique placés au niveau des différents vaisseaux chez les agneaux lors de l'Expérimentation 1.



Un bilan azoté corporel a été

réalisé. Au cours de la journée de prélèvements, une série de prélèvements au niveau de trois vaisseaux cathétérisés (artère, veine porte et veine sus hépatique) ainsi que la mesure continu du débit sanguin ont été réalisées. L'analyse des concentrations en AA plasmatiques a été réalisée par la technique de dilution isotopique (utilisation de la chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectrométre de masse, **GC-MS** Annexe 4) dans le plasma. Les concentrations en nutriments énergétiques sur ces mêmes animaux ont également été mesurées et font l'objet d'un autre travail de thèse (C. Loncke et I. Ortigues-Marty, en cours). Ces résultats de bilans nets artério-veineux en AA au niveau des TDVP, foie et tissus splanchniques totaux font l'objet de la ***Publication n°1***.

Sur les mêmes animaux, lors des journées de prélèvements, une perfusion d'un mélange de deux AA marqués était réalisée en veine cave. La phénylalanine [$^{2}H_{5}$] et la leucine [1-^{13}C] étaient conjointement infusées L'enrichissement isotopique en phénylalanine [$^{2}H_{5}$] et en leucine [1-^{13}C] dans les AA libres du plasma prélevé dans les différents vaisseaux cathétérisés a été mesuré par spectrométrie de masse organique (GC-MS). L'enrichissement isotopique des protéines totales et de l'albumine dans le plasma artériel en leucine [1-^{13}C] a été mesuré par spectrométrie de masse isotopique (couplage de la chromatographie en phase gazeuse / combustion et enrichissement isotopique par spectrométrie de masse: GC-C-IRMS). Ces données ont permis de calcul des flux de phénylalanine [$^{2}H_{5}$] et de leucine [1-^{13}C] au niveau du corps entier ainsi que des différents compartiments de l'aire splanchnique (TDVP, foie, TS). L'enrichissement isotopique dans les protéines plasmatiques, mesuré en cinétique, a permis de déterminer la vitesse de synthèse fractionnaire (% / jour) de ces protéines. A la différence de l'ensemble des autres publications présentées dans ce manuscrit de thèse, l'analyse des données brutes, les calculs et interprétations des données a été majoritairement prise en charge par I. Savary-Auzeloux et fait l'objet de la ***Publication n°2***. Les données de vitesse absolue de synthèse des protéines totales plasmatiques ont également été utilisées pour analyser les données de bilans artério-veineux de la ***Publication n°1***. Les résultats des ***Publications 1 et 2*** sont donc fortement imbriqués.

Stratégie : Cette première expérimentation réalisée *in vivo* devait nous fournir des pistes sur la stratégie la plus pertinente à adopter pour améliorer l'efficacité de production de animaux dans les conditions alimentaires testées. Grâce à l'étude du prélèvement en AA au niveau des TDVP et du foie ainsi que la mesure des flux traceurs et la synthèse des protéines plasmatiques, nous avons obtenu des indications sur les tissus et voies métaboliques impliqués dans l'économie / le gaspillage d'AA au niveau splanchnique.

2ème expérimentation

La seconde expérimentation réalisée au cours de ma thèse a utilisé les régimes décrits dans le Tableau 8 et ont été distribués à des animaux légèrement plus jeunes et donc moins lourds que ceux utilisés lors de la première expérimentation. Le schéma expérimental utilisé est différent de celui appliqué dans les ***Publications 1 et 2***. Les animaux étaient menés par blocs de trois (1 animal par régime) et pair-fed de l'animal le plus petit du bloc. Les animaux du même bloc étaient abattus le même jour, le foie était prélevé puis transporté rapidement au laboratoire pour être mis en survie. Cette technique d'explants de foie incubés *ex vivo* a permis de mesurer la synthèse protéique totale (par incorporation de valine [U-^{14}C] dans les protéines d'explant), la synthèse des protéines sécrétées dans le milieu d'incubation (par incorporation de valine [U-^{14}C] (protéines totales constitutives et exportées) méthionine [^{35}S] (protéines particulières)), la synthèse de glucose à partir de l'alanine [U-^{14}C] et du propionate [1-^{14}C] ainsi que l'oxydation de ces deux derniers nutriments marqués.

La mise en place de cette expérimentation a nécessité de nombreuses mises au point (détaillées dans la ***Publication n°3***) afin de s'assurer 1) de l'acceptabilité des critères de survie des explants dans nos conditions d'incubation et 2) de la fiabilité des mesures de l'activité des voies métaboliques que nous voulions mesurer. En effet, pour éviter toute stimulation des voies métaboliques par des facteurs liés au milieu, des concentrations physiologiques en nutriments ont été utilisées et aucune hormone n'a été ajoutée dans le milieu. La ***Publication n°4*** regroupe les résultats issus de cette seconde expérimentation.

Stratégie : Cette seconde expérimentation est complémentaire de la première. Un nombre plus large de voies métaboliques a été mesuré. Alors que pour l'expérimentation *in vivo*, les voies métaboliques étaient soumises à de nombreux facteurs de régulation (nutriments, hormones …), l'étude *ex vivo* nous permet de standardiser l'environnement des explants (milieux d'incubation identiques pour tous les explants). Seules des adaptations du foie aux différents régimes persistant au cours de l'incubation des explants peuvent ainsi être mises en évidence.

Un résumé simplifié des deux schémas expérimentaux réalisés et des mesures associées est présenté en Figure 43.

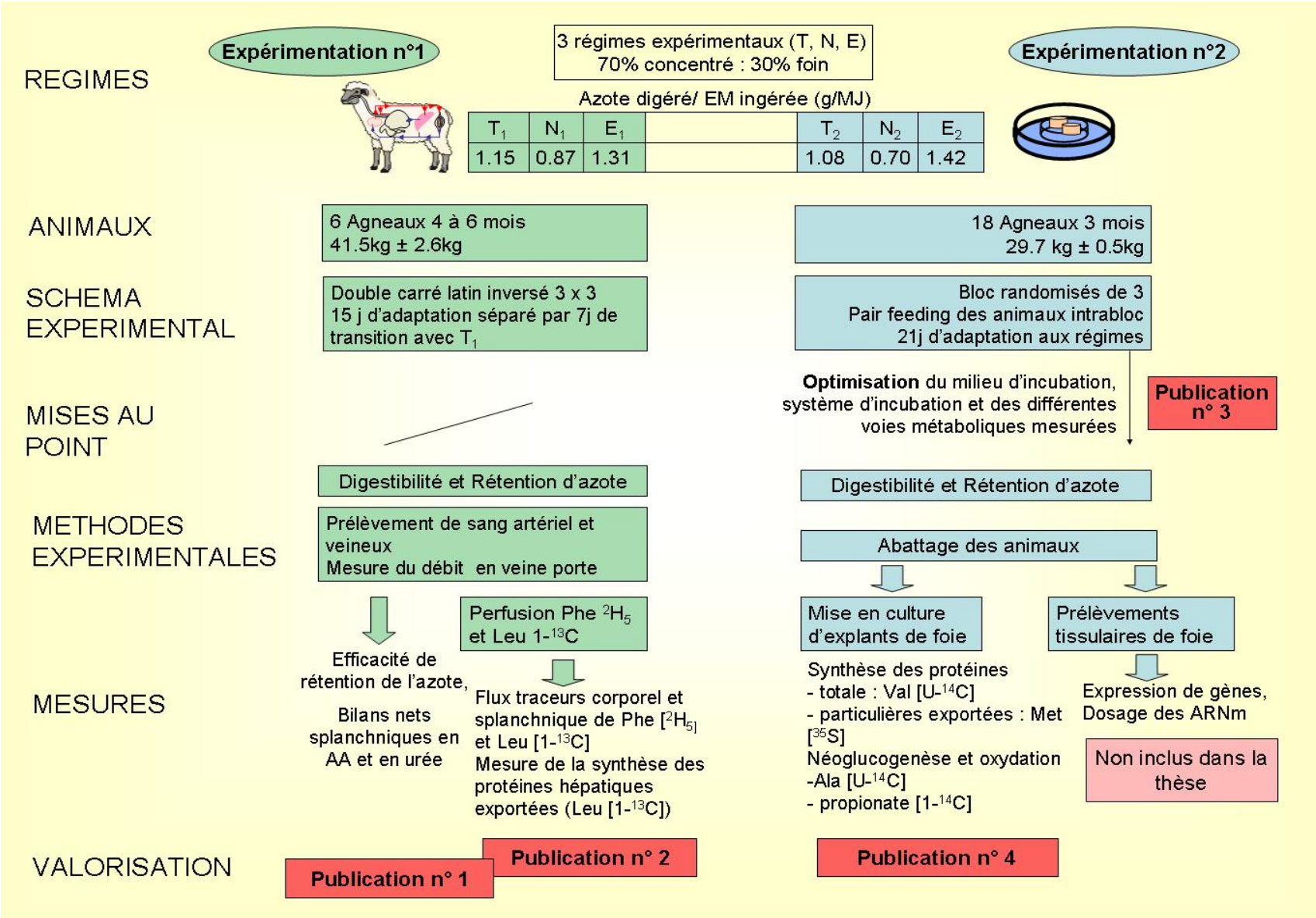
Ainsi l'intégration de l'ensemble de ces résultats permettra de répondre aux différentes questions posées en introduction générale de ce travail :

1) Quel sont les effets des régimes testés sur la **rétention et la croissance des animaux** ? Comment se répartit l'utilisation des acides aminés **entre tissus splanchniques et tissus périphériques** ?

2) Quelles sont les **voies métaboliques majeures utilisant les AA dans le foie** et expliquant les modifications de prélèvement d'AA induites par les régimes expérimentaux ?

3) Quels sont les **facteurs de régulation** impliqués dans ces adaptations ? S'agit-t-il de facteurs de régulation externes au foie (nutriments, hormones) ou d'adaptations du tissu lui-même aux variations d'apports en nutriments (modification de sa sensibilité ou réponse aux stimuli extérieurs) ?

Figure 43 Schéma récapitulatif des deux expérimentations



Publication n° 1

Les adaptations du métabolisme hépatique des acides amines contribuent à l'épargne ou au gaspillage d'azote chez des agneaux nourris avec un régime déséquilibré en azote ou en énergie

Guillaume Kraft, Isabelle Ortigues-Marty, Denys Durand, Didier Rémond, Thierry Jarde, Brian Bequette, et Isabelle Savary-Auzeloux

Accepté avec modifications par *Animal*

Résumé : Cette étude a examiné l'impact d'un déséquilibre en azote ou en énergie dans la ration de ruminants en croissance (et donc d'une modification de l'apparition nette portale en nutriments azoté ou énergétique), sur le métabolisme des acides aminés (AA) dans le foie et l'apport net en nutriments azotés aux tissus périphériques. Six agneaux (41,5 kg ± 2,6 kg, de 4 à 6 mois) cathétérisés au niveau de l'aire splanchnique ont reçu, selon un double carré latin inversé, trois régimes dont l'apport en azoté (N), ou l'apport en énergie métabolisable (E) étaient diminués de 20% par rapport à un régime témoin (T). L'émission nette en AA et en azote uréique étaient mesurés au niveau des tissus drainés par la veine porte (TDVP) et du foie. Les animaux nourris avec le régime N présentaient une meilleure efficacité de rétention azotée (59 % de l'azote digéré) relativement aux animaux nourris avec les régimes T et E (50 % et 33 % respectivement ; P<0,001). L'apparition nette portale en azote aminé est inférieur (-40 %, P < 0,01) dans le régime N relativement à T. Malgré cela, l'émission nette splanchnique en azote aminé n'est pas significativement différente entre les trois régimes (3,3; 1,9; et 2,6 g d'AA-N totaux / jour pour T, N et E respectivement ; P = 0,52). Ainsi, des adaptations métaboliques différentes ont dû se mettre en place au niveau hépatique entre les trois régimes expérimentaux. La combinaison entre une diminution du prélèvement net en AA-N totaux (-39 %, T vs N, P = 0,002) par le foie et d'une diminution de la production d'urée dans l'urine (-48 %, T vs N, P = 0,001) associée avec un maintien de la synthèse des protéines exportées permet d'épargner les AA du catabolisme dans le régime N relativement aux deux autres régimes. Pour le régime E, une augmentation de l'excrétion d'urée dans l'urine est observée (+30 %, E vs C, P = 0,01). Ceci peut être expliqué par une augmentation de l'utilisation des AA pour la néoglucogenèse dans le foie et/ou une augmentation du catabolisme des AA par les muscles. Ces effets, combinés avec une diminution de la synthèse des protéines exportées, ont induit une baisse de la rétention azotée corporelle dans le régime E.

Adaptations of hepatic amino acid metabolism contribute to the nitrogen economy in lambs fed nitrogen- or energy-imbalanced diets

Guillaume Kraft[1], Isabelle Ortigues-Marty[1], Denys Durand[1], Didier Rémond[2], Thierry Jardé[1], Brian Bequette[3] and Isabelle Savary-Auzeloux[1]*

[1] *INRA, UR 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, F 63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

[2] *INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, F 63122 Saint-Genès-Champanelle, France*

3 Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland, College Park, MD 20742-2311, Unites States of America

*Corresponding author: Savary-Auzeloux Isabelle
INRA
Unité de Recherches sur les Herbivores, UR 1213
Equipe Nutriments et Métabolismes
Site de Theix
F63122 Saint-Genès-Champanelle
FRANCE
Tel: (33) (0)4 73 62 47 32
Fax: (33) (0)4 73 62 46 39
E-mail: Savary@clermont.inra.fr

Running title: Net Splanchnic fluxes of AA

Keywords: amino acid, lamb, liver, splanchnic tissues, net flux

Abstract

This study investigated the outcome of relative changes in dietary nitrogen and energy supply to growing ruminants (and hence variations in net portal appearance of nitrogenous and energy nutrients) on the net amino acid (AA) uptake by the liver and net nitrogen supply to the peripheral tissues. Six lambs were catheterized across the splanchnic tissues and received, in a duplicate latin square, three diets in which nitrogen (N) or metabolisable energy (E) intake were depleted by 20% relative to a control diet (C). Net fluxes of AA and urea-N were measured across the portal-drained viscera (PDV) and liver. Animals fed the N diet showed more efficient nitrogen retention (59% of digested nitrogen), than the C and E animals (50% and 33%; $P<0.001$). Net portal appearance of total AA-N was lower (-40%, $P<0.01$) for the N diet compared with C. Despite this, total AA-N net splanchnic fluxes were not significantly different across the three diets (3.3, 1.9 and 2.6 g total AA-N/d for C, N and E respectively; $P=0.52$). Thus different metabolic adaptations must have taken place across the liver between the three experimental diets. A combination of decreased net uptake of total AA-N (-39%, C vs N, $P=0.002$) by the liver and reduced urinary urea-N production (-48%, C vs N, $P=0.001$) but with export protein synthesis maintained spared AA from catabolism with the N diet relative to the other two diets. For the E diet there was increased urinary urea-N output (+30% vs C, $P=0.01$). This may relate to increased utilisation of AA for gluconeogenesis in the liver and/or an increased catabolism of AA by the muscle, These effects in combination with decreased hepatic export protein synthesis led to a lower whole body protein retention with the E diet.

Implications

In order to improve the efficiency of utilisation of amino acids (AA) by ruminants (and reduce nitrogen excretion in the environment), the relative changes in dietary nitrogen and energy supply on the AA uptake by the liver and net nitrogen supply to the peripheral tissues were studied. We showed that when nitrogen is not supplied sufficiently relatively to energy to cover the theorical requirements for growth, some metabolic adaptations can take place at the whole body and the liver levels to spare AA. This is not the case when energy is not supplied sufficiently relatively to nitrogen.

Introduction

An essential challenge in farm animal nutrition is matching nutrient supply to nutrient requirements. Existing ruminant feeding systems (Jarrige, 1989) offer a broad prediction of the utilisation of absorbed nitrogen for growth, in which conversion efficiency is assumed to be unaffected by diet composition. However, this assumption does not hold when dietary conditions differ from those used to construct the system (Hanigan, 2005). Some of the mechanisms that invalidate the initial assumption involve splanchnic tissue metabolism (total splanchnic tissues (**TSP**) = portal-drained viscera (**PDV**) + liver). Many studies consistently show the crucial role of the TSP in the net utilisation of amino acids (**AA**) (Lapierre *et al.*, 2000) by the whole body. The TSP contribute 30-50% to whole body protein synthesis (Lobley, 1994) and about 50% to energy expenditure in ruminants (Ortigues-Marty and Doreau, 1995). Their active metabolism and its potential adaptation to changes in supply (diet composition) and demand (maintenance *vs.* growth or lactation), may account for discrepancies between observed and predicted performance, but these effects are poorly understood (Lobley, 2007).

In growing ruminants, many studies have investigated the effects of nutritional factors on the net splanchnic uptake of AA (Lobley, 2003). The effects of feed intake have been extensively investigated and clearly show that an increase in feed intake induces an increased net portal and net splanchnic release of AA (Lapierre *et al.*, 2000; Burrin *et al.*, 1991), associated with increased milk production (Lapierre *et al.*, 2000; Raggio *et al.*, 2006). However, the picture is less clear when more subtle diet changes are made. For instance, an increased metabolisable protein supply increased net portal appearance (**NPA**) of AA (Blouin *et al.*, 2002) but increased (Blouin *et al.*, 2002; Raggio *et al.*, 2006) or had no effect (Castillo *et al.*, 2001; Metcalf *et al.*, 1994) on milk production and/or yield. Similarly, energy supplementation alone increased net hepatic uptake of free AA (Ferrell *et al.*, 1999; Savary-Auzeloux *et al.*, 2003) but milk (protein) yield response to the energy supplementation was weaker (Raggio *et al.*, 2006; Rigout *et al.*, 2003).

Hence a nitrogen imbalance (relative to energy) and an energy imbalance (relative to nitrogen) have an impact on nitrogen utilization at the splanchnic and whole body levels. Of the TSP, the liver is known to play a central role in nitrogen utilisation in these nutritional situations (Reynolds, 2006), partly because this tissue is involved in many obligatory regulatory processes of nitrogen/energy homeostasis (aminoacidaemia, glycaemia, ammonia detoxification, etc.) involving various metabolic pathways: protein synthesis and breakdown, oxidation, gluconeogenesis and ureagenesis.

The aim of the present study was to investigate the outcome of changes in the relative dietary nitrogen and energy supply on the net nitrogen (amino acid) fluxes across the TSP in growing lambs and hence the consequences for the net nitrogen supply to peripheral tissues. The TSP (especially the liver) are of particular interest because they are often described as the "integrators" of dietary supply with body requirements (Reynolds, 2006). To study these nitrogen/energy interactions, animals were fed either a control diet (formulated according to recommendations (Jarrige, 1989) or a diet imbalanced for either nitrogen or energy. To fully assess the ability of the splanchnic and peripheral tissues to redirect their metabolism towards energy- or nitrogen-sparing mechanisms, the dietary imbalance was achieved by depleting nitrogen or energy in the ration rather than by supplementation.

Materials and methods

Animals and treatments

The experiment complied with national legislation on animal care (Certificate of Authorization to Experiment on Living Animals, No. 63-113, Ministry of Agriculture, France).

Six growing male lambs (crossbred Limousin × Ile de France × Romanov), 4 to 6 months old, with an average experimental weight of 41.5 kg ± 2.6 kg, were surgically prepared. Blood catheters were inserted into the portal and hepatic veins as described by Ortigues-Marty *et al.* (1994) The arterial blood catheter was fitted directly in the abdominal aorta. The lambs were also fitted with a transit-time ultrasonic blood flow probe on the portal vein (Type A; Transonic Systems Inc. Ithaca, NY). They were housed in individual stalls at 20 °C with continuous lighting and had *ad libitum* access to drinking water and a trace-mineralised lick salt. After surgery, the lambs were left to recover for at least 3 weeks while they were adapted to the control diet (see below).

Following the recovery period, the six lambs received each of the three experimental diets in a replicated 3 × 3 latin square design. The three diets were composed of 30% hay (from natural grassland, first growth, early cut) and 70% concentrate (Table 1) differing only in concentrate composition and total dry matter (**DM**) allowances (Table 1). The chemical composition of the concentrates was modified by altering the level of maize or its components (maize gluten meal and starch) (Table 1). The control diet (C, using concentrate #1) was designed to comply to the INRA recommended allowances in Protein Digestible in the Intestine (**PDI**) and Metabolizable Energy (**ME**) for a theoretical growth rate of 200 g per day (6.3 g/d/kgBW$^{0.75}$ PDI and 0.85 MJ/d/kgBW$^{0.75}$ ME) (Jarrige, 1989) (Table 1). The nitrogen-imbalanced diet (N) was made up using concentrate #2 (Table 1) and supplied 4.8 g/d/kgBW$^{0.75}$ PDI and 0.85 MJ/d/kgBW$^{0.75}$ ME (Table 1). The concentrate #2 had a 26% lower PDI content than concentrate #1 but similar ME content. DM allowances were then similar between diets C and N. The energy-imbalanced diet (E) was made up using concentrate #3, which had higher PDI content but a similar ME content than concentrate #1. Diet E allowed a 18% lower ME intake than C through lower DM allowances (Table 1). The E diet supplied 6 g/d/kgBW$^{0.75}$ PDI and 0.7 MJ/d/kgBW$^{0.75}$ ME (Table 1)**.** Each treatment period lasted 2 weeks. The treatment periods were separated by a transition period of 7 days when the animals were fed the C diet. The daily feed allowances were adjusted at the start of each treatment on the basis of the initial metabolic weight (body weight $^{0.75}$) of the animals and dispensed in eight equal meals at 3 h intervals. Twenty-four hours before and throughout the sampling day the animals were fed every hour to obtain a metabolic steady state.

At the end of the experiment, lambs were euthanized and correct positioning of catheters and probes was checked at necropsy.

Measurements and laboratory analyses

Feed intake and refusals were measured daily. Samples of hay and the three concentrates were taken to quantify DM, ash, cellulose, starch, lipids and total nitrogen using standardized methods (respectively: EEC Directive 81/680, French Standard NFV 18-101, EEC Directive 92/89, 3rd EEC Directive corrected 27/11/1980, 2nd EEC Directive corrected 20/12/1983 and French Standard NFV 03-050). Live weights were measured twice weekly. Nitrogen balance was determined by urine and faeces collection over the last 6 days of each treatment period and samples were analysed for DM and Kjeldahl nitrogen.

Measurements for net nutrient fluxes were carried out on the last day of each treatment period. On the sampling day portal blood flows were continuously recorded for 7 h (10:00-17:00) using a flowmeter (T206, Transonic Systems Inc.). Seven sets of arterial, venous portal and hepatic blood samples were withdrawn at hourly intervals (30 minutes before and after each meal) from 10:30 to 16:30. Every hour 1 ml of blood was taken from each catheter in heparinized tubes (5 IU/ml blood) for amino acid assay. Every 2 h, another 1 ml of blood was taken in tubes containing 3 mM EDTA-K (10 µl/ml blood) for urea-N and ammonia-N measurement. Whole blood was kept for immediate haematocrit determination.

To determine AA concentrations, heparinized blood was centrifuged (15 minutes at 1200*g*) and 750 µl of the plasma obtained was spiked with 60 µl of an internal standard of [U-^{13}C] AA mixture (hydrolysed algae: 5 mg/mL, Martek, Maryland, USA) obtained from hydrolysis of algal protein (Calder *et al.*, 1999), plus [amide 1-^{15}N]asparagine, [amide 1-^{15}N]glutamine, ^{15}N cysteine and U-^{13}C histidine (Cambridge, Isotope Laboratories, Andover, USA) (0.45-0.75 mg/ml for each AA). The spiked plasma was deproteinized with sulfosalicyclic acid (10% w/v) and centrifuged at 2600*g* for 10 minutes at 4°C. The supernatant was stored at -20 °C until analysis. At the time of analysis, amino acids were purified on AG50 X8 H+ resin (Biorad, CA) and a N-(tert-butyl-dimethyl-silyl) AA derivative was prepared (Calder *et al.*, 1988). AA concentrations were determined by gas chromatography - mass spectrometry (Trace GC / Automass Multi, Thermofinnigan, Courtaboeuf, France) according to Calder *et al.* (1999).

Blood with EDTA (300 µl) was stored at -20 °C for urea-N analysis by diacetylmonoxime direct assay (Ormsby, 1942). The remaining blood was centrifuged and 300 µl of plasma was frozen at -20 °C for further measurement of N-NH_3 concentration by the enzymatic GDH method (Muting *et al.*, 1968).

Calculations and statistical analyses

The hepatic arterial blood flow was estimated at 5.3% of the portal blood flow based on its reported contribution to hepatic blood flow (Barnes *et al.*, 1986) and the absence of significant changes in the contribution of the hepatic arterial to total venous blood flow with intake (Vernet *et al.*, 2005). If arterial blood flow is increased to 10%, the effect on the net hepatic uptake of AA was very small (less than 1% for phenylalanine for instance in all diets). Plasma flows (l/min) in each vessel were calculated using haematocrit and corresponding blood flows (l/min). Values of blood and plasma flows were averaged over the entire sampling day as no significant variation of blood flow had been detected.

Afferent and efferent plasma fluxes of AA were calculated using plasma concentrations and the corresponding plasma flows. Afferent and efferent blood fluxes of urea-N were calculated using blood urea concentrations and blood flows (for calculation, see Milano, 1997). Net fluxes across PDV, the liver, and TSP were calculated as described elsewhere (Savary-Auzeloux *et al.*, 2003), by difference between afferent and efferent fluxes. A negative flux indicates a net removal of metabolite, a positive flux a net release. The fractional extraction of a metabolite by each tissue was calculated as the ratio of the net metabolite fluxes to its afferent flux to the tissue.

Total amino acids (**TAA**) and each amino acid family (essential, branched-chain and non-essential) were the sums of corresponding AA (respectively **EAA** = histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine; **BCAA** = isoleucine, leucine, valine; **NEAA** = alanine, asparagine, aspartate, cysteine, glutamate, glutamine, glycine, proline, serine, tyrosine; TAA = EAA + NEAA).

To calculate the contribution of each amino acid to total splanchnic exchanges of nitrogen, the concentration of each AA (expressed as µmol AA / g plasma) was converted to grams of nitrogen.

Statistical analysis

Results were analysed by ANOVA in a double latin square design, with animal (nested within the latin square), treatment, and period as main factors. Analysis was carried out using the GLM procedure of Statistica (Statsoft, Tulsa, OK). Means were compared by orthogonal contrasts (Contrast 1: Control *vs.* N-, and Contrast 2: Control *vs.* E-). Differences were declared significant at $P<0.05$ and tendencies were declared for $0.05<P<0.1$

Results

Each catheter remained functional throughout the experiment. No significant drift of blood flow or haematocrit was noted during each sampling day.

Intake, growth and nitrogen balance

Nitrogen intake of the lambs (Table 2) on the N diet was reduced by 20% and was unchanged for DM and ME intake, as expected, compared with C. With the E diet, ME intakes were reduced by 20% compared with C, corresponding to the planned 19% decrease in DM ingested. However, nitrogen intake was reduced by 12% ($P<0.04$) as a result of a lower-than-expected nitrogen content of the maize used in concentrate #3. Apparent DM digestibility was high and similar across diets (Table 2). Nitrogen digestibility was reduced by 5% with N ($P<0.03$) and not modified with E compared with C. Consequently, the nitrogen apparently digested was reduced by 23.5% with the N diet ($P<0.003$) but not significantly modified with the E diet compared with C (16.2, 12.4 and 14.7 g digested N/d, for C, N and E respectively). Thus the ratio of apparently digested nitrogen to ME was 1.15, 0.87 and 1.31 for C, N and E, respectively.

No differences in average lamb live weight and daily gain were noted between the C and N diets (Table 2). With the E diet, average live weight was lower by less than 4% ($P=0.01$), probably as the result of lower DM intake ($P<0.001$) and gut contents. Similarly, the daily weight gain tended to be lower ($P=0.07$) compared with C. Nitrogen retention was not affected for the N diet ($P=0.28$) but was decreased with E ($P<0.003$). Consequently, efficiency of digested nitrogen utilization was increased with N (59%, $P<0.01$) and reduced with E (33%, $P<0.001$) compared with C (50%). This is linked with the urinary nitrogen losses, which represented 50%, 41% and 60% of apparently digested nitrogen, for C, N and E respectively, reflecting significant changes in urinary output between the diets (Table 2).

Blood and plasma flow

The haematocrit, blood flows and calculated plasma flows are shown in Table 3. Haematocrit was not influenced by the diet ($P=0.61$). Nitrogen deficiency induced a reduction in the portal blood and plasma flows of 7% ($P= 0.02$) and energy deficiency 16% ($P<0.001$) compared with the C diet.

Urea-N and ammonia-N

Arterial and net flux of urea-N are presented along with AA results (Tables 4 and 5) The measurement of urea-N in urine (Table 2) plus recycled urea-N in the PDV (Table 4) was consistent

with the urea-N produced by the liver. The urea-N in urine plus urea-N that enters the gut represented 11.4, 7.6 and 12.7 g nitrogen/d for the C, N and E diets, whereas the net urea-N production by the liver of these lambs was 10.9, 6.9, 11.6 g nitrogen/d for the C, N and E diets (Table 5). By contrast, the values for ammonia-N uptake by the liver relative to the urea-N produced were not as expected: the contribution of ammonia-N uptake to the urea-N produced was close to or even above 100% for some diets (below 60% in the literature for sheep fed conventional diets (e.g. Burrin *et al.*, 1991; Lobley and Milano, 1997). Consequently, the ammonia-N data have been omitted and the data for net urea-N fluxes (Table 5) are used only for a better understanding of the AA metabolism in the liver.

Arterial concentrations of amino acids

TAA and NEAA arterial concentrations were similar with all three diets (Table 4). However, EAA arterial concentrations decreased with the N diet (-14%, P=0.008) and tended to do so with the E diet (-7%, P=0.10). These effects were due primarily to a decrease in BCAA concentrations. Arterial Val concentrations were reduced with both diets (-20% and -12% for N and E respectively, P=0.01). Decreases in Leu (-17%, P=0.001) and Ile (-12%, P=0.02) were also noted for the N diet.

Despite no changes in arterial NEAA concentrations, increases in arterial Ala and Gly concentrations were observed with the N diet compared with C (+11% and +19% respectively, P<0.05).

Net portal drained viscera fluxes of amino acids

NPA of TAA-N represented 60-77% of the apparently digested nitrogen in all three diets (Tables 2 and 5). Trp and some NEAA (Orn, Cit, Arg) were not measured, which probably underestimated the net PDV fluxes of TAA-N. As expected, the N diet reduced the NPA of the various AA fractions compared with the C diet (-40% for TAA-N, P=0.005; -55% for NEAA-N, P=0.002; -22% for EAA-N, P=0.04; and -28% for BCAA-N, P=0.01) (Table 5). With the E diet, the net PDV flux of AA was reduced for BCAA-N (-21%, P=0.03) but not for TAA-N, EAA-N or NEAA-N; overall, the values were numerically intermediate between N and C, reflecting the unexpected reduction in nitrogen intake.

The reduction in the NPA of BCAA-N noted for both experimental diets (N and E) was due to similar changes for Leu, Ile and Val (-26%, -31%, -28%, P<0.05 with N, and -20%, -20% and -23%, P<0.1 with E). In addition, Lys and Thr net PDV release was decreased by the N diet (-68% and -45%, P<0.05).

As for the individual NEAA, reductions in the NPA of Ala, Pro and Ser were noted with both N (-31%, -41% and -30%, *P*=0.01) and E (-21%, -22%, -30%; *P*<0.05) diets. The N diet also induced a decreased net PDV release of Asn (-27%, *P*=0.02) and Tyr (-38%, P=0.01), and a net disappearance of Glu (the net PDV flux was 0.55 mmol/h with C and -0.22 mmol/h with N, *P*=0.01). Furthermore, the NPA of Gly was reduced with the E diet (-58%, *P*=0.04).

Net fluxes of amino acids in liver and total splanchnic tissues

With all the diets, a large proportion of net TAA-N appearing in the portal vein was taken up by the liver (65-70%) so that the net splanchnic release of TAA-N represented only 15-20% of apparently digested nitrogen. It is noteworthy that the net splanchnic release of TAA-N was not different across diets (*P*=0.34) (Table 5). This important finding resulted from a reduction in the net uptake of TAA-N by the liver with the N diet -39%, *P*=0.002). For the C diet, His net splanchnic appearances was negative (significantly different from 0) as well as that of different individual NEAA such as Ala, Cys and Gln.

The nitrogen deficiency was accompanied by a reduction in the net hepatic uptake of the EAA-N (-30%, *P*=0.02) and NEAA-N (-46%, *P*=0.004) (Table 5). For the energy deficiency there was a trend towards a reduction in the net hepatic uptake of the EAA-N (-20%, *P*=0.10) but this was not sufficient to alter that of the TAA-N.

Met and Phe were the only non-branched EAA for which the liver showed clear responses to the dietary treatments (Table 5). The net hepatic uptake of Met was decreased with N and E relative to C (by 26% and 42%, respectively, *P*=0.08 and *P*=0.01 compared with C) as a result of numerical decreases in both portal supply and hepatic fractional extraction rate (Table 6). The net hepatic uptake of Phe was also decreased (by 25% and 20%, *P*=0.01 and *P*=0.03 for N and E), again following numerical decreases in portal supply and hepatic fractional extraction rate (*P*=0.03 for N). Across the liver, none of the BCAA were affected by the treatments.

Concerning the NEAA, the reduction in their net hepatic uptake noted with the N diet (*vs.* C) was due to Ala (-31%, *P*=0.001), Asn (-38%, *P*=0.03), Gln (-74%, *P*=0.08), Ser (-29%; *P*<0.001) and Tyr (-29%, *P*=0.03). Glu was characterized by an increase in net release (+55%, *P*=0.02 with N). With the E diet and despite the absence of significant changes in the hepatic uptake of overall NEAA, liver net removal of Ala, Ser and Tyr decreased (-27% *P*=0.002; -25% *P*<0.001; -23% *P*=0.07 respectively), while the uptake of Asp increased (*P*=0.04). Lastly, and in contrast to that observed for the N diet, the net hepatic release of Glu tended to decrease with E (-40%, *P*=0.08).

Consequently, at the splanchnic level, the N diet induced (i) a decreased net release of BCAA (Ile : -35%, *P*=0.03; Leu : -32%, *P*=0.02; Val : -31%, *P*=0.05 for N *vs.* C), of Asp (-38%)

and Pro (-49%) as a result of lower portal absorption, and (ii) an increase in the net removal of Gly (+180%, *P*=0.05) resulting from non-significant changes at PDV and liver levels. With the E diet, the net splanchnic release of EAA was not altered relative to C, although some NEAA decreased: namely Gly (because of a lower NPA), Asp (increased hepatic uptake) and Glu (lower hepatic release). Overall, and across the three diets, the net gain in AA released to peripheral tissues was composed almost exclusively of EAA, whereas absorbed NEAA were almost totally utilized within the TSP. Finally, we note that the net splanchnic release of His was increased with N and E (*P*=0.04), following non-significant changes across the PDV and liver.

Discussion

The aim of this study was to investigate the effects of dietary imbalances of nitrogen and energy on net PDV release of AA and net hepatic fluxes of AA. The nutritional model chosen was original in that the effects of dietary energy and protein imbalance have rarely been studied (Ferrell *et al.*, 1999; Raggio *et al.*, 2006) particularly in the same experiment. Also, instead of supplementing diets with energy or protein, as in previous studies (Blouin *et al.*, 2002; Raggio *et al.*, 2004; Ferrell *et al.*, 1999; Ferrell *et al.*, 2001), we chose to induce a nitrogen or energy deficiency to imbalance the demand for nutrients across the peripheral and splanchnic tissues and observe if these stimulated adaptative metabolic mechanisms. However, a limit to our model was that the E diet also showed a small, but significant, decrease in nitrogen supply (-12%) compared with the C diet because the nitrogen content of the maize ingredient was lower than expected. Even so, the ratio of digested nitrogen to ME still differed (Table 2), so the experimental objectives were not invalidated. In addition, the aim of this work was to substantially alter the net portal appearance of nutrients and assess the impacts on net uptake of AA by the liver. With respect to net nutrient release across the PDV, TAA-N was decreased (-40%) for N compared with C diet, whereas NPA of total volatile fatty acids (VFA) was similar between the two diets (187.4 and 186.4 mmol/h for C and N respectively, Kraft *et al.*, 2008). In contrast, for the E diet, the TAA-N portal appearance was not significantly decreased whereas the NPA of total VFA NPA was (-28% for E vs C , Kraft *et al.*, 2008). This study also used the best available method to measure AA concentration in plasma, which may offer a better reproducibility than other methods (Calder *et al.*, 1999).

Nitrogen balance

A striking result of this study was that the same nitrogen retention was obtained with two diets (C and N) despite differences in the amounts of digested nitrogen. On the other hand, an imbalance in energy supply caused decreased nitrogen retention even though digested nitrogen was intermediate between C and N. These responses in N balance are not those predicted predicted by the INRA feeding system (Jarrige, 1989). Indeed, the nitrogen supply in the N diet should allow a predicted growth of only 50-100 g/d compared with the 200-250 g/d that should be allowed with the C diet. This implies either that the safety margin allowed for in the INRA recommended allowances overestimates the nitrogen requirements of growing sheep (with increased urea-N lost in urine with the C diet, Table 2) or that some 'nitrogen-sparing' mechanisms are at work with the N diet (lower urea-N loss in urine, Table 2). The INRA system would appear to be a reliable predictor, however, because the expected growth for the C diet (250 g/d) was attained in practice (Table 2). Similarly, the INRA feeding system predicted a reduced growth and N balance in sheep fed the E diet, exactly as observed (Table 2), even though N supply would be enough to support higher rates of anabolism were energy not be limited.

The current data suggest, therefore, that adaptations to lowered nutrient supply do occur but the magnitude differs whether either N or E become limiting. In terms of adaptation to N supply, dairy cows fed below maximal levels of metabolisable protein show only small decreases in milk protein output linked to more efficient use of absorbed amino acids (Raggio *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2001). When feed energy supply is deficient, however, additional energy to support anabolism may be provided by two processes: mobilization of fat stores for biological functions and protein accretion (Chowdhury and Orskov, 1997) and/or use of energy provided by the nutrients supplied in a relative excess (AA for example) within the limit of the net energy supplied by the diet for the physiological requirements. This latter possibility is in line with the high urea-N excretion in urine observed in the E diet, were the amino acid carbon utilised for glucose synthesis. Alternatively, the increased urea excretion may result from restricted AA uptake by peripheral tissues when energy was limited (Harris *et al.*, 1992), with the resultant plasma aminoacidaemia triggering hepatic ureagenesis (Black and Griffiths, 1975).

The processes underlying these adaptations observed in the N and E diets are therefore complex, and suggest a shift in the subtle equilibrium regulating the utilization of nutrients between the tissues and organs. They raise the issue of the interactions that occur between nutrient supply and requirement (Oldham, 1984).

Net portal appearance of amino acids

As the nitrogen intake decreased, so did the TAA-N absorbed, as shown by the 40% decrease in NPA of TAA-N for N *vs.* C. The 12% decrease in nitrogen intake in E was not strong enough to induce a significant reduction in NPA for either TAA-N, EAA-N or NEAA-N, but led to a 21% reduction for BCAA-N Similar responses in the NPA of TAA-N to changes in nitrogen intake were found in growing beef steers (Lapierre *et al*, 2000), in dairy cows (Blouin *et al.*, 2002; Raggio *et al.*, 2004; Bach *et al.*, 2000) and in sheep with abomasal infusion of different amounts of casein (El-Kadi *et al.*, 2006). Thus, as regards TAA-N, the NPA seemed to be driven by the nitrogen content in the diet (whatever the ratio nitrogen/energy considered) as modelled by Lapierre *et al.* (2007).

In terms of anabolic potential there are two aspects of AA supply that need to be considered, the total amount and the relative pattern. Deficiency (or excess) of a single AA can distort the overall apparent efficiency of utilisation. In terms of the EAA, alterations in the profile of AA supplied to the liver was assessed based on the contribution of each AA relative to Phe (Figure 1). Only the ratios for His (increased for the N and E diets) and Lys (decreased for the E diet) were altered relative to the C diet, all the other AA maintained a constant relative profile, whatever the diet considered. The decreased NPA for His:Phe in the C diet relative to N and E diets is difficult to explain. However, the decreased Lys NPA relatively to Phe in the N diet may result from decreased supply of AA derived from the microflora (Lys is present in large amounts in ruminal flora; 8% of the TAA and 20% of the EAA, Storm and Orskov, 1983) or a decreased supply of undegraded Lys from the diet.

For the various NEAA, the PDV balance for Glu switched from positive, with both C and E diets, to negative with N diet. This AA is known to be extensively metabolised in the digestive tract (Reeds *et al.*, 2000) notably for the synthesis of Pro and Arg. This observation was consistent with the decrease (P=0.13 for the model, P=0.05 for the contrast) in the arterial concentration of Pro in the N diet compared with C, suggesting a particular demand for this AA by the body. Lastly, the NPA of Gly was lower with both N and E diets compared with C. An intense utilization of Gly by the PDV during energy underfeeding has already been shown in ruminants (Noziere *et al.*, 1999) and Gly is involved in sulphur amino acid metabolism, both *via* glutathione synthesis (Reeds *et al.*, 1997) and in the methionine cycle (Lobley *et al.*, 1996). Nonetheless, utilisation of Glu and Cys (the other two AA used for the synthesis of glutathione) was not appreciably increased by the PDV in the E diet.

In summary, in this study no marked adaptation of digestive tract metabolism of AA was observed and, instead, the decreased NPA of TAA-N was driven mainly by the nitrogen supply within each diet.

Net liver balance

Overall TAA-N

Like the PDV, the liver also responded to the TAA-N supply. The net hepatic removal of TAA-N remained constant regardless of the diet (72-76% of the net PDV release (Table 5)). This is similar to previous reports where the level of intake was increased above maintenance in steers (Lapierre *et al.*, 2000)) or when AA were infused in the mesenteric vein of sheep (Lobley *et al.*, 1996) or sheep were nitrogen supplemented (Krehbiel and Ferrell, 1999). Whether the response in net hepatic extraction of TAA is linearly correlated to the TAA-N inflow to the liver or to the net PDV uptake remains a matter of debate (Blouin *et al.*, 2002; Lobley *et al.*, 2003). However, the proportion of NPA of TAA-N that is then removed by the liver does alter when metabolisable protein supplementation is associated with a high demand for AA by peripheral tissues, as occurs during lactation (Blouin *et al.*, 2003; Reynolds, 2006) or somatotropin infusion (Bruckental *et al.*, 1997)). The altered AA demand by the peripheral tissues in our growing sheep may not be great enough to substantially alter the proportion of TAA-N removed by the liver.

The decreased hepatic extraction rate of TAA-N (relative to hepatic influx) observed with the N diet (Table 6) indicates the involvement of liver metabolism in 'AA-N-sparing' mechanisms Part of this adaptation involves the NEAA-N as their hepatic extraction rate, relative to hepatic influx, decreased for the N diet (Table 6), while the fractional extraction of both BCAA-N and EAA-N remained constant across the three diets. This was not surprising for the BCAA-N, whose hepatic removal is low and only weakly responsive to the nutrient supply (Lapierre *et al.*, 2000; Raggio *et al.*, 2004), suggesting low but fixed hepatic requirements for BCAA, possibly to sustain protein synthesis. The synthesis of NEAA by the liver is also a way to preserve nitrogen for physiological anabolic functions. This higher synthesis is also reveled by the higher plasma concentration of Ala and Gly (Table 4).

The hepatic extraction rate of TAA-N, NEAA-N, EAA-N and BCAA-N relative to hepatic influx was not modified with the E diet (Table 6). However, while the net hepatic uptake of NEAA was also not different between C and E, it tended to decrease (-25%) for EAA. Consequently, and also as concluded at the PDV level, this apparent "mass action" effect for TAA-N masked diverse metabolic adaptations of the liver metabolism linked to specific alterations in the net uptake of individual AA (Guerino *et al.*, 1991). Such alteration of net uptake and/or extraction rate may be

explained by the various fates of AA within the liver, which include not only oxidation and ureagenesis but also protein synthesis (export and endogenous) (Connell *et al.*, 1997), protein breakdown (Attaix *et al.*, 2005), gluconeogenesis (Reynolds, 1992) and synthesis of specific metabolites (glutathione, hippurate, etc.). Regulation of the two major pathways of AA utilization in the liver (protein turnover and oxidation) will be specifically discussed.

Specific AA

- Protein synthesis

The net EAA-N uptake by the liver was decreased with both N and E diets and this was also true for Phe and Met. The extraction rate, relative to influx, of Phe by the liver was also decreased with the N diet. The other EAA followed the same pattern of change. A decreased net uptake in all the EAA may reflect a decreased net synthesis of endogenous and/or export proteins (the latter are rich in Phe and Met (Ruot, 2001)) or reduced AA oxidation. In the same study the total export proteins (in fractional and absolute terms) were decreased in the E but not in the N diet (Savary-Auzeloux *et al.*, 2007). The calculated fraction of net hepatic removal of Phe and Met required to support export protein synthesis was 15-20% and 10% respectively (based on Lobley and Milano, 1997 and Savary-Auzeloux *et al*, 2007). The decreased export protein synthesis in the liver can explain, in part at least, the decreased uptake with the E diet, whereas other regulatory mechanisms must be involved to explain the lower removal for the N diet, with probable involvement of altered oxidation and ureagenesis.

- Ureagenesis and catabolism of AA

The N diet induced a 37% reduced urea-N net liver release compared with C and E. Because of technical difficulties with ammonia-N determination, it was impossible to determine definitively whether this reduction was due to a reduced ammonia-N net release by the PDV or to lowered AA catabolism. Nonetheless, the reduced NPA for all AA and smaller hepatic extraction rate for Phe suggests a decreased AA catabolism, particularly as export protein synthesis remained unaltered (Savary-Auzeloux *et al*, 2007). This would agree with observations in lactating cows where Phe oxidation was reduced as metabolisable protein supply was decreased (Raggio *et al.*, 2004).

The hepatic uptake of the NEAA (*i.e.* Ala, Ser, Asn, Gln and Tyr) were particularly reduced with the N diet (-43%, C *vs.* N), and this would contribute to the lowered ureagenesis. Indeed, this need to dispose of less NEAA-N would reduce urea production by 2.4 gN/d, approximately 80% of the reduction observed. The increased release of Glu and decreased uptake of Asn, which both participate in Asp synthesis (*via* transamination for Glu and hydrolysis of Asn to Asp by

asparaginase), also support the hypothesis that ureagenesis was decreased. Ala, and to a lesser extent Ser, presented a lower net hepatic uptake and are both well-known as gluconeogenic precursors in sheep (Wolff and Bergman, 1972). This suggests a decreased gluconeogenesis from Ala and Ser with the N diet.

The E diet differed from the N diet in that neither the hepatic ureagenesis nor the NEAA net liver uptake was decreased (P=0.39). The sustained ureagenesis may be due partly to ammonia detoxification and to the catabolism of AA. Asp and Glu, which are both involved in urea cycle, were greater utilised by the liver in the E diet (presumably for ureagenesis). However, Ala and Ser, whose net uptake by the liver was decreased, did not fit this pattern.

Different mechanisms of adaptation of the hepatic metabolism to the N and E diets seem to be in play. With the E diet, net hepatic removal of TAA-N was maintained but less was directed to support export protein synthesis and so ureagenesis arising from AA catabolism was probably increased compared with the C diet. In contrast, for the N diet there occurred a specific reduction in the utilisation of NEAA and Phe by the liver coupled with reduced ureagenesis, possibly linked to decreased utilisation of carbon chains from AA (in particular Ala and Ser), to maintain post-hepatic supply of EAA similar to the C diet. .

Net Splanchnic appearance compared with nitrogen retention

The splanchnic net appearance of TAA-N was similar in all three diets. Differences in the NEAA/EAA released can be explained in the light of the requirement for total AA and specific AA in the peripheral tissues calculated from the nitrogen balances measured in the same animals.

First, net splanchnic flux of NEAA-N was not significantly different from zero. Thus, EAA-N net splanchnic flux accounted predominantly for nitrogen retention and catabolism at the peripheral level. Each individual EAA released by the TSP was expressed as protein equivalent and these data compared with the overall protein retention calculated using the nitrogen balances measured in the same animals (Table 7). These calculations were based on published values for the mean AA composition of the lamb carcass (MacRae *et al.* 1997).

BCAA and Lys were released in excess of the requirement for protein deposition (Table 7). These results are consistent with data obtained in dairy cows where the net production of proteins is easier to measure in milk (Blouin *et al.*, 2002; Raggio *et al.*, 2004). The net TSP supply of BCAA and Lys was higher than the amounts released in the milk proteins, suggesting that these AA were utilized (and oxidized (Argiles *et al.*, 2001)) elsewhere in the body (including the udder and muscle in lactating cows). Oxidation of BCAA and Lys within skeletal muscles is hence highly probable

within the current study. The lower net TSP release of these four AA in the N diet, coupled with the similar N balance to the C diet, suggests that less of these AA were oxidized by the peripheral tissues and is probably a response to the lower supply of nitrogen in the diet.

On the other hand, His and Phe net splanchnic release were below the requirements calculated to sustain whole body anabolism. This is inconsistent with other data from lactating cows where the net TSP supply of His and Phe matched the amounts secreted in milk proteins (Blouin *et al.*, 2002; Lobley and Lapierre, 2003). This suggests that other sources for those two AA are required to sustain growth. An important store of His is the dipeptide carnosine within muscle and is available to support anabolism in both ruminants and pigs (Heger *et al.*, 2007; Savary-Auzeloux *et al.*, 2008). Changes in muscle carnosine concentrations were not monitored in the present study and are not taken into account in the calculations presented in Table 7. Apparent deficiencies in TSP supply of free Phe, along with other AA, can be met from export proteins derived from liver and that can be degraded within muscle (Maxwell *et al.*, 1981). Albumin, in particular, has approximately twice the content of Phe per g protein as does muscle (Ruot, 2001) and is therefore a rich source of alternative supply (Volpi *et al.*, 1996). Consequently, the potential net protein gain that could be supported by tissue use of AA from export protein have been estimated based on their absolute synthesis rates measured in the same study (14.0, 12.8 and 11.2 g/d for C, N and E diets respectively; Savary-Auzeloux *et al.*, 2007) and their AA composition (Ruot, 2001) (Table 7). When Phe (and other AA) from export proteins are added to the TSP supply of free AA then the total is close to that needed to support the observed N balance (Table 7). Hence, in fattening lambs, such as these, export proteins can form an important part of the supply to support lean tissue growth (56-100% in the case of Phe). This contrasts with observations in lactating dairy cows (Blouin *et al.*, 2002; Raggio *et al.*, 2004) where plasma free AA released from the TSP were sufficient to support mammary gland uptake and there was no need to invoke use of export protein. These differences probably reflect the difference in anabolic drive between growing and lactating animals where, for the former, the lower requirement can be met from the limited amount of export protein produced from the liver daily but this would represent only a minor contribution to the needs of the high-yielding dairy cow.

Finally, the net TSP release of AA either in free form or combined with that from export protein was higher for the E diet compared with the N diet. Despite this, the N retention was lower and, consequently, the AA supply to the muscle alone was not sufficient alone to determine growth, rather it is probable that the decreased energy supply with the E diet may have limit anabolic mechanisms in peripheral tissues. This may have been exacerbated by utilisation of NEAA carbon across the liver as precursor for gluconeogenesis (as shown by the increased ureagenesis observed

at the whole body level). The gluconeogenic needs of the sheep on the E diet may have directed certain AA towards the liver and limited the utilisation of AA for protein anabolism.

Conclusion

Why is the nitrogen spared in the N and not in the E diet? In the case of the nitrogen-imbalanced diet, the AA-N sparing mechanisms have two possible origins within the liver: (i) a decreased oxidation of NEAA and (ii) a sustained hepatic export protein synthesis which preserves the AA from oxidation processes. Consequently, free AA and protein-bound AA may jointly sustain protein anabolism in the peripheral tissues when energy is not limiting.

On the contrary, in the E diet, the AA were not used for anabolic purposes and instead were oxidized, as shown by a lower nitrogen balance. In the liver, a decreased export protein synthesis associated with a sustained ureagenesis (linked partly to a constant catabolism of the AA to support hepatic gluconeogenesis) while, in peripheral tissues, the AA may have been used as energy sources. The processes jointly would decrease the overall AA available for anabolism in the peripheral tissues. In addition, the energy limitation may diminish the anabolic processes by, for example, inhibiting protein synthesis.

Acknowledgements and financial support

The authors thank P. Gaydier and D. Thomas for their excellent help with surgical preparations and animal care, C. Cossoul and A.S. Bage for invaluable technical support, and A.G. Calder, Rowett Research Institute (UK), for help with isotopic enrichment adjustments.Lastly, the authors thank G. Lobley for his invaluable help and support for the critical review of this manuscript.

This work was supported by a grant from the INRA Research Institute. GK received a doctoral scholarship from “Region Auvergne” and INRA.
Since the entire work was funded by INRA, there is no conflict of interest.

Authors’ contribution

I Ortigues-Marty and I Savary-Auzeloux had the initial idea for the study, were responsible for experimental management, and critically reviewed the manuscript for scientific content. T Jarde was responsible for the analysis of some data. G Kraft and to a lesser extent I Savary-Auzeloux were responsible for data analysis, interpretation, statistical analysis and write-up. B Bequette contributed to data analysis and critical review of the manuscript. D Dardevet and D Rémond were responsible for surgery, and contributed to the critical review of the manuscript.

References

Argiles JM, Busquets S and Lopez-Soriano 2001. Metabolic interrelationships between liver and skeletal muscle in pathological states. Life Science 69, 1345-1361.

Attaix D, Rémond D and Savary-Auzeloux IC 2005. Protein metabolism and turnover. In Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. pp 373-397 (J Dijksta, Forbes JM and France J eds) CABI Publishing, Wallingford, UK.

Bach A, Huntington GB, Calsamiglia S and Stern MD 2000. Nitrogen metabolism of early lactation cows fed diets with two different levels of protein and different amino acid profiles. Journal of Dairy Science 83, 2585-2595.

Barnes RJ, Comline RS and Dobson A 1986. The Control of splanchnic blood flow. In Control of Digestion and Metabolism in Ruminants pp. 41-59 (Milligan L P, Grovum W L, and Dobson A eds). Engelwood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Black JL and Griffiths DA 1975. Effects of live weight and energy intake on nitrogen balance and total N requirements of lambs. British Journal of Nutrition 33, 399-413.

Blouin JP, Bernier JF, Reynolds CK, Lobley GE, Dubreuil P and Lapierre H 2002. Effect of supply of metabolizable protein on splanchnic fluxes of nutrients and hormones in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 85, 2618-2630.

Bruckental I, Huntington GB, Baer CK, and Erdman RA 1997. The effect of abomasal infusion of casein and recombinant somatotropin hormone injection on nitrogen balance and amino acid fluxes in portal-drained viscera and net hepatic and total splanchnic blood in Holstein steers. Journal of Animal Science 75, 1119-1129.

Burrin DG, Ferrell CL, Eisemann JH and Britton RA 1991. Level of nutrition and splanchnic metabolite flux in young lambs. Journal of Animal Science 69, 1082-1091.

Bush JA, Burrin DG, Suryawan A, O'Connor PMJ, Nguyen HV, Reeds PJ, Steele NC, Van Goudoever JB and Davis TA 2003. Somatotropin-induced protein anabolism in hindquarters and portal-drained viscera of growing pigs. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism 284, E302-E312.

Calder AG and Smith A 1988. Stable isotope ratio analysis of leucine and ketoisocaproic acid in blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. Use of tertiary butyldimethylsilyl derivatives. Rapid Communication in Mass Spectrometry 2, 14-16.

Calder AG, Garden KE, Anderson SE and Lobley GE 1999. Quantitation of blood and plasma amino acids using isotope dilution electron impact gas chromatography/mass spectrometry with U-(13)C amino acids as internal standards. Rapid Communication in Mass Spectrometry 13, 2080-2083.

Castillo AR, Kebreab E, Beever DE, Barbi JH, Sutton JD, Kirby HC, and France J 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. Journal of Animal Science 79, 247-253.

Chowdhury SA and Orskov ER 1997. Protein energy relationships with particular references to energy undernutrition: A review. Small Ruminant Research 26, 1-7.

Connell A, Calder AG, Anderson SE and Lobley GE 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. British Journal of Nutrition 77, 255-271.

El-Kadi SW, Baldwin RL, Sunny NE, Owens SL and Bequette B J 2006. Intestinal protein supply alters amino acid, but not glucose, metabolism by the sheep gastrointestinal tract. Journal of Nutrition 136, 1261-1269.

Ferrell CL, Kreikemeier KK and Freetly HC 1999. The effect of supplemental energy, nitrogen, and protein on feed intake, digestibility, and nitrogen flux across the gut and liver in sheep fed low-quality forage. Journal of Animal Science 77, 3353-3364.

Ferrell CL, Freetly HC, Goetsch AL and Kreikemeier KK 2001. The effect of dietary nitrogen and protein on feed intake, nutrient digestibility, and nitrogen flux across the portal-drained viscera and liver of sheep consuming high-concentrate diets ad libitum. Journal of Animal Science 79, 1322-1328.

Guerino F, Huntington GB and Erdman RA 1991. The net portal and hepatic flux of metabolites and oxygen consumption in growing beef steers given postruminal casein. Journal of Animal Science 69, 387-395.

Hanigan MD 2005. Quantitative aspects of ruminant splanchnic metabolism as related to predicting animal performance. Animal Science 80, 23-32.

Harris PM, Skene PA, Buchan V, Milne E, Calder AG, Anderson SE, Connell A and Lobley GE 1992. Effet of food intake on hind-limb and whole body protein metabolism in young growing sheep: chronic studies based on arterio-venous techniques. British Journal of Nutrition 68, 389-407

Heger J, Patras P, Nitrayova S, Dolesova P and Sommer A 2007. Histidine maintenance requirement and efficiency of its utilization in young pigs. Archives of Animal Nutrition 61, 179-188.

Jarrige R 1989. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and Feed Tables. Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique, pp. 389

Kraft G, Gruffat D, Dardevet D, Rémond D, Ortigues-Marty I and Savary-Auzeloux I. 2008. Protein synthesis in the liver is differently altered by the dietary supply of nitrogen/energy ratio in lambs. In 59th Annual meeting of the european association for animal production, Vilnius, Lithuania pp226 (Juskiene V, ed) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands..

Krehbiel CR and Ferrell CL 1999. Effects of increasing ruminally degraded nitrogen and abomasal casein infusion on net portal flux of nutrients in yearling heifers consuming a high-grain diet. Journal of Animal Science 77, 1295-1305.

Lapierre H, Bernier JF, Dubreuil P, Reynolds CK, Farmer C, Ouellet DR and Lobley GE 2000. The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. Journal of Animal Science 78, 1084-1099.

Lapierre H, Vernet J, Martineau R, Sauvant D, Nozière P and Ortigues-Marty I (2007) Portal absorption of N: partition between amino acids and ammonia in relation with nitrogen intake in ruminants. In Energy and Protein Metabolism and Nutrition. Vichy, France. pp 579-580 (I Ortigues-Marty, ed) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Lobley GE 1994. Amino acid and protein metabolism in the whole body and individual tissues of ruminant. In Principles of Protein Nutrition of Ruminants, pp 147-178 (JM Asplund, Ed). London CRC Press.

Lobley GE, Connell A and Revell D 1996. The importance of transmethylation reactions to methionine metabolism in sheep: effects of supplementation with creatine and choline. British Journal of Nutrition 75, 47-56.

Lobley GE, Connell A, Revell DK, Bequette BJ, Brown DS and Calder AG 1996. Splanchnic-bed transfers of amino acids in sheep blood and plasma, as monitored through use of a multiple U-13C-labelled amino acid mixture. British Journal of Nutrition 75, 217-35.

Lobley GE and Milano GD 1997. Regulation of hepatic nitrogen metabolism in ruminants. Proceedings of the Nutrition Society 56, 547-563.

Lobley GE, Shen X, Le G, Bremner DM, Milne E, Calder AG, Anderson SE and Dennison N 2003. Oxidation of essential amino acids by the ovine gastrointestinal tract. British Journal of Nutrition 89, 617-630.

Lobley GE and Lapierre H 2003. Post-absorptive metabolism of amino acids. In Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. Rostock-Warnemünde, Germany pp 737-756

(WB Souffrant and CC Metges, eds) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Lobley GE 2003. Protein turnover - what does it mean for animal production? Canadian Journal of Animal Science 83, 327-340.

Lobley GE 2007. Protein-energy interaction: horizontal aspects. In Energy and Protein Metabolism and Nutrition Vichy, France. pp 445-461 (I Ortigues-Marty, ed) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

MacRae JC, Walker WA, Brown D and Lobley GE 1993. Accretion of total protein and individual amino acids by organs and tissues of growing lambs and the ability of nitrogen balance techniques to quantitate protein retention. Animal Production 57, 237-245.

MacRae JC, Bruce LA, Brown DS, Farningham DA and Franklin M 1997. Absorption of amino acids from the intestine and their net flux across the mesenteric- and portal-drained viscera of lambs. Journal of Animal Science 75, 3307-3314.

Maxwell, J.L., L. Terracio, T.K. Borg, J.W. Baynes, and S.R. Thorpe. 1990. A fluorescent residualizing label for studies on protein uptake and catabolism in vivo and in vitro. Biochem. J. 267:155-162.

Metcalf JA, Beever DE, Sutton JD, Wray-Cahen D, Evans RT, Humphries DJ, Backwell FR, Bequette BJ and MacRae JC 1994. The effect of supplementary protein on in vivo metabolism of the mammary gland in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 77, 1816-1827.

Milano GD 1997. Liver N transactions in sheep (Ovis aries). PhD Thesis, University of Aberdeen.

Muting D, Heinze J, Reikowski J, Betsien GSM and Schmidt FH 1968. Enzymatic ammonia determinations in the blood and cerebrospinal fluid of healthy persons. Clinica Chimica Acta 19, 391-395.

Nieto R and Lobley GE 1999. Integration of protein metabolism within the whole body and between organs In Protein metabolism and nutrition. Aberdeen, United Kingdom pp 69-99 (GE Lobley, A White and MacRae JC eds) EAAP Publication No.96 Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.

Noziere P, Rémond D, Bernard L and Doreau M 1999. Effect of underfeeding on portal net fluxes of glucose, lactate, ammonia, urea and amino acids in ewes. South African Journal of Animal Science 29, 236-237.

Oldham JD 1984. Protein-energy interrelationships in dairy cows. Journal of Dairy Science 67, 1090-1114.

Ormsby AA 1942. A direct colorimetric method for the determination of urea in blood in blood and urine. Journal of Biological Chemistry 146, 595-604.

Ortigues-Marty I, Durand D and Lefaivre J 1994. Use of para-amino hippuric acid to measure blood flows through portal-drained-viscera, liver and hindquarters in sheep. Annales de Zootechnie 122, 299-308.

Ortigues-Marty I and Doreau M 1995. Responses of the splanchnic tissues of ruminants to changes in intake: absorption of digestion end products, tissue mass, metabolic activity and implications to whole animal energy metabolism Journal of Agricultural Science 44, 321-346.

Pacheco D, Schwab CG, Berthiaume R, Raggio G and Lapierre H 2006. Comparison of net portal absorption with predicted flow of digestible amino acids: scope for improving current models? Journal of Dairy Science 89, 4747-4757.

Raggio G, Pacheco D, Berthiaume R, Lobley GE, Pellerin D, Allard G, Dubreuil P and Lapierre H 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 87, 3461-3472.

Raggio G, Lemosquet S, Lobley GE, Rulquin H and Lapierre H 2006. Effect of casein and propionate supply on mammary protein metabolism in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 89, 4340-4351

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F, Wykes L, Henry J and Frazer ME 1997. Enteral glutamate

is the preferential source for mucosal glutathione synthesis in fed piglets. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism 273, E408-E415.

Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B and Jahoor F 2000. Intestinal Glutamate Metabolism. Journal of Nutrition 130, 978S-982S.

Reynolds CK 1992. Metabolism of nitrogenous compounds by ruminant liver. Journal of Nutrition 122, 850-854.

Reynolds CK 2006. Splanchnic amino acid metabolisms in ruminants. In: Ruminant Physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress pp. 225-248 (Sejrsen K, Hvelplund T and Nielsen M.O, eds). Wageningen Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.

Rigout S, Hurtaud C, Lemosquet S, Bach A and Rulquin H 2003. Lactational effect of propionic acid and duodenal glucose in cows. Journal of Dairy Science 86, 243-253.

Ruot B (2001) Synthèse des protéines de la réaction inflammatoire en réponse à l'infection. Déterminisme de l'hypoalbuminémie. PhD Thesis Université d'Auvergne, France

Savary-Auzeloux I, Kraft G and Ortigues-Marty I 2007. Can liver protein synthesis be affected by an imbalanced dietary supply of energy or nitrogen in growing lambs? In Energy and Protein Metabolism and Nutrition Vichy, France. pp 351-352 (I Ortigues-Marty, ed) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands,.

Savary-Auzeloux I, Majdoub L, LeFloc'h N and Ortigues-Marty I 2003. Effects of intraruminal propionate supplementation on nitrogen utilization by the portal-drained viscera, the liver and the hindlimb in lambs fed frozen rye grass. British Journal of Nutrition 90, 939-952.

Savary-Auzeloux I, Durand D, Gruffat D, Bauchard D, Ortigues-Marty I 2008. Food restriction and refeeding in lambs influence muscle antioxidant status. Animal 2, 738-745.

Storm E and Orskov ER 1983. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. British Journal of Nutrition 50, 463-470.

Vernet J, Noziere P, Sauvant D, Leger S and Ortigues-Marty I 2005. Regulation of hepatic blood flow by feeding conditions in sheep: a meta-analysis. In: Advanced nutrition and feeding strategies to improve sheep and goat production.Options Méditerranéennes No 74 pp. 435-440 (A Mougou, B Hervieu eds), Paris, France : IAM

Volpi, E., P. Lucidi, G. Cruciani, F. Monacchia, G. Reboldi, P. Brunetti, G.B. Bolli, and P. De Feo. 1996. Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. Diabetes 45:1245-1252.

Wolff JE and Bergman EN 1972. Gluconeogenesis from plasma amino acids in fed sheep. American Journal of Physiology 223, 455-460.

Table 1: a) Ingredient and chemical composition of the concentrates (#1, #2 and #3) and forage used in the three experimental diets, and b) Dry matter, Protein Digestible in the Intestine and Metabolizable Energy allowances of the three diets.

a)	Concentrate			Forage
	#1	#2	#3	(Hay)
Ingredients (g/kg of DM (for the concentrate)				
Maize	0	120	560	
Corn starch	545	540	0	
Corn gluten meal	100	40	100	
Soya bean meal 48%	100	40	100	
Sunflower oil	15	20	0	
Rapeseed meal	70	70	70	
Barley	70	70	70	
Molasses	40	40	40	
Bicarbonate	20	20	20	
Minerals & vitamin mix *	40	40	40	
Chemical composition (g/kg DM)				
Ash	74	78	75	93
CP	136	102	154	82
Cellulose	34	47	37	308
Starch	536	610	487	
Lipid	20	33	23	
OMd (%) (estimated†)	88.1	88.5	85.9	56.0
ME MJ/kg DM (estimated)	13.1	13.2	12.7	8.1

b)	Diet		
	C	N	E
DM allowances ($g/d/kgBW^{0.75}$)			
Forage	22.1	22.4	18.3
Concentrate	51.5	51.9	43.0
Total	73.6	74.3	61.3
PDI allowances $g/d/kgBW^{0.75}$	6.3	4.8	6
ME allowances $MJ/d/kgBW^{0.75}$	0.85	0.85	0.7

DM, Dry Matter ; CP, Crude Protein ; OMd, Organic Matter digestibility ; ME, Metabolisable Energy; PDI, Protein Digestible in the Intestine

* Aliment Mineral poudre 2%, Agro-Base Bourg-en-Bresse, France. (22% Ca, 7.3% Na, 1% Mg, 0.99% S, Fe, Zn, Mn, I, Co, Se and Vitamins A, D, E, B1, B2 B6, B12, PP, K3, folates)

† Estimated from Institut National de Recherches Agronomiques feeding system (Jarrige, 1989)

Table 2: Live weight, daily gain, intake, digestibility and nitrogen balance of growing lambs fed the Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) and Energy-imbalanced (E) diets (*n*=6).

	Diet					Contrast	
	C	N	E	SEM	*P*	C *vs.* N	C *vs.* E
Intake							
Total DM, kg/d	1.22	1.21	0.99	0.011	<0.001	0.86	<0.001
Hay	0.365	0.367	0.295	3.61	<0.001	0.73	<0.001
Concentrate #1	0.853						
Concentrate #2		0.851					
Concentrate #3			0.693				
Apparent DM digestibility of diets, %	75.1	76.1	75.0	0.41	0.18	0.13	0.90
Ingested metabolisable energy, MJ/d	14.1	14.2	11.2	0.14	<0.001	0.52	<0.001
Ingested nitrogen, g/d	23.3	18.7	20.4	0.80	0.01	0.004	0.04
Digested nitrogen, g/d	16.2	12.4	14.7	0.65	0.009	0.003	0.13
Apparent nitrogen digestibility, %	69.7	66.3	71.7	0.89	0.01	0.03	0.15
Nitrogen digested / metabolisable energy intake (g/MJ)	1.15	0.87	1.31	0.05	0.001	0.001	0.04
Live weight							
Average live weight, kg	42.2	41.7	40.7	0.30	0.02	0.32	0.01
Average daily gain, kg/d	0.265	0.258	0.191	0.02	0.07	0.80	0.04
Nitrogen balance							
Faecal nitrogen, g/d	7.1	6.3	5.7	0.25	0.02	0.06	0.01
Urinary nitrogen, g/d	8.1	5.1	9.7	0.28	0.001	0.001	0.01
Urinary urea nitrogen, g/d	5.6	2.9	7.3	0.37	<0.001	0.001	0.01
Retained nitrogen, g/d	8.1	7.3	5.0	0.51	0.01	0.28	0.003
Retained nitrogen, (% of digested nitrogen)	49.9	59.0	33.1	2.08	<0.001	0.01	<0.001

Table 3: Haematocrit and blood and plasma flows in the portal vein of growing lambs (*n*=6) fed the Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) and Energy-imbalanced (E) diets

	Diet					Contrast	
	C	N	E	SEM	*P*	C *vs.* N	C *vs.* E
Haematocrit (%)	30.0	29.9	30.2	0.2	0.61	0.62	0.62
Blood flow (l/h)	125.3	116.9	106.4	1.99	0.001	0.02	<0.001
Plasma flow (l/h)	88.7	82.0	73.6	1.44	<0.001	0.01	<0.001

Table 4: Arterial plasma concentrations of urea and amino acids (µmol/l) in growing lambs (*n*=6) fed the Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) and Energy-imbalanced (E) diets

		Diet					Contrast	
Metabolite µmol/l		C	N	E	SEM	*P*	C *vs.* N	C *vs.* E
Urea		3278	1667	4034	255	0.001	0.002	0.07
TAA		2466	2388	2371	58.8	0.50	0.38	0.29
NEAA		1409	1476	1391	38.6	0.31	0.25	0.76
EAA		1058	912	980	29.4	0.02	0.008	0.10
BCAA		478	396	442	11.8	0.004	0.001	0.06
EAA	Histidine	121.0	108.6	108.1	5.12	0.19	0.13	0.11
	Isoleucine	91.5	80.9	86.0	2.68	0.06	0.02	0.19
	Leucine	201.4	167.3	193.4	4.59	0.002	0.001	0.25
	Lysine	135.6	127.9	136.6	9.89	0.80	0.60	0.95
	Methionine	38.7	34.1	35.1	2.00	0.29	0.15	0.24
	Phenylalanine	93.1	89.6	88.9	2.96	0.58	0.43	0.35
	Threonine	191.1	155.6	169.0	19.43	0.46	0.23	0.44
	Valine	185.3	148.2	162.9	5.98	0.01	0.002	0.03
NEAA	Alanine	202.8	224.7	202.5	6.46	0.07	0.04	0.96
	Asparagine	60.6	55.3	60.9	2.22	0.19	0.13	0.93
	Aspartate	13.7	9.4	10.9	1.47	0.17	0.07	0.22
	Cysteine	76.1	70.9	68.1	3.89	0.38	0.37	0.18
	Glutamate	140.8	131.9	126.8	10.43	0.65	0.56	0.37
	Glutamine	170.9	171.2	175.7	6.87	0.86	0.97	0.63
	Glycine	411.1	489.9	424.3	19.10	0.04	0.02	0.63
	Proline	143.1	131.9	140.0	3.51	0.13	0.05	0.55
	Serine	77.5	77.5	77.1	3.20	1.00	1.00	0.95
	Tyrosine	112.3	107.7	105.2	4.34	0.53	0.48	0.28

.
TAA: total amino acids (AA), EAA: essential AA, NEAA: non-essential AA, BCAA: branched-chain AA

Table 5: Net splanchnic fluxes of Urea-N, Total, Non-Essential, Essential and Branched-Chained Amino Acid Nitrogen (respectively TAA-N, NEAA-N, EAA-N and BCAA-N) (expressed in g nitrogen/d) and individual amino acids (expressed in mmol/h) in growing lambs (*n*=6) fed the Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) and Energy-imbalanced (E) diets

			Diet					Contrast	
		Tissue	C	N	E	SEM	*P*	C *vs.* N	C *vs.* E
Net Flux, g nitrogen /d									
Urea-N		PDV	-5.7	-4.7	-5.4	0.47	0.33	0.16	0.58
		Liver	10.9	6.9	11.6	0.46	<0.001	<0.001	0.35
		TSP	5.2	2.2	6.2	0.38	<0.001	0.001	0.09
TAA-N		PDV	12.4	7.4	10.7	0.91	0.01	0.005	0.23
		Liver	-9.0	-5.5	-8.1	0.55	0.005	0.002	0.24
		TSP	3.3	1.9	2.6	0.85	0.52	0.27	0.57
NEAA-N		PDV	5.55	2.50	4.61	0.50	0.01	0.002	0.22
		Liver	-5.42	-2.95	-5.13	0.44	0.01	0.004	0.66
		TSP	0.13	-0.45	-0.52	0.37	0.44	0.30	0.25
EAA-N		PDV	6.83	4.89	6.08	0.57	0.11	0.04	0.38
		Liver	-3.63	-2.54	-2.92	0.27	0.05	0.02	0.10
		TSP	3.21	2.34	3.16	0.56	0.50	0.31	0.95
BCAA-N		PDV	2.66	1.92	2.11	0.15	0.02	0.01	0.03
		Liver	-0.45	-0.43	-0.28	0.10	0.44	0.88	0.25
		TSP	2.21	1.49	1.83	0.18	0.07	0.02	0.18
Net flux of individual AA, mmol/h									
EAA	Histidine	PDV	1.09	1.40	1.47	0.12	0.12	0.11	0.06
		Liver	-1.47	-1.12	-1.45	0.18	0.34	0.20	0.96
		TSP	-0.38	0.28	0.02	0.15	0.04	0.01	0.10
	Isoleucine	PDV	2.17	1.50	1.74	0.15	0.04	0.01	0.08
		Liver	-0.25	-0.24	-0.23	0.09	0.98	0.96	0.86
		TSP	1.92	1.25	1.51	0.18	0.08	0.03	0.15
	Leucine	PDV	3.53	2.62	2.82	0.22	0.05	0.02	0.06
		Liver	-0.68	-0.68	-0.43	0.12	0.34	0.99	0.21
		TSP	2.85	1.94	2.39	0.22	0.06	0.02	0.19
	Lysine	PDV	2.39	0.77	1.92	0.36	0.03	0.01	0.38
		Liver	-0.73	-0.29	-0.45	0.13	0.13	0.05	0.18
		TSP	1.66	0.48	1.47	0.46	0.21	0.10	0.77
	Methionine	PDV	0.70	0.55	0.62	0.08	0.47	0.23	0.56
		Liver	-0.50	-0.37	-0.29	0.05	0.04	0.08	0.01
		TSP	0.20	0.19	0.34	0.05	0.14	0.87	0.10
	Phenylalanine	PDV	1.91	1.56	1.67	0.12	0.16	0.07	0.18
		Liver	-2.02	-1.52	-1.62	0.11	0.03	0.01	0.03
		TSP	-0.11	0.04	0.05	0.07	0.24	0.16	0.14
	Threonine	PDV	1.77	0.97	1.28	0.22	0.08	0.03	0.15
		Liver	-1.07	-0.45	-0.70	0.26	0.29	0.13	0.35
		TSP	0.70	0.52	0.57	0.19	0.80	0.53	0.66
	Valine	PDV	2.21	1.59	1.71	0.11	0.01	0.00	0.01
		Liver	-0.41	-0.35	-0.17	0.11	0.33	0.72	0.17
		TSP	1.80	1.24	1.53	0.17	0.13	0.05	0.31

NEAA	Alanine	PDV	4.59	3.15	3.63	0.27	0.01	0.01	0.04
		Liver	-5.35	-3.68	-3.92	0.22	0.001	0.001	0.002
		TSP	-0.76	-0.53	-0.29	0.18	0.25	0.40	0.11
	Asparagine	PDV	1.43	1.04	1.38	0.10	0.05	0.02	0.72
		Liver	-1.12	-0.69	-1.11	0.11	0.04	0.03	0.92
		TSP	0.30	0.35	0.27	0.10	0.82	0.73	0.80
	Aspartate	PDV	0.47	0.30	0.37	0.06	0.17	0.07	0.25
		Liver	0.00	-0.01	-0.12	0.04	0.08	0.80	0.04
		TSP	0.47	0.29	0.25	0.06	0.06	0.06	0.03
	Cysteine	PDV	-0.12	-0.04	0.20	0.18	0.46	0.78	0.25
		Liver	-0.45	-0.10	-0.46	0.12	0.11	0.07	0.92
		TSP	-0.57	-0.15	-0.26	0.14	0.16	0.07	0.17
	Glutamate	PDV	0.55	-0.22	0.55	0.17	0.02	0.01	0.99
		Liver	2.16	3.35	1.30	0.30	0.00	0.02	0.08
		TSP	2.70	3.12	1.84	0.28	0.03	0.32	0.06
	Glutamine	PDV	-0.04	-0.99	0.20	0.41	0.16	0.14	0.69
		Liver	-1.62	-0.42	-1.84	0.43	0.10	0.08	0.73
		TSP	-1.66	-1.41	-1.64	0.14	0.43	0.25	0.94
	Glycine	PDV	1.98	1.37	0.83	0.33	0.10	0.22	0.04
		Liver	-2.49	-2.80	-2.70	0.33	0.81	0.54	0.67
		TSP	-0.51	-1.43	-1.87	0.28	0.03	0.05	0.01
	Proline	PDV	2.29	1.35	1.79	0.15	0.01	0.002	0.04
		Liver	-0.95	-0.67	-0.76	0.14	0.38	0.18	0.34
		TSP	1.34	0.68	1.03	0.13	0.02	0.01	0.13
	Serine	PDV	2.41	1.69	1.89	0.15	0.03	0.01	0.04
		Liver	-1.79	-1.27	-1.35	0.05	<0.001	<0.001	<0.001
		TSP	0.62	0.42	0.54	0.13	0.56	0.30	0.66
	Tyrosine	PDV	1.57	0.98	1.32	0.13	0.03	0.01	0.20
		Liver	-1.74	-1.23	-1.34	0.14	0.06	0.03	0.07
		TSP	-0.17	-0.25	-0.03	0.10	0.35	0.61	0.35

PDV, portal-drained viscera; TSP, total splanchnic tissues; TAA-N, total amino acid (AA) nitrogen; EAA, essential AA nitrogen; NEAA, non-essential AA nitrogen; BCAA, branched-chain AA nitrogen.

Table 6: Hepatic extraction rate expressed as a percentage of hepatic influx in growing lambs fed the Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) or Energy-imbalanced (E) diets.

		Diet					Contrast	
		C	N	E	SEM	*P*	C *vs.* N	C *vs.* E
TAA		8.0	5.5	8.3	0.4	0.004	0.004	0.66
NEAA		9.3	5.6	10.2	0.7	0.005	0.01	0.37
EAA		6.4	5.5	5.7	0.4	0.25	0.12	0.22
BCAA		2.8	3.1	1.8	0.6	0.38	0.74	0.31
Individual AA	Histidine	12.3	10.3	14.1	1.2	0.16	0.28	0.34
	Isoleucine	2.3	2.4	2.3	1.0	1.00	0.95	0.99
	Leucine	3.1	3.6	1.8	0.6	0.17	0.58	0.18
	Lysine	5.7	1.8	3.1	1.0	0.06	0.02	0.10
	Methionine	11.1	10.0	8.1	1.0	0.22	0.48	0.09
	Phenylalanine	19.1	15.8	18.7	0.7	0.03	0.01	0.69
	Threonine	5.9	3.0	4.7	1.4	0.36	0.17	0.55
	Valine	2.1	2.2	1.2	0.7	0.53	0.90	0.37

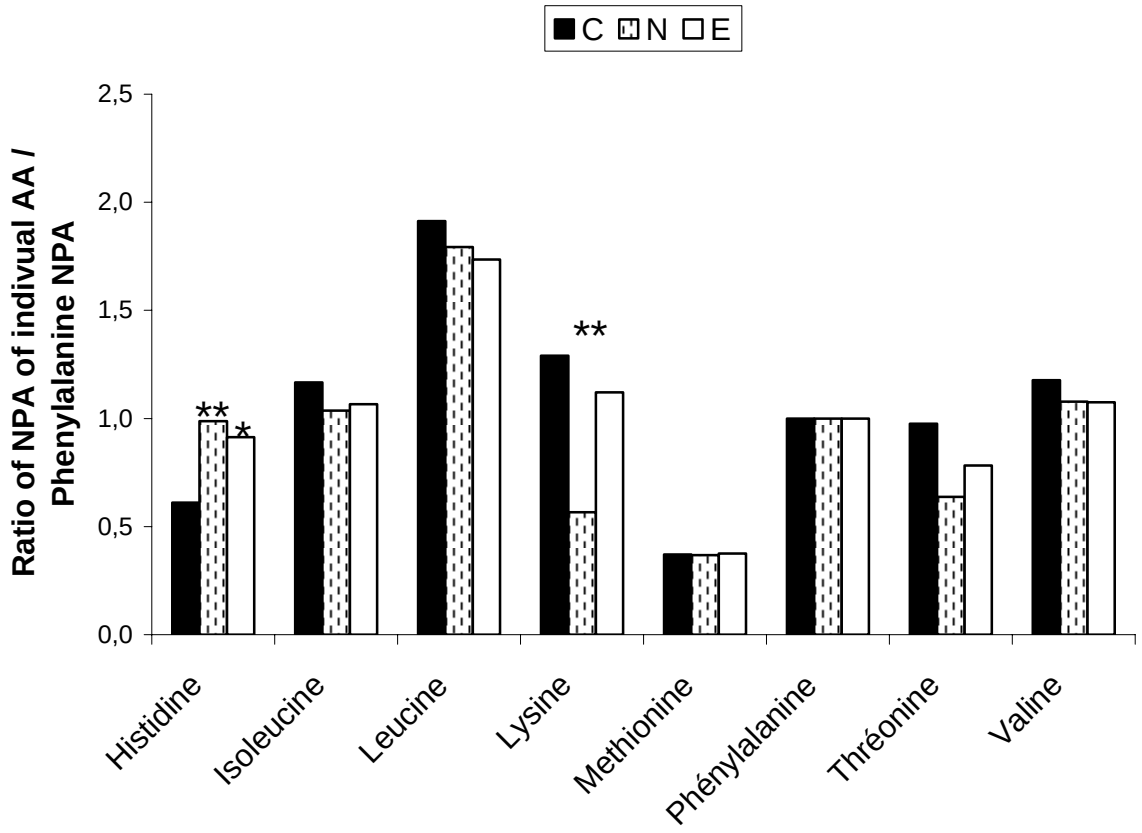
TAA: total amino acids (AA), EAA: essential AA, NEAA: non-essential AA, BCAA: branched-chain AA

Table 7: Net splanchnic free essential amino acid appearance calculated as an 'equivalent' protein gain potential within the carcass (using mean AA composition of lamb caracass from Mac Rae *et al.* (1997) (g/d) for growing lambs fed the Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) and Energy-imbalanced (E) diets. A similar calculation was made using the AA present in the exported proteins (using mean AA composition in plasma proteins from Ruot, 2001) added to the values of potential protein synthesis calculated from free AA.

	C			N			E		
	Potential protein gain g/d		Apparent protein deposition* g/d	Potential protein gain g/d		Apparent protein deposition g/d	Potential protein gain g/d		Apparent protein deposition g/d
	from free AA	from free AA + AA from exported proteins		from free AA	from free AA + AA from exported proteins		from free AA	from free AA + AA from exported proteins	
His	-54	-33	50	40	59	45	3	20	31
Ile	159	170		104	113		125	134	
Leu	120	152		81	111		100	128	
Lys	832	843		241	251		737	746	
Met	40	46		38	44		68	73	
Phe	-11	28		4	36		5	33	
Thr	40	59		30	47		33	47	
Val	103	122		71	88		88	103	

* The apparent protein deposition is calculated as nitrogen balance × 6.25 measured

Figure 1: Net portal appearance (NPA) of individual amino acids compared with phenylalanine NPA in growing lambs fed Control (C), Nitrogen-imbalanced (N) or Energy-imbalanced (E) diets.



Ratio for N and E were compared with C ratio: * is different from Control as a tendency ($P<0.10$) and ** is significantly different from Control ($P<0.05$).

Publication n° 2

Le ratio entre l'énergie et l'azote apportés dans la ration modifie la partition dans l'utilisation des acides aminés dans l'organisme et au niveau des tissus de l'aire splanchnique chez les agneaux en croissance.

Isabelle Savary-Auzeloux, Guillaume Kraft, Brian Bequette, Isabelle Papet, Didier Remond et Isabelle Ortigues-Marty I.

En préparation pour Journal of Animal Science

Résumé : L'effet d'une diminution relative de l'apport en énergie et en azote dans le régime sur les flux traceurs (phénylalanine et leucine) au niveau du corps entier et des tissus de l'aire splanchnique ainsi que sur la synthèse des protéines exportées par le foie a été mesuré sur six agneaux en croissance. Les agneaux ont été cathétérisés au niveau de l'aire splanchnique et ont reçu, selon un schéma en double carré latin inversé, trois régimes dans lesquels l'apport en azote (N) ou en énergie métabolisable (E) était diminué de 20% relativement à un régime témoin (T). Après 15 jours d'adaptation à chaque régime expérimental, une perfusion de phénylalanine (Phe) [$^{2}H_{5}$] et de leucine (Leu) [1-^{13}C] était réalisée dans la veine cave durant 10 heures (4,3 µmol/kg/h et 8,6 µmol/kg/h pour Phe et Leu respectivement). Les concentrations et enrichissements en Phe et Leu, les concentrations en insuline, protéines plamatiques totales, albumine, fibrinogène et les enrichissements en Leu dans les protéines plasmatiques totales et l'albumine ont été mesurés sur des échantillons prélevés toutes les heures au cours des 7 dernières heures de perfusion des traceurs.

Les régimes N et E ont induit une diminution des flux de Leu [1-^{13}C] et Phe [$^{2}H_{5}$] (environ -15% et -10% et pour Leu et Phe respectivement, $P<0,05$). Pour la leucine, la diminution du flux corporel en Leu [1-^{13}C] est liée à une diminution du flux au niveau des tissus drainés par la veine porte (TDVP) dans les deux régimes avec une diminution de la contribution relative des TDVP au flux de Leu [1-^{13}C] dans le régime N (27 %) relativement au régime T (36 %) et au régime E (33 %). La diminution du flux de Leu [1-^{13}C] dans les régimes N et E est associée à une diminution du prélèvement net hépatique de Leu (-25 % et -20 % respectivement, $P<0,05$). A l'inverse, la diminution du flux de Phe [$^{2}H_{5}$] constatée au niveau du corps entier est expliquée par une diminution de ce flux au niveau hépatique (et de sa contribution au flux total) et est associée à une diminution du prélèvement hépatique de Phe dans le régime N (-25 %) et le régime E (-20 %) relativement au régime T ($P=0,03$). La vitesse de synthèse fractionnaire et absolue des protéines totales et de l'albumine est diminuée de 10 % chez les animaux E ($P<0,05$) alors qu'elle n'est pas affectée avec le régime N. Ces données suggèrent que nos régimes ont induit une diminution spécifique de l'utilisation de la leucine au niveau des TDVP (via une diminution probable de l'oxydation de Leu), avec une épargne supplémentaire de Leu dans le cas du régime N. Dans le cas de la phénylalanine, une diminution de l'utilisation de cet AA se met en place dans le foie (liée à une diminution de la synthèse des protéines exportées par le foie et une diminution probable de l'oxydation de la Phe dans le régime E alors que seule l'oxydation semble baissée dans le cas du régime N).

Dietary nitrogen to energy ratio alters amino acid partition in the whole body and amongst the splanchnic tissues in growing lambs

Savary-Auzeloux I*, Kraft G*, Bequette B†, Papet I‡, Remond D‡, Ortigues-Marty I

* INRA, UR 1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, F 63122 Saint-Genès-Champanelle, France
† Department of Animal and Avian Sciences, University of Maryland, College Park, MD 20742-2311, Unites States of America
‡ INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, F 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Corresponding author: Savary-Auzeloux Isabelle
INRA
Unité de Recherches sur les Herbivores, UR 1213
Equipe Nutriments et Métabolismes
Site de Theix
F63122 Saint-Genès-Champanelle
FRANCE
Tel: (33) (0)4 73 62 47 32
Fax: (33) (0)4 73 62 46 39
E-mail: Savary@clermont.inra.fr

Keywords : amino acid, ruminant, liver, metabolic flux, stable isotope, energy

ABSTRACT

The effect of a relative decreased nitrogen or energy supply in the diet on phenylalanine and leucine irreversible loss rates at the whole body and splanchnic levels and on hepatic export protein synthesis was assessed in 6 growing lambs. The lambs were catheterized across the splanchnic tissues and received, in a duplicate latin square, three diets in which nitrogen (N) or metabolizable energy (E) intake were depleted by 20% relative to a control diet (C). After 15 days of adaptation to each experimental diet, the lambs were infused with $^{2}H_5$ Phenylalanine (Phe) and 1-^{13}C leucine (Leu) into the vena cava for 10 hours (4.3 µmol/kg/h and 8.6 µmol/kg/h for Phe and Leu respectively). Concentration and enrichments in Leu and Phe; concentration of insulin, total plasma proteins, albumin, fibrinogen and Leu enrichments in total plasma proteins and albumin were measured on hourly samples over the last 7 hours of the tracers infusion. Both N and E diets induced a decreased whole body ILR for Leu and Phe (-10 to -15% for Leu and Phe, $P<0.05$). For Leu, the decreased whole body ILR is due to a decreased portal drained viscera (PDV) ILR in both diet with a relative contribution of the PDV to the whole body ILR decreased in N (27%) diet relatively to C (36%) and E (33%) diets. This decreased PDV ILR was associated with a decreased net Leu PDV uptake in N and E diets (-25% and –20% respectively, $P<0.05$). Conversely, the decreased whole body Phe ILR is explained by a decreased hepatic ILR (and contribution to the whole body ILR) and was associated with a decreased net hepatic uptake of Phe in both N (-25%) and E (-20%) diets relatively to C ($P=0.03$). The fractional and absolute synthesis rates of total proteins and albumin were decreased by 10% in E animals ($P<0.05$) whereas they were not affected by the N diet. These results suggest a specific decreased utilization of Leu at the PDV level (via a probable decreased oxidation of Leu), with a specific sparing mechanism occuring in the N diet. Conversely, the decreased Phe utilization occurs in the liver (linked to a decreased export protein synthesis and a probable decreased oxidation in E diet whereas only oxidation is reduced in N diet).

INTRODUCTION

Many studies consistently show the crucial role of total splanchnic tissue metabolism (TSP = portal-drained viscera (PDV) + liver) in the net utilisation of amino acids (AA) (Lapierre et al., 2000) by the whole body. The TSP contributes 30-50% to whole body protein synthesis (Lobley, 1994) and, linked to this, about 50% to energy expenditure in ruminants (Ortigues and Doreau, 1995). In this respect, metabolism by the TSP is a substantial contributor to maintenance requirements for energy and AA (Lobley and Lapierre 2003;

Attaix et al., 2005) with liver metabolism accounting for nearly 50% of net portal vein absorption of AA in ruminants. In consequence, the active metabolism by the TSP tissues and its potential adaptation to changes in supply (diet composition) and demand (maintenance vs. growth or lactation), has consequences related to animal health and performance. However, at present, these effects are poorly understood (Lobley, 2007).

An important function of the liver is the synthesis of export proteins, in particular albumin, acute phase proteins, and fibrinogen (Kushner and Mackiewicz, 1993). The regulation of hepatic export protein synthesis and the maintenance of their levels in ruminants remains to be clearly defined. In Dairy cows, despite variation in metabolizable protein supply and a changes in hepatic net removal of AA, total plasma protein and albumin synthesis are maintained (Raggio et al., 2007). By contrast, total plasma protein and albumin synthesis rates were reduced considerable in fasted (3-d) vs fed sheep, which resulted in reduced plasma concentrations of plasma proteins (Connell et al., 1997). What is less clear is whether more subtle changes in energy and protein intake, as would occur in practice, lead to alterations in hepatic export protein synthesis and plasma protein concentrations.

The synthesis of hepatic exported proteins, which are particularly rich in Cys and Phe, may limit the supply of these and other AA to the peripheral tissues (muscle or udder) for anabolic purposes. (Raggio et al., 2007). For example, under septic conditions, where the synthesis of hepatic export proteins enhances the whole body requirements for methionine and cysteine, muscle cachexia ensues to ensure adequate supplies of these AA for acute phase protein synthesis (Obled et al., 2002). Under more physiological situations, such as during normal growth, exported proteins have been implicated as a short term ‘storage’ of AA,(Caso et al., 2007; Volpi et al., 1996). The latter, of course, is dependent upon whether peripheral tissues are capable of utilizing plasma proteins as an alternative source to blood free AA (Yedgar et al., 1983; Maxwell et al., 1990). Consequently, a better understanding of the impact of nutritional factors on AA utilisation by the liver and synthesis of hepatic export proteins is essential to better to assessing the overall supply of AA to productive tissues

The aim of the present study was to investigate the outcome of changes in the relative dietary nitrogen and energy supply on whole body partition of protein metabolism amongst the TSP tissues in growing lambs, with special attention given to the consequences on hepatic export protein synthesis. The TSP (especially the liver) are of particular interest because they are often described as the “integrators” of dietary supply with body requirements (Reynolds, 2006). To study these nitrogen/energy interactions, animals were fed either a control diet (formulated according to recommendations (Jarrige, 1989) or a diet imbalanced for either

nitrogen or energy. To fully assess the ability of the splanchnic and peripheral tissues to redirect protein metabolism, the dietary imbalance was achieved by depleting nitrogen or energy in the ration rather than by supplementation.

MATERIAL & METHODS

Animals and Treatments. The experiment was conducted in a manner compatible with national legislation on animal care (Certificate of Authorization to Experiment on Living Animals, No. 63-113, Ministry of Agriculture, France) and in accordance with the guidelines formulated by the European Community for the use of experimental animals (L358-86/609/EEC).

Six growing rams (crossbred Limousin × Ile de France × Romanov), 4 to 6 months old, at an average weight of 41.5 kg ± 2.6 kg, were surgically prepared with catheters into the portal and hepatic veins as described previously (Kraft et al., 2008). The arterial blood catheter was fitted directly in the abdominal aorta. The lambs were also fitted with a transit-time ultrasonic blood flow probe around the portal vein (Type A; Transonic Systems Inc. Ithaca, NY). After surgery, animals were housed in individual stalls under conditions of constant lighting and were given *ad libitum* access to a Control diet (C), water and a trace mineralized salt block. The lambs were left to recover from the surgery for at least 3 weeks while they were adapted to the C diet (see below).

Following recovery from surgery, the lambs were assigned to three diets according to a replicated 3 × 3 latin square design with 2 week period. The three diets were comprised, by weight, of 30% grass hay and 70% concentrate (Table 1). The composition of the concentrate mix was formulated to generate diets that were sufficient in nitrogen and energy, low in energy or low in nitrogen. Thus the control diet (C) was formulated to provide sufficient available nitrogen and metabolizable to support a growth rate of 200 g per day according to the INRA feed tables (Jarrige, 1989) and using concentrate #1 (Table 1). The nitrogen-imbalanced diet (N) was made up using concentrate #2 (Table 1). The nitrogen content was 20% lower in concentrate #2 compared with #1, but with similar energy content and DM allowances. The energy-imbalanced diet (E) was made up using concentrate #3, which had higher nitrogen content than concentrate #1 but a similar metabolizable energy (ME) content. Diet E allowed a 20% lower ME intake than C through lower DM allowances (Table 1). The diets were adjusted at the start of each treatment on the basis of the initial metabolic weight ($BW^{0.75}$) of the animals and fed at 3-h intervals in 8 equal size meals per day. Dietary treatment periods were separated by a 7 day period when the animals were fed the C diet.

During the last day of each dietary treatment period, the animals were fed every hour to achieve a metabolic steady state with respect to rates of digestion, absorption and metabolism. On the last day of the experimental diet, blood flows were recorded and blood samples were taken from the animals.

Net and tracer kinetic measurements. Beginning at 0600 h on the last day of each experimental period, a continuous infusion (10 h) into the caval vein of a mixture of L-[ring-$^{2}H_5$] phenylalanine ($^{2}H_5$ Phe) and L-[1-^{13}C] leucine (^{13}C Leu) (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) (4.3 µmol/kg/h and 8.6 µmol/kg/h following a priming dose of 4.3 µmol/kg and 8.6 µmol/kg for Phe and Leu respectively) was initiated. Blood flow in the portal vein was monitored continuously (one data every minute) over the last 7 h (1000 h to 1700 h). No significant drift was noted for the blood flow and the hematocrit throughout the sampling day. Consequently, an average blood flow and plasma flow were used for the entire sampling day. Between 1030 h and 1630 h, sets of blood samples were withdrawn into heparinized tubes (5UI/mL blood) at 1-h intervals (between meals) from the arterial, portal and hepatic vein catheters for amino acid and plasma protein analyses. At the same time, 1 mL of blood was withdrawn in tubes containing 3 mM EDTA-K (10 µL/mL blood) for measurement of fibrinogen. Packed cell volume was determined by hematocrit.

On the day of sampling, heparinized blood was centrifuged (4°C, 15 min @ 1200g) to separate plasma. For AA concentration, to a known weight of plasma (0.75 g) was added a known weight (0.060 g) of a mixture of [U-^{13}C] labelled AA derived from hydrolysis of algal protein (Calder et al., 1999). After vortex timing, the sample was deproteinized by addition of sulfosalicyclic acid (15% wt/v) and centrifuged at 10 000 g for 10 minutes. The acid supernanant was stored at -20°C until determination of phenylalanine and leucine concentration by gas chromatography-mass spectrometry (Trace GC/ Automass Multi, Thermofinnigan, Courtaboeuf, France) using the isotope dilution technique as previously described (Calder et al., 1999).

Plasma free $^{2}H_5$ Phe and ^{13}C Leu enrichments were determined using a GC-MS (Trace GC/ Automass Multi, Thermofinnigan, Courtaboeuf, France) on plasma samples deproteinized with sulfosalicyclic acid (15% wt/v), centrifuged at 10 000 rpm for 10 minutes and desalted on AG-50 H+ resin (Bio-Rad, Hercules, CA). ^{13}C Leu enrichment in total plasma proteins and albumin was assessed as previously described (Calder et al., 1999). Albumin was purified from 0.25 mL of by affinity chromatography employing a 2 mL column of blue Sepharose CL 6B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and albumin precipitated by addition of 2 mL of 100% trichloracetic acid (Ruot et al., 2000). Plasma proteins were hydrolyzed in 6 N

HCl for 24 h at 110°C and AA isolated by cation-exchange. After formation of the N-acetyl-propyl derivative of leucine, the ratio $^{13}CO_2$:$^{12}CO_2$ was measured by gas isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, Cheadle, UK). The enrichments for free AA or protein-bound AA are expressed as atom percent excess (APE) above background.

Total plasma protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951), albumin concentration was determined using a commercial kit (Sodioba, Montbonnot St Martin, France) and fibrinogen was measured by turbidimetry on a Cobas Mira analyser (ABX diagnostics, Montpellier, France) as previously described (Macart et al., 1989).

Calculations and statistical analyses. The hepatic arterial flow was estimated at 5.3% of the portal vein blood flow based on the reported contribution to hepatic blood flow (Barnes et al., 1986) and the absence of significant changes in the contribution of the hepatic arterial to total venous blood flow with intake (Vernet et al., 2005). Plasma flow (F, L/h) in each vessel was calculated after correcting blood flow for packed cell volume, the latter determined by hematocrit (Ht). Values of plasma flows were averaged over the entire sampling day as no significant variation of blood flow had been detected.

Net fluxes of plasma AA by the PDV, liver, and TSP were calculated as:

Net PDV flux (mmol/h) = $([AA]_{PV} - [AA]_A) \times PVF$

Net liver flux (mmol/h) = $([AA]_{HV} \times HVF) - ([AA]_{PV} \times PVF + [AA]_A \times AF)$

Net TS flux (mmol/h) = $([AA]_{HV} - [AA]_A) \times HVF$,

where [AA] is concentration (mmol/L) of the AA in plasma and PV, A and HV denote the portal vein, heptic artery and hepatic vein, respectively. A negative flux indicates a net removal of the metabolite, whereas a positive flux indicates a net release of the metabolite by the tissue.

Whole body irreversible loss rate (ILR) of leucine and phenylalanine from plasma was calculated from arterial plasma leucine or phenylalanine enrichment (E_{AA}) over the plateau period as:

ILR (mmol/h) = $((E_i/E_a) - 1) \times IR$,

where E_i is the enrichment (atom percent excess, APE) of the AA in the infusate, Ea is the plateau enrichment of the AA in arterial plasma, and IR is the rate of isotope infusion (mmol/h).

The ILR values were converted into protein equivalent fluxes (PrF; g/d) as follows :

PrF = ILR x 24 x MW/protein $content_{AA}$

where MW is the molecular weight of the AA and protein $content_{AA}$ is the average concentration (g/100 g) of phenylalanine (3.4) and leucine (6.2) in mixed body protein of growing sheep (MacRae et al., 1993).

The ILR (unidirectional flux) of leucine or phenylalanine across the PDV and liver were calculated as follows :

PDV ILR = PVF x (E_{PV} x [AA]pv - E_A x $[AA]_A$)/ E_A

Liver ILR = [(PVF x ($[AA]_{HV}$ x E_{HV} – $[AA]_{PV}$ x E_{PV})) + (AF x ($[AA]_{HV}$ x E_{HV} - $[AA]_A$ x E_A)] /E_{Ppool}

TSP ILR = PDV ILR + Liver ILR

In the case of PDV and TS, E measured in the artery was used as a precursor pool. In the case of the liver, the true precursor pool for hepatic protein synthesis is still a matter of debate (Lobley et al., 1996) consequently, the calculation for ILR was presented using A, PV and HV as precursor pools but for an homogeneity of the results, for the calculation of the relative contribution of the PDV and the liver to the whole body Phe and Leu fluxes, artery was used as a precursor pool, .

Lastly, in order to measure the synthesis rates of total plasma proteins or albumin during the continuous ^{13}C Leu infusion, the ^{13}C leu incorporated into the total plasma proteins or albumin was plotted against time (between 3 and 9 h). Linear regressions were obtained. The slope was used to calculate the fractional synthesis rate (FSR) of total proteins or albumin. The calculations were done as follows using hepatic vein ^{13}C free leu enrichments as the precursor pool as previously suggested (Connell et al., 1997). FSR (%/d) = slope / $E_{precursor}$ x 24 x 100

The absolute synthesis rate (g/d) (ASR) = FSR x Protein pool size in plasma

Where the protein pool size in plasma = concentration of proteins in plasma (g/L) x Plasma volume and where the plasma volume = blood volume (assumed at 0.06 of live weight) x (1-packed cell volume).

Results were analyzed by ANOVA according to a double Latin square design, with animal, treatment, and period as main factors. Analysis was carried out using the general linear model of Statistica (version 5, statsoft, OK, USA). If statistically significances were detected, a Duncan post-hoc analysis was performed to assess differences between individual means. Differences were declared significant at $P<0.05$ and tendencies were declared for $0.05<P<0.1$ for all statistical tests.

RESULTS

Mass transfers and extraction rate of isotopes across the PDV, the liver and the TSP.

Food intake, growth rate. Only E diet induced a reduced growth rate (191 g/d) compared to 265 and 258 g/d in C and N diets respectively (Table 2). This led to a significant reduced live weight in the E diet (-4%, P<0.02 for E vs C and N). The DM digestibility remained stable throughout the three diets (Kraft et al, 2008). Lastly, the ME intake was significantly reduced by 21% in the E diet compared to C and N diets. The nitrogen digested was reduced by 23% (P=0.01) in the N diet compared to C (Table2). The ratio nitrogen digested to metabolizable energy (ND/ME) was hence different between the 3 experimental diets : 1.15, 0.87 and 1.31 for C, N and E respectively, which was the aim of this experimental design.

Blood flows, leucine and phenylalanine concentrations. The N and E diets induced a significant reduction of the portal blood flows (-7% and -15% for C vs N and C vs E blood flows respectively, P=0.001) and portal plasma flow (P<0.001) (Table 3). The portal plasma/blood flows measured in the N animals are then intermediary between the flows measured in C and E animals. Except for a significant reduced artery concentration of Leucine in the N diet (-17%, C vs N, P=0.002), the diets did not induce other alteration in the Phe and Leu concentration in artery.

Net balances and tracer extraction rates. The values for net Phe and Leu fluxes measured in this study are consistent with the data obtained previously on sheep (Lobley et al, 1996). At the PDV level, the net Phe flux was not significantly altered whatever the diet considered whereas the net release of Leu was decreased in N and E diets (-25% and -20% for N and E diets vs C, P=0.05) (Table 3). The extraction rate of labelled Leu and Phe remained stable at the PDV level, whatever the diet considered (Table 3). In the liver, the net Phe removal was decreased in the N and E diet (by about 25% and 20% for N and E diets respectively relatively to C, P=0.03). Concerning Leu, no effect was observed at the liver level (Table 3). The decreased net Phe uptake by the liver was associated with a decreased extraction rate of labelled Phe (-47% and -37% for labelled Phe extraction rate for C vs N and C vs E, P=0.02) (Table 2). Lastly, at the TS level, even if no effect of diet is observed for net Phe uptake, a significant decreased $^{2}H_5$ Phe extraction rate was observed for the N and E diets (-33% and -30% for C vs N and E diets respectively, P=0.02). Conversely, the net Leu release by the TS tended to be decreased in the N diet (-32%, C vs N, P=0.06) whereas no effect of the diet was observed for the ^{13}C leu extraction rate at the TS level (Table 3).

Insulin concentration is the portal vein tended to be decreased in the E diet compared to C and N diets respectively (-25%, P=0.07, Table 3). No significant effect of diets on insulin concentrations was observed in artery and hepatic vein.

Whole body phenylalanine and leucine ILR. For the C diet, plasma ILR was for Phe 3.22 mmol/h and for Leu 7.70 mmol/h (Table 4), and on a protein equivalent values were similar. The N and E diets induced a significant and similar decrease in the Phe ILR (-13%, -12.5% for N and E diets respectively, P=0.02) and Leu ILR (-12%, 16% for N and E diets respectively, P<0.01) (Table 4).

Phe and Leu ILR in PDV and liver. The results and differences observed between the diets are similar whether the data are expressed as ILR or PrF. The decreased Phe ILR in the whole body can be at least partially explained by a decreased ILR observed at the TS level (-36% and -43% for C vs N and E respectively, P=0.004) and more precisely at the liver level (-48% and -46% for C vs N and E respectively, P=0.008) (Table 4). The contribution of the liver to the whole body flux represented 71% in the C diet and fell significantly to 42% in the N and E diets (P=0.02) whereas the contribution of the PDV remained fairly stable (about 20%). Consequently, the contribution of the other tissues and organs (obtained by difference) increased significantly (P=0.02) from 6% in the C diet to 34-40% in the N and E diets (Figure 2). For Leu, the decreased ILR observed at the whole body level could be partially explained by a decreased ILR at the PDV level (-36% and -23% for C vs N and E respectively, P=0.04) (Table 4). This decreased Leu ILR in the PDV did not persist at the TS level due to a slight increased Leu ILR (even if not significant) in the liver. For Leu, the PDV represented quite an important contribution to the whole body flux (between 27 and 36% depending on the diets). A significant (P<0.05) reduction of the contribution of the PVD to the whole body Leu ILR was observed between the C and N diets (36% and 27% for C and N diets respectively). On the contrary to what observed for Phe, the contribution of the liver to the whole body flux was very small (13% is a maximum) (Figure 2).

Plasma proteins. No significant alteration of the arterial concentration of total proteins, albumin and fibrinogen could be highlighted (Table 5). Only tendancies for altered concentration in N or E diets existed for albumin and fibrinogen in the hepatic vein and artery. On the other hand, the fractional synthesis rate (FSR) and absolute synthesis rate (ASR) for total proteins were decreased in the E diet, (-11% and -20%, C vs E for FSR and

ASR respectively, P<0.05) (table 4). Similarly what obtained for total plasma protein synthesis, a significant (P<0.03) decreased FSR (-14%) and ASR (-21%) was also observed for albumin. Using the net Phe uptake by the liver, the percentage of Phe within the total exported proteins (6.3%) and the absolute synthesis rate of total exported proteins (using hepatic vein as a precursor pool), a calculation of the proportion of the net Phe liver uptake could be calculated. This contribution was respectively 12.1, 14.9 and 11.7% for the C, N and E groups respectively and the contribution of the utilization of Phe for exported protein synthesis tended to be higher in N compared to C (P=0.09). The potential contribution of the net Leu hepatic uptake to exported protein synthesis (using the value of 12% for the percentage of Leu in total plasma proteins) was much higher than what observed for Phe : 78, 72 and 99% for C, N and E diets (using the hepatic vein enrichment of ^{13}C Leu is used as a precursor pool).

DISCUSSION

Although some data in the litterature exist on the effect of the level of intake or the nitrogen supply on the whole body and splanchnic AA fluxes and utilisation by the PDV and the liver in ruminants (Lapierre et al., 1999 and 2000; Raggio et al., 2006 and 2007; Wray-Cahen et al., 1997; Lobley et al., 1996), much less data are available concerning the impact of energy alone on AA metabolism (Savary-Auzeloux et al., 2003b; Raggio et al., 2006). However, an AA supplementation alone does not necessary lead to an increased net splanchnic release (Bruckental et al., 1997) whereas an increased level of intake usually does (Lapierre et al., 2000), suggesting the importance of the energy supply in the diet to optimize the AA utilisation by the splanchnic tissues (Taniguchi et al., 1995). The aim of this study is then to assess the respective role of the ‘energetic’ and ‘nitrogenous’ part of the diet on the splanchnic, and particularly the hepatic net uptake and utilisation of AA.

In this study, the whole body irreversible loss rate (ILR) for leucine (Leu) and phenylalanine (Phe) respectively average 3 mmol/h and 7 mmol/ h throughout the three diets. When expressed as protein fluxes (PrF), the values are very similar between Phe and Leu. These results are very consistent with what previously found in sheep of approximately the same weight (Lobley et al., 1996; Savary-Auzeloux et al., 2003c). When the energy or nitrogen supply is inadequately supplied in the diet relatively to the requirements for a normal growth, (ie N and E diets in our study), the Phe ILR (-10%, C vs N and -12% C vs E) and Leu ILR (-12%, C vs N and -16%, C vs E) are decreased, suggesting an overall decreased AA

utilisation at the whole body level. Similar increased/decreased ILR are observed when the level of intake increases/decreases in ruminants (Lobley et al., 2000; Lapierre et al., 1999; Savary-Auzeloux et al., 2003c) and non ruminants (Hoffer et al., 1985). This is also the case when the nitrogen supply is increased in the diet (Lapierre et al., 2002; Liu et al., 1995). Less data are available on the impact of supplementation in energy alone on whole body AA fluxes but a tendancy for an increased leucine whole body ILR was observed in propionate infused lactating cows (Raggio et al., 2006), again consistent with our data. Concerning the effect of our experimental diets on the Phe and Leu whole body fluxes, the questions which naturally arise from these results are 1) Which tissues and organs preferentially explain the decreased Phe and Leu irreversible loss rate observed at the whole body level in N and E diets and 2) since protein synthesis and oxidation are two major fates of AA in the body, which of those two metabolic pathways is preferentially affected by the C, N and E diets.

Before answering those questions, some limitations concerning the measurement of the Phe and Leu fluxes at the whole body and tissue levels presents need to be taken into account. Indeed, the precursor pool to be used for the whole body, PDV and liver ILR calculation remains a matter of debate. If arterial enrichment of free AA is considered to be an appropriate estimate and is commonly used as the precursor pool for Whole body and PDV ILR calculation (Lapierre et al., 1999), this is not the case for hepatic ILR (Lapierre et al., 1999). The reason for that is that blood supply to the liver is a mixture of portal and arterial blood, which led a majority of authors to calculate hepatic ILR using Apoprotein B100 (protein with high turnover) (Jahoor et al., 1994; Cayol et al., 1996; Connell et al., 1997) or hepatic vein AA enrichments (Connell et al., 1997) as precursor pools. However, the calculation of the relative contribution of tissues and organs to the overall Phe and Leu ILR requires homogenized data (and similar precursor pool used). Consequently, the PDV, liver and whole body ILR presented in this work have been calculated using arterial plasma Phe and Leu enrichments as precursors. Yet, and because of these limitation concerning the data of hepatic Phe and Leu ILR, calculations have also been made using portal or hepatic Phe and Leu enrichments. Even if higher, the Phe and Leu hepatic ILR obtained using portal or hepatic Phe and Leu enrichments were following the same pattern of change following the administration of C, N and E diets to lambs, as what obtained using arterial enrichments as the precursor pool. Consequently, keeping in mind all the limitations stated above, the calculation of Phe and Leu ILR in the PDV and the liver and their relative contribution the the whole body ILR helped to understand the decreased while body Phe and Leu ILR observed in the N

and E diets. Indeed, the whole body AA ILR alone is the barycentre of the AA fluxes in each tissue and organ and as such is difficult to interpret.

For Leucine, a reduction of the net PDV release in both N and E diets associated with a decreased Leu ILR at the PDV level show that the decreased net Leu appearance in the portal vein is linked to a decreased nitrogen digested (as shown in the N diet) associated with a decreased utilisation of Leu by the PDV itself. Indeed, in the N diet (and to a much lesser extend E diet), the contribution of the PDV to Leu ILR is decreased (27% in N compared to 36% in C diets, $P<0.05$). Consequently, as suggested by Kraft et al (2008), even if majoritary driven by the reduced nitrogen supply in the N diet, the reduced net portal appearance of leucine can also be explained by a relative 'sparing' mechanism of EAA via a probable decreased oxidation at the PDV level. Indeed, BCAA, Met and Thr have been shown to be oxidized in the PDV of ruminants and monogastrics (Lobley et al., 2003; Pacheco et al., 2006; van Goudoever et al., 2000; Le Floc'h et al., 1995) and a decreased oxidation rate of those AA in a case of nitrogen deficiency can be hypothesized in ruminants, as already demonstrated in pigs (Van der Schoor et al., 2001). A plasticity in terms of utilisation of nutrients for energetical purposes at the PDV level has also been already demonstrated in pigs where an increased oxidation of glucose can compensate partially a fall in AA oxidation in the PDV of pigs fed a low protein diet (Van der Schoor et al., 2001). The absence of alteration of Phe ILR at the PDV level is not inconsistent with the hypothesis stated above since the oxidation of Phe at the PDV level of ruminants has not been demonstrated yet (El-Kadi et al., 2006; Lobley et al., 2003).

In addition to potential adaptative mechanisms occuring for some EAA at the PDV level, a reduction of some AA utilisation is observed in the liver of N and E fed lambs, as shown by a significant decreased net hepatic Phe uptake and decreased hepatic Phe ILR. This is associated to a decreased contribution of the liver to the overall ILR (42% for N and E diets comapred to 71% in C diet). Hepatic Phe utilisation is selectively decreased more importantly in the liver comparatively the other tissues and organs (except PDV) whose contribution is hence consequently increased (34-40% for N and E diets compared to 6% for C). A decreased oxidation of some EAA within the liver is one of the probable mechanism to explain this important decreased contribution (Wray-Cahen et al., 1997; Lapierre et al., 1999). This decreased AA oxidation is probably the mechanisms involved in the reduction of Phe ILR within the liver in the N diet since a reduction of urinary nitrogen (AA oxidation leads eventually to urea synthesis) (Kraft et al., 2008) is observed.. The hepatic contribution of Leu

to whole body ILR remains unaffected by the diets, which is not surprising due to the small extraction rate of the BCAA commonly observed in the liver (Lapierre et al., 2000; Savary-Auzeloux et al., 2003 a and b).

Another fate of AA within the liver is protein synthesis. The contribution of this pathway to the overall utilisation of AA by the liver is highly dependant on the AA considered. Indeed, the potential contribution of the net Phe uptake to total exported protein synthesis is between 12-15% whereas this value is above 70% for Leu in our study. These proportions (between 10-25% for Phe) are very similar to what usually found in ruminants (Raggio et al., 2007) and the discrepency between Leu and Phe explained by the smaller quantity of Leu (and other BCAA) oxidized within the liver relatively to other EAA (see Lobley, 1992 for review). Our study shows an absence of effect of the N diet on exported protein synthesis (albumin or total proteins). This absence of effect is not surprising. Indeed, even if an increased albumin synthesis was observed after a 16% protein diet in humans compared to a 0% protein diet (Cayol et al., 1996), or between the post prandial and post absorptive state in humans (Hunter et al., 1995), no effect of a supplemented diet in proteins was observed in lactating cows (Raggio et al., 2007). Our results, in accordance with this latter study, can be explained by the relatively small (about 20%) difference in the N supply given to the different animals' groups whereas the differences in nitrogen supply between the groups in the human studies are much more extreme. Concerning the N diet, another interesting point has to be raised, as similarly shown by Raggio et al. (2007) : the hepatic exported protein is not altered by the nitrogen supply whereas the net Phe uptake is decreased in the N diet. This means that the proportion of Phe net uptake used for the synthesis of exported proteins increases in the N diet (12% in C and E diets and 15% in the N diet, using hepatic vein as a precursor pool, as suggested by Connell et al. (1997) and Barazzoni et al., (1999) Consequently in this situation of relative nitrogen dificiency (N diet), the exported protein synthesis remained at the same rate as for the C animals (ie sustained and preserved pathway) despite the lower AA supply in the portal vein, compared to other metabolic pathways. This mechanism of sustained plasma protein synthesis in case of nitrogen deficiency has been observed previously by several authors in catabolic states (De Feo et al., 1992 and 1993) and has been suggested to be a form of temporary storage of AA within the body has been shown to be dependant on the AA from subsequent oxidation (and hence catabolism). In addition, the oxidation rate of essential AA within the liver is highly correlated with the AA supply in the portal vein (Wray-Cahen et al., 1997). Hence, the lower AA supply in the portal vein associated with the relative protection of the AA via exported

protein synthesis concur to lower the irreversible oxidative losses within the liver and lead to the decreased Phe ILR and net Phe hepatic uptake in the N diet. Concerning specific proteins, albumin is quantitatively the most abundant plasma protein in ruminants and monogastrics (Ruot et al., 2000; Connell et al., 1997) and hypoalbuminemia is often associated with a long lasting and intense undernutrition (Cynober and Aussel, 2004; Connell et al., 1997; Barber et al., 2000). In this study, and similarly to what found for total plasma proteins, the albumin FSR and ASR are significantly (P=0.03) decreased only in the E diet relatively to C and N diets. The sustained protein synthesis shown in the N diet can then be explained at least partially by a sustained albumin synthesis. This result confirms data from other authors suggesting that among the plasma proteins, albumin is potentially the main form of storage of AA used by the body to preserve AA from oxidation (Volpi et al., 1996; De Feo and Lucidi, 2002). Of course, this 'sparing mechanism' is valid if AA from exported proteins can be used by peripheral tissues for anabolism (Yedgar et al., 1983; Maxwell et al., 1990).

On the contrary, in the E diet, the total exported protein synthesis is decreased (decreased fractional (-12%) and absolute (21%) synthesis rates) compared to C animals, suggesting that this anabolic pathway is not preserved in this case. To our knowledge, even if numerous studies have shown an alteration of the synthesis of exported proteins in various physiological situations such as catabolic states (Ruot et al., 2000) or the level of intake in monogastrics (de Meer et al., 2000) or ruminants (Connell et al., 1997), no such effect of energy supplementation or depletion alone on plasma protein synthesis had been reported yet. When the potential contribution of the net Leu hepatic uptake to exported protein synthesis is calculated : 78, 72 and 99% we show that more Leu is used for total exported protein synthesis in E than in the other diets. This means that the oxidation of Leu (even if small) is also decreased to its minimum. The decreased hepatic Phe ILR observed in the E diet can be explained, at least partially, by a decreased exported protein synthesis. More precisely, a decreased FSR of albumin is also observed in the E diet. Quantitatively, a reduction of (-1.45 g/d) ASR of albumin occured and explains half of the decreased total plasma proteins ASR (-2.76g/d), suggesting that other plasma proteins synthesis also undergo a limitation in their synthesis. Consequently, The E diet has probably a wide-ranging effect on plasma protein synthesis. However, even if a decreased protein synthesis concur to lower the net Phe uptake by the liver, only about 10% of the decreased net Phe uptake can be explained by the decreased total exported protein synthesis, suggesting that other mechanisms such as a decreased endogenous protein synthesis and oxidation (the liver gain can be considered as minor) may explain the decreased Phe uptake. A decreased AA oxidation within the liver is

possible but urinary nitrogen is similar between C and E animals (Kraft et al., 2008), suggesting that whole body oxidation of AA remains high. Any decreased AA oxidation within the liver may hence be compensated by a subsequent increased oxidation of AA (BCAA particularly) required in the muscles as energy suppliers. The two major metabolic fates of Phe (oxidation and protein synthesis) and to a lesser extend Leu are presumably decreased in the E diet, and unlike to what is observed in N diet, no specific 'sparing' mechanisms can be highlighted in the liver in this case, leading to the decreased growth observed in the E fed animals. Among the potential regulatory mechanisms which can explain the decreased exported protein synthesis observed in the E diet, the role of the decreased portal (but not peripheral) insulin concentration ($P=0.07$) associated with the decreased volatile fatty (data not shown) net PDV release ($P<0.05$) can be hypothesized. Indeed, insulin infusion in humans (euglycemic clamp) has been shown to increase albumin synthesis and decrease fibrinogen synthesis (De Feo et al., 1993). However, the role of insulin is less obvious in other studies where the role of AA as regulatory factors seems more important (Ahlman et al., 2001; Davis et al., 2002). Consequently, such hypothesis will require further investigation, taking into account of a maximum of petientially regulatory molecules such as nutrients (AA, propionate, glucose …) and hormones (insulin, glucagon, Growth hormone/ IGF-1 ….)

As a conclusion, the reduction of nitrogen supply alone (N diet) in the diets of growing lambs led to the establisment of metabolic adaptative mechanisms : 1) reduction of oxidation of AA in the PDV and 2) reduction of AA oxidation associated with preservation of AA from oxidation by a sustained exported (particularly albumin) protein synthesis within the liver. Those metabolic adaptation led to a lower nitrogen wastage at the whole body level and a preserved growth. On the contrary, when a reduction of energy (E diet) supply occurs in growing lambs, similar mechanism do not take place. The protein synthesis in the liver is decreased (in the liver and in the whole body) and whole body oxidation is probably increased, leading to a lower growth rate. The utilisation of AA as energy suppliers (particularly in the PDV and peripheral tissues) leads to a subsequent nitrogen wastage. Energy deficiency is hence surprisingly more deleterious on splanchnic and whole body AA metabolism than a nitrogen deficiency. This reinforces the idea that a properly balanced supply in both energy and nitrogen components in the diet is essential for an optimization of efficiency of utilisation of the components of the diet for optimal growth. The role and quantitative importance of exported proteins, and particularly albumin, as alternative suppliers

of AA to the muscle (particularly in the case of nitrogen deficient diets) requires further investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Gaydier and D. Thomas for their excellent help with animal care, C. Cossoul and A.S. Bage for invaluable technical support and C. Pouyet for IRMS analysis.

This work was supported by a grant from INRA Research Institute. G. Kraft received a doctoral scholarship from « Région Auvergne » and INRA. Since this work was funded by INRA, there is no conflict of interest.

LITERATURE CITED

Ahlman, B., M. Charlton, A. Fu, C. Berg, P. O'Brien and K.S. Nair. 2001. Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis. Diabetes 50, 947-954.

Attaix, D., D. Rémond, and I.C. Savary-Auzeloux. 2005. Protein metabolism and turnover. In Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition (J. Dijkstra, J.M. Forbes and J. France Editors) pp 373-397.

Barazzoni, R., S.E. Meek, K. Ekberg, J. Wahren, and K.S. Nair. 1999. Arterial KIC as marker of liver and muscle intracellular leucine pools in healthy and type 1 diabetic humans. Am. J. Physiol. 277: E238-244.

Barber, M.D., K.C.H. Fearon, D.C. McMillan, C. Slater, J.A. Ross, and T. Preston. 2000. Liver export protein synthetic rates are increased by oral meal feeding in weight-losing cancer patients. Am. J. Physiol. 279:E707-714.

Barnes, R.J., R.S. Comline, and A. Dobson. 1986. The Control of splanchnic blood flow. In: Control of Digestion and Metabolism in Ruminants (Milligan, L. P., Grovum, W. L., & Dobson, A., Editors). Engelwood Cliffs, NJ: Prentice Hall pp. 41-59.

Bruckental, I. G.B. Huntington, C.K. Baer and R.A. Erdman. 1997. The effect of abomasal infusion of casein and recombinant somatotropin hormone injection on nitrogen balance and amino acid fluxes in portal-drained viscera and net hepatic and total splanchnic blood in holstein steers. J. Anim. Sci. 75, 1119-1129.

Calder, A.G., K.E. Garden, S.E. Anderson, and G.E. Lobley. 1999. Quantitation of blood and plasma amino acids using isotope dilution electron impact gas chromatography/mass spectrometry with U-(13)C amino acids as internal standards. Rapid Commun. Mass Spectrom. 13: 2080-2083.

Caso, G., J. Feiner, I. Mileva, L.J. Bryan, P. Kelly, K. Autio, M.C. Gelato, and M.A. McNurlan. 2007. Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. Am. J. Clin. Nutr. 85:446-451.

Cayol, M., Y. Boirie, J. Prugnaud, P. Gachon, B. Beaufrere, and C. Obled. 1996. Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans: effects of tracer route infusion and dietary proteins. Am. J. Physiol. 270:E980-987.

Connell, A., A.G. Calder, S.E. Anderson, and G.E. Lobley. 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. Brit. J. Nutr. 77:255-271.

Cynober, L., and C. Aussel. 2004. Biological assessment of nutritional status. Nutr. Clin. Metab. 18:49-56.

Davis, T.A., M.L. Fiorotto, D.G. Burrin, P.J. Reeds, H.V. Nguyen, P.R. Beckett, R.C. Vann and P.M.J. O'Connor. 2002. Stimulation of protein synthesis by both insulin and amino acids is unique to skeletal muscle in neonatal pigs. Am. J. Physiol. 282, E880-890.

De Feo, P., F.F. Horber, and M.W. Haymond. 1992. Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. Am. J. Physiol. 263:E794-799.

De Feo, P., E. Volpi, P. Lucidi, G. Cruciani, G. Reboldi, D. Siepi, E. Mannarino, F. Santeusanio, P. Brunetti, and G.B. Bolli. 1993. Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. Diabetes 42:995-1002.

De Feo, P., and P. Lucidi. 2002. Liver protein synthesis in physiology and in disease states. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 5:47-50.

De Meer, K., H.C. Smolders, J. Meesterburrie, M. de Sain-van der velden, H.A. Voorbij, A. Okken, D.J. Reijngoud, and W. Kulik. 2000. A single food bolus stimulates albumin synthesis in growing piglets. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 31:251-257.

El-Kadi, S. W., R.L. Baldwin 6th, N.E. Sunny, S.L. Owens, and B.J. Bequette. 2006. Intestinal protein supply alters amino acid, but not glucose, metabolism by the sheep gastrointestinal tract. J. Nutr. 136:1261-1269.

Goodwin, G.W., W. Gibboney, R. Paxton, R.A. Harris, and J.A. Lemons. 1987. Activities of branched-chain amino acid aminotransferase and branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in tissues of maternal and fetal sheep. Biochem. J. 242:305-308.

Hanigan, M.D. 2005. Quantitative aspects of ruminant splanchnic metabolism as related to predicting animal performance. Anim. Sci. 80:23-32.

Hoffer, L.J., R.D. Yang, D.E. Matthews, B.R. Bistrian, D.M. Bier, and V.R. Young. 1985. Effects of meal consumption on whole body leucine and alanine kinetics in young adult men. Brit. J. Nutr. 53:31-38.

Hunter, K.A., P.E. Ballmer, S.E. Anderson, J. Broom, P.J. Garlick, and M.A. McNurlan. 1995. Acute stimulation of albumin synthesis rate with oral meal feeding in healthy subjects measured with [ring-$^{2}H_{5}$]phenylalanine. Clin. Sci. 92:297-305.

Jahoor, F., D.G. Burrin, P.J. Reeds and M. Frazer. 1994. Measurement of plasma protein synthesis rate in infant pig: an investigation of alternative tracer approaches. Am. J. Physiol. 267:R221-227.

Jarrige R. 1989. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and Feed Tables. Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique, pp. 389

Kraft, G., I. Ortigues-Marty, D. Durand, D. Rémond, T. Jardé, B. Bequette, and I. Savary-Auzeloux, I. 2008. Adaptations of splanchnic amino acid metabolism contribute to nitrogen economy or waste in lambs fed nitrogen or energy imbalanced diets. Animal (submitted).

Kushner I., and A. Mackiewicz. 1993. The acute phase response: an overview. In : Acute Phase Proteins. Molecular Biology, Biochemistry, and Clinical Applications (Mackiewicz A., Kushner I. & Baumann H. Eds) 3-20 CRC Press Inc.

Lapierre, H., J.F. Bernier, P. Dubreuil, C.K. Reynolds, C. Farmer, D.R. Ouellet, and G.E. Lobley. 1999. The effect of intake on protein metabolism across splanchnic tissues in growing beef steers. Brit. J. Nutr. 81:457-466.

Lapierre, H., J.F. Bernier, P. Dubreuil, C.K. Reynolds, C. Farmer, D.R. Ouellet, and G.E. Lobley. 2000. The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. J. Anim. Sci. 78:1084-1099.

Lapierre, H., J.P. Blouin, J.F. Bernier, C.K. Reynolds, P. Dubreuil, and G.E. Lobley. 2002. Effect of supply of metabolizable protein on whole body and splanchnic leucine metabolism in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85:2631-2641.

Le Floc'h, N., C. Obled, and B. Sève. 1995. In vivo threonine oxidation rate is dependent on threonine dietary supply in growing pigs fed low to adequate levels. J. Nutr. 125:2550-2562.

Liu, S., G.E. Lobley, N.A. Macleod, D.J. Kyle, X.B. Chen, and E.R. Orskov. 1995. Effect of long-term protein excess or deficiency on whole-body protein turnover in sheep nourished by intragastric infusion of nutrients. Brit. J. Nutr. 73:829-839.

Lobley, G.E. 1992. Control of the metabolic fate of amino acids in ruminants: a review. J. Anim. Sci. 70: 3264-3275.

Lobley, G. E., Connell A., Milne E., Newman A. M., and T. A. Ewing 1994. Protein synthesis in splanchnic tissues of sheep offered two levels of intake. Br. J. Nutr. 71:3-12.

Lobley, G.E., A. Connell, D.K. Revell, B.J. Bequette, D.S. Brown, and A.G. Calder. 1996. Splanchnic-bed transfers of amino acids in sheep blood and plasma, as monitored through use of multiple U-^{13}C-labelled amino acid mixture. Brit. J. Nutr. 75:217-235.

Lobley, G.E., K.D. Sinclair, C.M. Grant, L. Miller, D. Mantle, A.G. Calder, C.C. Warkup, and C.A. Maltin. 2000. The effects of breed and level of nutrition on whole-body and muscle protein metabolism in pure-bred Aberdeen angus and Charolais beef steers. Brit. J. Nutr. 84:275-284.

Lobley, G.E., and H. Lapierre. 2003. Post absorptive metabolism of amino acids. In Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. pp 737-756 (WB Souffrant, CC Metges, Editors) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands..

Lobley, G.E., X. Shen, G. Le, D.M. Bremner, E. Milne, A.G. Calder, S.E. Anderson, and N. Dennison. 2003. Oxidation of essential amino acids by the ovine gastrointestinal tract. Brit. J. Nutr. 89:617-630.

Lobley, G.E. 2007. Protein-energy interactions: horizontal aspects. In Energy and Protein metabolism and Nutrition. Pp 445-461 (I Ortigues-Marty, Editor) EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Lowry, H.L., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Macart, M., A. Koffi, G. Henocque, J.F. Mathieu, and J.C. Guilbaud. 1989. Optimized microturbidimetric assay for fibrinogen. Clin. Chem. 35: 211-214.

MacRae, J.C., A. Walker, D. Brown, and G.E. Lobley. 1993. Accretion of total protein and individual amino acids by organs and tissues in growing lambs and the ability of nitrogen balance techniques to quantitate protein retention. Anim. Prod. 57:237-245.

Maxwell, J.L., L. Terracio, T.K. Borg, J.W. Baynes, and S.R. Thorpe. 1990. A fluorescent residualizing label for studies on protein uptake and catabolism in vivo and in vitro. Biochem. J. 267:155-162.

Obled, C., I. Papet, and D. Breuillé. 2002. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 5:189-197.

Ortigues I., and M. Doreau. 1995. Responses of the splanchnic tissues of ruminants to changes in intake: absorption of digestion end products, tissue mass, metabolic activity and implications to whole animal energy metabolism. Ann. Zoot. 44:321-346.

Pacheco, D., C.G. Schwab, R. Berthiaume, G. Raggio, and H. Lapierre. 2006. Comparison of net portal absorption with predicted flow of digestible amino acids: scope for improving current models? J. Dairy Sci. 89:4747-4757

Raggio, G., G.E. Lobley, S. Lemosquet, H. Rulquin, and H. Lapierre. 2006. Effect of casein and propionate supply on whole body protein metabolism in lactating dairy cows. Can. J. Anim. Sci. 86:81-89.

Raggio, G., G.E. Lobley, R. Berthiaume, D. Pellerin, G. Allard, P. Dubreuil, and H. Lapierre. 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 90:352-359.

Reynolds CK (2006). Splanchnic amino acid metabolism in ruminants In Ruminant physiology : Digestion, metabolism and impact on gene expression, immunology and stress. pp 225-248 (K Sejrsen, T Hvelplund & MO Nielsen, Editors), Wageningen Academic Publisher The Netherlands.

Ruot, B., D. Breuillé, F. Rambourdin, G. Bayle, P. Capitan, and C. Obled. 2000. Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. Am. J. Phys. 279:E244-251.

Savary, I., E. Debras, D. Dardevet, F. Rambourdin, M.P. Vasson, C. Obled, and J. Grizard. 2001. Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to dexamethasone in aging rats. Mec. Ag. Dev. 122:105-120.

Savary-Auzeloux, I., L. Majdoub, N. LeFloc'h, and I. Ortigues-Marty. 2003a. Ryegrass-Based diet and barley supplementation : Partition of nitrogenous nutrients among splanchnic tissues and hind limb in finishing lambs. J. Anim. Sci. 81:3160-3173.

Savary-Auzeloux, I., L. Majdoub, N. LeFloc'h and I. Ortigues-Marty. 2003b. Effects of intraruminal propionate supplementation on nitrogen utilisation by the portal drained viscera, the liver and the hindlimb in lambs fed frozen rye grass. Brit. J. Nutr. 90:939-952.

Savary-Auzeloux, I., S.O. Hoskin, and G.E. Lobley. 2003c. Effect of intake on whole body plasma amino acid kinetics in sheep. Reprod. Nutr. Dev. 43:117-129.

Taniguchi, K., G.B. Huntington and B.P. Glenn. 1995. Net nutrient flux by visceral tissues of beef steers given abomasal and ruminal infusions of casein and starch. J. Anim. Sci. 73, 236-249.

Van der Schoor, S.R.D., J.B. Van Goudoever, B. Stoll, J.F. Henry, J.R. Rosenberger, D.G. Burrin, and P.J. Reeds. 2001. The pattern of intestinal substrate oxidation is altered by protein restriction in pigs. Gastroenterology 121:1167-1175.

van Goudoever, J.B., B. Stoll, J.F. Henry, D.G. Burrin, and P.J. Reeds. 2000. Adaptative regulation of intestinal lysine metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11620-11625.

Vernet, J., Nozière, P., Sauvant, D., Léger, S. and I. Ortigues-Marty 2005. Regulation of hepatic blood flow by feeding conditions in sheep : a meta-analysis. 11th Seminar of the Sub-Nutrition FAI-CIHEAM on sheep and goat nutrition (8-10 sept). Catalia, Italia.

Volpi, E., P. Lucidi, G. Cruciani, F. Monacchia, G. Reboldi, P. Brunetti, G.B. Bolli, and P. De Feo. 1996. Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. Diabetes 45:1245-1252.

Wray-Cahen, D., J.A. Metcalf, F.R.C. Backwell, B.J. Bequette, D.S. Brown, J.D. Sutton, and G.E. Lobley. 1997. Hepatic response to increased exogenous supply of plasma amino acids by infusion into the mesenteric vein of Holstein-Friesian cows in late gestation. Brit. J. Nutr. 78:913-930.

Yedgar, S., T.E. Carew, R.C. Pittman, W.F. Beltz, and D. Steinberg. 1983. Tissue sites of catabolism of albumin in rabbits. Am. J. Physiol. 244:E101-E107.

Table 1. Composition of the concentrates (#1, #2 and #3) used in the three experimental diets, chemical composition and dry matter allowances of the three concentrates and forage.

	Concentrate			Forage
	#1	#2	#3	(Hay)
Ingredients g/kg of DM (for the concentrate)				
Maize	0	120	560	
Corn starch	545	540	0	
Corn gluten meal	100	40	100	
Soya bean meal 48%	100	40	100	
Sunflower oil	15	20	0	
Rapeseed meal	70	70	70	
Barley	70	70	70	
Molasses	40	40	40	
Bicarbonate	20	20	20	
Minerals & vitamin mix [3]	40	40	40	
Chemical composition (g/kg DM)				
Ash	74	78	75	93
CP	140	111	149	105
Cellulose	34	47	37	308
Starch	536	610	487	
Lipid	20	33	23	
OMd (%) (estimated[4])	88.1	88.5	85.9	56.0
ME MJ/kg DM (Estimated)	13.1	13.2	12.7	8.1
DM allowances (g/d/kg$^{0.75}$)				
Diet C	51.5			22.1
Diet N		51.9		22.4
Diet E			43.0	18.3

Abbreviations: DM, Dry Matter ; CP, Crude Protein ; OMd, Organic Matter digestibility ; ME, Metabolizable Energy

[3] Aliment Mineral poudre 2%, Agro-Base Bourg-en-Bresse, France. (22% Ca, 7.3% Na, 1% Mg, 0.99% S, Fe, Zn, Mn, I, Co, Se and Vitamins A, D, E, B1, B2 B6, B12, PP, K3, folates)

[4] Estimated from Institut National de Recherches Agronomiques feeding system (Jarrige 1989)

Table 2. Body weight, daily weight gain, DM and ME intake and Nitrogen digested by growing lambs (n=6) fed the 3 experimental diets (Control (C), N imbalanced (N) and Energy imbalanced (E)).

	Diet				
	C	N	E	SEM	*P*- value
LW kg	42.2 a	41.7 a	40.7 b	0.30	0.02
ADG, kg/d	0.265 a	0.258 a	0.191 b	0.02	0.07
DM Intake kg/d	1.22 a	1.21 a	0.99 b	0.011	<0.001
Hay	0.365	0.367	0.295	3.61	
Concentrate # 1	0.853				
Concentrate # 2		0.851			
Concentrate # 3			0.693		
ME Intake, MJ/d	14.1 a	14.2 a	11.2 b	0.14	<0.001
Nitrogen Digested g/d	16.2 a	12.4 b	14.7 a	0.80	0.009
Ratio Ndigested / ME intake gN/MJ	1.15	0.87	1.31		

Table 3. Insulin concentration in artery, portal vein and hepatic vein, Leucine and Phenylalanine concentration in artery, portal plasma and blood flows, net leucine and phenylalanine fluxes across the portal drained viscera (PDV), the liver and the total splanchnic tissues (TS) and extraction rate of ^{13}C Leucine and $^{2}H_5$ Phenylalanine across the PDV, the liver and the TS of lambs fed a control (C), Nitrogen imbalanced (N) and Energy imbalanced diets.

			C	N	E	SEM	*P*-value
				nUI/L			
Insulin	Artery		66.2	62.5	49.5	5.9	0.17
	Portal vein		89.5 a	87.2 a	67.3 b	6.3	0.07
	Hepatic vein		73.1	78.2	64.1	6.9	0.39
				µmol/L			
Phenylalanine	Artery		93.1	89.6	88.9	2.90	0.52
Leucine	Artery		201.4 a	167.3 b	193.4 a	4.59	0.002
				L/h			
Portal flow	Blood		125.3 a	116.9 b	106.4 c	1.99	0.001
	Plasma		88.7 a	82.0 b	73.6 c	1.44	<0.001
				mmol/h			
Net flux	Phenylalanine	PDV	1.91	1.56	1.67	0.12	0.16
		Liver	-2.02 a	-1.52 b	-1.61 b	0.11	0.03
		TS	-0.11	0.04	0.05	0.07	0.24
	Leucine	PDV	3.53 a	2.63 b	2.82 b	0.23	0.05
		Liver	-0.68	-0.68	-0.43	0.13	0.34
		TS	2.85 a	1.95 b	2.39 ab	0.22	0.06
				%			
Tracer extraction rate	Phenylalanine	PDV	8.53	9.56	7.99	1.58	0.78
		Liver	27.55 a	14.64 b	17.41 b	2.66	0.02
		TS	36.08 a	24.20 b	25.40 b	2.56	0.02
	Leucine	PDV	15.63	13.21	15.10	0.97	0.24
		Liver	3.41	5.05	4.79	1.24	0.62
		TS	19.03	18.25	19.89	1.36	0.71

Values are means ± SEM, n=6

Table 4. Plasma Leucine and Phenylalanine irreversible loss rate (ILR) and equivalent protein fluxes (PrF) for lambs fed a control (C), a nitrogen imbalanced (N) or an energy imbalanced (E) diet.

				C	N	E	SEM	*P*-value
				mmol/h				
			Precursor pool					
ILR	Phenylalanine	Whole body	A	3.22 a	2.90 b	2.82 b	0.08	0.02
		PDV	A	0.71	0.71	0.49	0.12	0.33
		Liver	A	2.24 a	1.17 b	1.20 b	0.20	0.008
			PV	2.98 a	1.57 b	1.63 b	0.25	0.004
			HV	3.59 a	1.60 b	1.67 b	0.34	0.004
		TS	A	2.96 a	1.88 b	1.69 b	0.20	0.004
	Leucine	Whole body	A	7.70 a	6.74 b	6.46 b	0.20	0.006
		PDV	A	2.79 a	1.79 b	2.14 b	0.23	0.04
		Liver	A	0.64	0.85	0.87	0.18	0.63
			PV	0.89	1.15	1.20	0.26	0.67
			HV	1.04	1.22	1.29	0.28	0.81
		TS	A	3.43	2.65	3.00	0.31	0.25
				g/d				
PrF[1]	Phenylalanine	Whole body	A	374.4 a	338.0 b	328.2 b	9.0	0.02
	Leucine	Whole body	A	390.4 a	341.8 b	327.8 b	10.1	0.006

Values are means ± SEM, n=6

[1] artery (A), portal vein (PV) or hepatic vein (HV) used for the calculation of the phenylalanine or leucine ILR

[2]For PrF calculations, see Material and Methods section

Figure 1. Contribution (%) of the portal drained viscera (PDV), the liver and non-splanchnic tissues to whole body irreversible loss rate (ILR) of phenylalanine and leucine in lambs fed a Control, a Nitrogen imbalanced or an Energy imbalanced diet.
a,b and c show significant differences between the diets for the contribution of PDV, liver and other tissues ILR to the whole body ILR

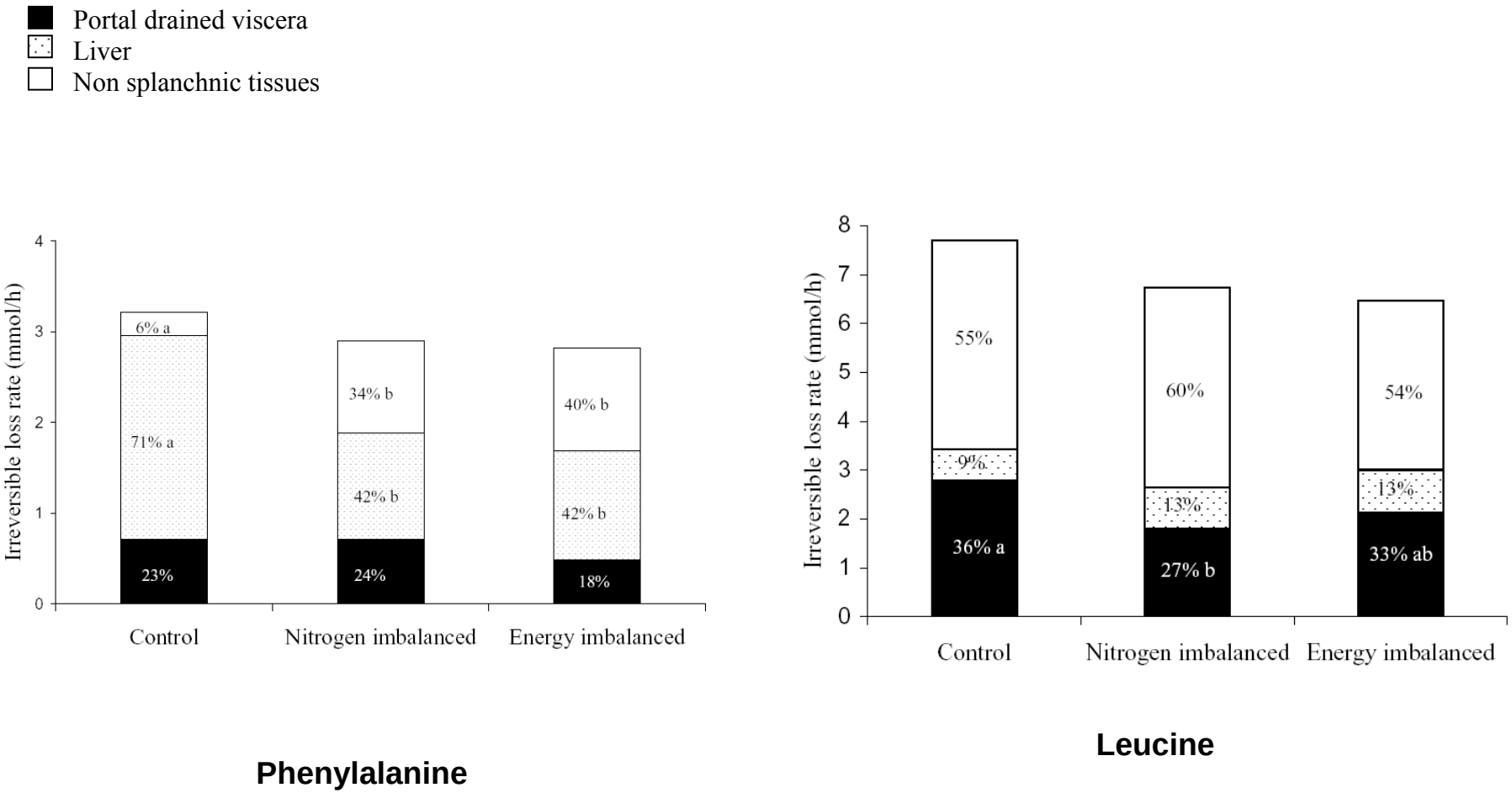


Table 5. Concentration of total plasma proteins, albumin, fibrinogen and fractional and absolute synthesis rate of total plasma proteins and albumin in lambs fed a control (C), N imbalanced and E imbalanced diets

		Vessel	C	N	E	SEM	*P*-value
				g/L			
Plasma concentration	Total proteins	A	65.79	65.49	65.83	0.51	0.88
		PV	64.75	64.56	64.91	0.51	0.90
		HV	65.20	66.27	64.94	0.43	0.13
	Albumin	A	31.39 a	31.21 a	32.38 b	0.34	0.08
		PV	30.82	30.75	31.37	0.40	0.50
		HV	30.95	30.90	31.73	0.27	0.10
	Fibrinogen	A	3.59 ab	4.21 a	3.29 b	0.26	0.10
		PV	3.47	4.10	3.19	0.27	0.11
		HV	3.50 ab	4.26 b	3.21 a	0.28	0.07
				%/d			
FSR	Total proteins		11.37 a	11.10 a	10.17 b	0.30	0.05
	Albumin		11.89 a	12.02 a	10.26 b	0.42	0.03
				g/d			
ASR	Total proteins		13.99 a	12.76 a	11.23 b	0.54	0.02
	Albumin		6.99 a	6.55 a	5.54 b	0.32	0.03

Values are means ± SEM, n=6
Hepatic vein free Leucine enrichments used as the precursor pools

Publication n° 3

Mise au point de la mesure de la synthèse protéique, de la néoglucogenèse et de l'oxydation des acides aminés dans des explants de foie incubés *ex vivo* avec des concentrations physiologiques en nutriments dans le milieu d'incubation

Guillaume Kraft, Dominique Gruffat, Dominique Dardevet, Didier Rémond, Isabelle Ortigues-Marty et Isabelle Savary-Auzeloux.

En préparation pour Cahier des Techniques INRA

Résumé : Chez les Ruminants, le foie, situé à l'interface entre l'absorption des acides aminés (AA) par les tissus digestifs et leur utilisation par les tissus périphériques (muscle, mamelle), joue un rôle prédominant dans la biodisponibilité en AA pour la croissance ou la production de lait. Cependant, la compréhension des mécanismes de régulation nutritionnelle de l'utilisation des AA par le foie est délicate car suite à une modification du régime, les concentrations en nutriments et les hormones afférents au foie sont modifiées de manière conjointe. Des approches utilisant la culture d'hépatocytes ou d'explants *in vitro* peuvent être des alternatives intéressantes aux études *in vivo* car dans ce cas, les milieux d'incubation des hépatocytes sont parfaitement maîtrisés et modulables. Cependant, dans la littérature, des concentrations supra-physiologiques en nutriments sont très fréquemment utilisées et peuvent stimuler diverses voies d'utilisation des AA au niveau hépatique (ex : uréogenèse).

L'objectif de ce travail a donc été la mise au point de la mesure de l'utilisation des AA dans diverses voies du métabolisme hépatique lors de l'incubation d'explants de foie de moutons dans un milieu contenant des concentrations physiologiques en nutriments et pas d'hormones. Le modèle d'explants de foie (à la différence des hépatocytes isolés) permet de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo* (architecture hépatique conservée).

Nous avons donc montré que les explants restaient dans des conditions de viabilité satisfaisantes lorsqu'ils sont incubés dans le milieu contenant des concentrations physiologiques en nutriments et aucune hormone. Les conditions de découpe des explants, d'incubation, d'oxygénation ont été optimisées pour améliorer la viabilité des explants. La mise au point de la mesure de la vitesse de synthèse des protéines constitutives et exportées par la méthode de surcharge a ensuite été réalisée, ainsi que la mesure de la vitesse de synthèse de protéines particulières (albumine, fibrinogène, transferrine). La néoglucogenèse à partir du propionate et de l'alanine (précurseurs importants de la néoglucogenèse) ainsi que l'oxydation de ces deux composés a été également optimisée. Nous disposons donc actuellement d'un outil d'incubation d'explants de foie *ex vivo* fiable permettant de mesurer le devenir métabolique des AA au niveau du foie dans des conditions d'incubation minimales utilisant des concentrations physiologiques en nutriments.

Mise au point de la mesure de la synthèse protéique, de la néoglucogenèse et de l'oxydation des acides aminés dans des explants de foie incubés *ex vivo* en utilisant des concentrations physiologiques en nutriments dans le milieu d'incubation

G. Kraft[*], D. Gruffat[*], D. Dardevet[†], D. Rémond[†], I. Ortigues-Marty, I[*]. Savary-Auzeloux[*1]

[1] *INRA Theix, Unité de Recherches sur les Herbivores, UR 1213, 63122 St Genes Champanelle*
[†]*INRA Theix, Unité de Nutrition Humaine UMR 1019, 63122 St Genes Champanelle*

[1]Auteur correspondant: Savary-Auzeloux Isabelle
INRA
Unité de Recherches sur les Herbivores, UR 1213
Equipe Nutriments et Métabolismes
Site de Theix
63122 Saint-Genès-Champanelle
FRANCE
Tel: (33) (0)4 73 62 47 32
Fax: (33) (0)4 73 62 46 39
E-mail: Savary@clermont.inra.fr

Titre court : Métabolisme des acides aminés dans des explants de foie

Mots clés : ex vivo, foie, protéosynthèse, néoglucogenèse, oxydation

Résumé

Chez les Ruminants, le foie, situé à l'interface entre l'absorption des acides aminés (AA) par les tissus digestifs et leur utilisation par les tissus périphériques (muscle, mamelle), joue un rôle prédominant dans la biodisponibilité en AA pour la croissance ou la production de lait. Cependant, la compréhension des mécanismes de régulation nutritionnelle de l'utilisation des AA par le foie est délicate car suite à une modification du régime, les concentrations en nutriments et les hormones afférents au foie sont modifiées de manière conjointe. Des approches utilisant la culture d'hépatocytes ou d'explants *in vitro* peuvent être des alternatives intéressantes aux études *in vivo* car dans ce cas, les milieux d'incubation des hépatocyte sont parfaitement maîtrisés et modulables. Cependant, dans la littérature, des concentrations supra-physiologiques en nutriments sont très fréquemment utilisées et peuvent stimuler diverses voies d'utilisation des AA au niveau hépatique (ex : uréogenèse).

L'objectif de ce travail a donc été la mise au point de la mesure de l'utilisation des AA dans diverses voies du métabolisme hépatique lors de l'incubation d'explants de foie de moutons dans un milieu contenant des concentrations physiologiques en nutriments et pas d'hormones. Le modèle d'explants de foie (à la différence des hépatocytes isolés) permet de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo* (architecture hépatique conservée).

Nous avons donc montré que les explants restaient dans des conditions de viabilité satisfaisantes lorsqu'ils sont incubés dans le milieu contenant des concentrations physiologiques en nutriments et aucune hormone. Les conditions de découpe des explants, d'incubation, d'oxygénation ont été optimisées pour améliorer la viabilité des explants. La mise au point de la mesure de la vitesse de synthèse des protéines constitutives et exportées par la méthode de surcharge a ensuite été réalisée, ainsi que la mesure de la vitesse de synthèse de protéines particulières (albumine, fibrinogène, transferrine). La néoglucogenèse à partir du propionate et de l'alanine (précurseurs importants de la néoglucogenèse) ainsi que l'oxydation de ces deux composés a été également optimisée. Nous disposons donc actuellement d'un outil d'incubation d'explants de foie *ex vivo* fiable permettant de mesurer le devenir métabolique des AA au niveau du foie dans des conditions d'incubation minimales utilisant des concentrations physiologiques en nutriments.

Introduction

Le foie utilise les acides aminés (AA) dans de nombreuses voies métaboliques chez les mammifères: synthèse/dégradation protéique, catabolisme (oxydation et uréogenèse), néoglucogenèse, synthèse de molécules particulières (Lobley et Milano, 1997). Du fait des nombreuses voies métaboliques pouvant utiliser les AA, la réponse du foie en terme d'utilisation nette des AA dans diverses conditions nutritionnelles chez les ruminants (niveau d'alimentation, nature de la ration) est délicate à interpréter (Lobley et coll., 2000). En particulier, des études récentes de notre laboratoire ont montré que suite à une diminution de l'apport d'énergie (E) ou d'azote (N) stricts dans la ration d'agneaux relativement à un régime témoin (T : apport adéquat d'énergie et d'azote pour une croissance de 200 g/j, INRA, 1989), les prélèvements nets hépatiques en AA essentiels étaient diminués (Kraft et coll., 2008a). La diminution de prélèvement net d'AA dans le cas des régime N et E *vs* T s'explique *in vivo* par une baisse de la synthèse des protéines exportées hépatique dans le régime E mais pas dans le régime N (Savary-Auzeloux et coll, 2008a). Ainsi, pour expliquer la baisse du bilan net en AA hépatiques, les voies métaboliques inhibées sont différentes pour les régimes N et E.

Une des difficultés des études *in vivo* est qu'il est difficile de mesurer simultanément plusieurs voies métaboliques d'utilisation des AA. De plus, les mécanismes de régulation de l'activité des voies métaboliques sont difficiles à mettre en évidence. En effet, l'apport de nutriments et hormones au foie est très différent et diversement modulé entre les régimes T, N et E (Kraft et coll., 2008a). Pour tenter d'aller plus loin dans les mécanismes de régulation de l'utilisation des AA dans diverses voies métaboliques hépatiques ainsi que les adaptations potentielles du foie lors de l'administration des régimes N et E aux agneaux, nous donc avons mis au point une méthodologie d'étude du métabolisme hépatique des AA *in vitro*. Par ces méthodes *in vitro*, il est possible de maîtriser totalement le milieu d'incubation, et donc les facteurs de régulations du des voies métaboliques.

Afin que les cellules hépatiques puissent conserver leurs adaptations métaboliques mises en place lors de l'ingestion des différents régimes testés *in vivo*, nous avons décidé de travailler sur explants tissulaires. La culture d'explants *ex vivo* était déjà maîtrisée dans notre laboratoire pour l'étude du métabolisme des acides gras dans le foie (Graulet et coll., 1998 ; Gruffat-Mouty et coll., 1999). Afin de rester aussi proche que possible des conditions physiologiques et éviter toute stimulation des voies métaboliques mesurées par l'apport de nutriments dans le milieu, nous avons incubé nos explants dans un milieu de culture dont les concentrations en sels étaient minimales (Milieu Krebs-Henseleit) et dont les concentrations

en nutriments étaient proches des concentrations portales retrouvées chez nos agneaux (Kraft et coll., 2008a). En effet, l'apport de nutriments dans le milieu d'incubation des cellules hépatiques est connu pour avoir un impact direct (dose-dépendant) sur le catabolisme des AA et l'uréogenèse par exemple (Leng & Annison, 1963; Luo et coll., 1995).

Ainsi, une optimisation du système d'incubation d'explants de foie utilisé dans le laboratoire (Graulet et coll., 1998) a dû être réalisée. Une vérification des paramètres de viabilité des explants dans un milieu d'incubation utilisant des concentrations physiologiques de nutriments était nécessaire car la très grande majorité des systèmes d'incubation d'hépatocytes ou explants sont réalisés avec des doses supra-physiologiques en nutriments (Graulet et coll., 1998; Gruffat-Mouty et coll., 1999; Birchenall-Sparks et coll. 1985; Donkin & Armentano, 1993; Overton et coll., 1999). Nous avons également adapté le milieu d'incubation, les conditions d'oxygénation et la découpe des explants pour l'étude du métabolisme des AA. Enfin, nous avons mis au point la mesure de certaines voies métaboliques d'utilisation des AA et propionate : synthèse des protéines constitutives et exportées (protéines particulières inclues), synthèse de glucose et oxydation à partir de certains précurseurs (propionate et alanine).

Matériels et Méthodes

Animaux expérimentaux

Les foies provenant de 10 moutons INRA 401 (abattus dans le cadre d'autres expérimentations) ont servi à mettre au point les conditions d'incubation des explants. Après exsanguination, le foie des moutons était récupéré et un lobe, découpé sur place, était placé dans une solution d'eau physiologique (NaCl 0,9%) à 4°C. Le foie était ensuite immédiatement transporté de l'abattoir à la salle d'incubation des explants. Moins de 15 minutes s'écoulaient entre l'abattage et la découpe des explants. Cette découpe a fait l'objet d'une mise au point qui sera détaillée dans les résultats.

Conditions d'incubation

Deux systèmes d'incubations décrits par Graulet et coll. (1998) (explants de foie de bovins) et Dardevet et coll. (1996) (incubation de muscle épitrochléaris de rats) ont été comparés. Brièvement le système développé par Graulet et coll. (1998) consiste à mettre les explants dans une boite de Petri contenant le milieu d'incubation. Les boites de Petri sont ensuite placées dans une enceinte hermétique non agitée et dont la température (38°C) et l'oxygénation (95 % O_2, 5 % CO_2) sont contrôlées (Figure 1a).

Dans le système utilisé par Dardevet et coll. (1996), les explants sont placés dans le milieu d'incubation placé dans des flacons fermés hermétiquement par un bouchon en polypropylène (Figure 1b). Ce bouchon permet de maintenir l'intérieur du flacon en surpression d'oxygène (95 % O_2, 5% CO_2). Le flacon est placé dans un bain marie à 38°C et sous agitation.

Milieux d'incubation

Deux milieux d'incubation ont été testés. Un milieu du commerce, RPMI (Ref R0883; Sigma, Steinheim, Allemagne) (utilisé par Graulet et coll., 1998) et un milieu préparé dans le laboratoire (dont les concentrations en sels sont publiées par Krebs-Hesenleit (1932)) utilisé par Dardevet et coll. (1996). Cependant, concernant le milieu Krebs Henseleit, nous avons adapté les concentrations en AA et la nature des nutriments énergétiques utilisés par Dardevet et coll. (1996) (propionate en remplacement du glucose car notre étude concernait le ruminant) afin que les concentrations en nutriments utilisés dans le milieu d'incubation soient identiques aux concentrations portales en nutriments observées chez l'agneaux (Luo et coll., 1995; Kraft et coll., 2008a). Enfin, et toujours pour le milieu Krebs Henseleit, de l'Hépès et de l'albumine ont été ajoutés dans le milieu pour permettre de tamponner le pH à 7,4. Le

Tableau 1 présente la composition finale de ce milieu Krebs-Henseleit et celle du milieu RPMI testés.

Dans tous les cas, les explants étaient pré-incubés entre 50 et 70 minutes suite à la découpe dans le même milieu et les mêmes conditions qui ceux utilisés lors de l'incubation proprement dite.

Mesure de la viabilité

La mesure de la viabilité a consisté en la mesure de l'activité Glucose 6-phosphate dehydrogénase (**G6PDH**; EC 1.1.1.49) dans les hépatocytes (Chilliard et coll., 1991; Abd Ellah et coll., 2004) dans les diverses conditions d'incubation testées. Brièvement, après broyage des explants dans un tampon Tris-EDTA (30m*M* Tris, 0.9m*M* EDTA) (pH 7,4), l'activité de la G6PDH du broyat est estimé par une méthode colorimétique (apparition du $NADPH,H^+$) (Glock & McLean, 1953). Cette mesure de l'activité G6PDH a été complétée par la mesure du ratio ADN / protéines dans l'explant avant et après incubation. Ce ratio est également un critère de survie des explants (Donkin & Armentano, 1993). La mesure des quantités d'ADN est décrite par Labarca & Paigen (1980) et le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Lowry et coll. (1951).

Incorporation d'un AA dans les protéines constitutives

La mesure de la cinétique d'incorporation d'un AA dans les protéines constitutives de l'explant peut également être considérée comme un critère très sensible de la viabilité des explants hépatiques. Lors des essais et quand la technique utilisée ne sera pas précisée, nous avons mesuré la synthèse protéique après incubation des explants durant 2 heures dans un milieu d'incubation contenant une surcharge en valine [U-^{14}C] (GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni) (concentration finale en Valine : 2m*M*, Activité spécifique 8,3 kBq / µmol). La valine est communément utilisée, comme la phénylalanine, pour mesurer la synthèse protéique *in vivo* et *in vitro* par la méthode de surcharge (Obled et coll., 1989). Après broyage des explants (200mg dans 2mL de tampon Tris-NaCl (Tris 25mM, NaCl 50mM, pH 8), les protéines sont précipitées par 5mL de l'acide trichloracetique (TCA) à 10% (p/v), puis le culot est rincé par 3 lavages successifs au TCA 5% (p/v) (Dardevet et coll., 1996). Le culot protéique est ensuite dissous dans de la soude (1 mol/L) puis neutralisé avec de l'acide chlorhydrique (1 mol/L). La radioactivité présente dans l'extrait protéique est mesurée par scintillation liquide (TriCarb 2100 TR, Packard Bioscience). Dans ces essais, l'incorporation de l'AA du milieu dans les protéines est exprimée en dpm/h/g d'explant.

Mesure des voies métaboliques

- La synthèse protéique

Comme décrit ci-dessus, la technique servant à mesurer la synthèse des protéines utilise une incubation des explants avec de la valine [U-^{14}C] ajoutée en surcharge dans le milieu (2 m*M*). Toutefois, d'autres AA marqués ont été utilisés au cours des essais :

La leucine [1-^{13}C] (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, Etats-Unis) a été utilisée pour mesurer l'évolution de l'enrichissement isotopique intracellulaire par spectrométrie de masse (Trace GC / Automass Multi, Thermofinnigan, Courtaboeuf, France). Cet essai a permis de mesurer l'évolution de l'enrichissement isotopique dans les AA libres tissulaires des explants suite à l'administration de l'AA marqué à dose traceuse ou en surcharge.

La méthionine [^{35}S] (GE Healthcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni) a été utilisée pour la mesure de la synthèse de protéines spécifiques. Du fait de la quantité faible en protéines spécifiques que nous envisagions d'étudier, la valine [U-^{14}C] n'était pas adaptée car cet isotope est onéreux (à l'achat et à l'élimination) et les doses de radioactivité nécessaires importantes. L'utilisation de la méthionine [^{35}S] permet l'incorporation d'une plus grande quantité de radioactivité dans les protéines à un coût moindre. Les incubations étaient plus longues (4 heures) pour permettre un incorporation plus importante de méthionine [^{35}S] dans les protéines individuelles. La technique de la surcharge a également été utilisée mais avec une activité spécifique augmentée (concentration finale en méthionine : 200 µ*M*, Activité spécifique 18,5 MBq/µmol de méthionine). Cependant le désavantage de l'utilisation du ^{35}S est le temps de décroissance plus rapide du ^{35}S relativement au ^{14}C, ce qui nécessite de traiter les échantillons rapidement.

- Les protéines spécifiques par SDS PAGE

La méthionine [^{35}S] est donc utilisée pour mesurer la vitesse de synthèse des protéines spécifiques. Après 4h d'incubation, les protéines présentes dans le milieu sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante (SDS-PAGE). Cette technique a été décrite par Laemmli (1970) et Gruffat-Mouty et coll. (1999). Des adaptations concernant le gradient d'acrylamide utilisé ont été réalisées. Après migration (16h à 60 V), et coloration au bleu de Coomasie, les bandes protéiques d'intérêt étaient découpées du gel et l'acrylamide était solubilisée dans 1mL H_2O_2. Puis la radioactivité était déterminée par scintillation liquide avec un compteur β (TriCarb 2100 TR, Packard Bioscience).

Lorsque les conditions de séparation des protéines ont été optimisées, une séparation de protéines d'explants en absence de radioactivité a été réalisée. Les bandes protéiques d'intérêt ont également été solubilisées puis analysées par spectrométrie de masse (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight (MALDI – ToF, Voyager DE-Pro, Perseptive Biosystems, Farmingham, MA, USA)) comme décrit par Morzel et coll. (2004). Cette analyse nous a confirmé la présence de la protéine d'intérêt dans la bande découpée.

- *Néoglucogenèse*

Les précurseurs de la néoglucogenèse utilisés dans ces essais sont le propionate [1-^{14}C] (MP Biomedicals, Eschwege, Allemagne) et l'alanine [U-^{14}C] (GE Heathcare, Buckinghamshire, Royaume-Uni). Nous avons mesuré l'incorporation de ces deux précurseurs (individuellement) dans le glucose présent dans l'explant et excrété dans le milieu par l'explant. Après 1h à 4h d'incubation en présence de ces précurseurs, les milieux et les explants étaient congelés jusqu'à analyse. Le jour de l'analyse, les explants étaient broyés dans la totalité du milieu. L'étape la plus délicate consiste à séparer le glucose produit à partir du précurseur marqué des autres métabolites produits pouvant être radioactifs. Le principe de la technique de Mills et coll. (1981) et Azain et coll. (1999) consiste à déprotéiniser l'extrait (explants broyés dans le milieu) par $Ba(OH)_2$ (0,4 *M*), puis à capter les molécules chargées sur deux résines échangeuses d'ions. Une autre méthode développée au laboratoire (Majdoub, 2002) qui consiste à déprotéiniser l'extrait par l'acide perchlorique (0,4 *M*) puis à le neutraliser avec K_2CO_3 (3,2 *M*) a également été testée. Les résines échangeuses d'ions étaient les même pour les deux techniques : une première résine capte les anions comme l'acétate, le lactate et le propionate (AG 1-X8, Biorad, Hercules, CA, USA) et l'autre résine capte les cations comme les acides aminés (AG 50W-X8, Biorad, Hercules, CA, USA). Le glucose non chargé, contenu dans l'extrait peut ainsi être séparé de son précurseur (propionate ou alanine chargés). L'utilisation d'un étalon interne, le glucose [1-^{3}H] (Sigma, Steinheim, Allemagne) ajouté dès le broyage dès la déprotéinisation, permet de prendre en compte les rendements de séparation du glucose et les pertes de glucose sur les colonnes. La déprotéinisation ainsi que la neutralisation et la séparation sur colonne fera l'objet de mise au point décrite dans la dernière partie.

- *Oxydation*

La mesure de l'oxydation du propionate [1-^{14}C] et de l'alanine [U-^{14}C] est possible grâce au piégeage du CO_2 produit par de l'hydroxide hyamine (MP Biomedicals, Illkirch,

France) placé dans une nacelle accrochée au bouchon du flacon. Le $^{14}CO_2$ radioactif piégé par l'hydroxide hyamine est directement plongé dans le liquide scintillant et compté avec un compteur β (TriCarb 2100 TR, Packard Bioscience).

- *Statistiques*

Les valeurs sont présentées en moyennes ± écarts types. Les comparaisons de moyennes ont été réalisées grâce à un test *t* de Student. Une différence est considérée comme significative pour $P<0,05$.

Résultats et discussion

Viabilité des explants de foie

La viabilité des explants (mesurée par l'activité de la G6PDH, le taux d'incorporation de la valine marquée dans les protéines, le rapport ADN/protéines) a été testée après évaluation des critères d'incubation des explants suivants : milieu d'incubation avec concentrations « physiologiques » en nutriments ou milieu du commerce, système d'incubation (bain marie agitant *vs* boîte à gants), mode de découpe des explants.

- *Le milieu d'incubation*

La viabilité des explants de foie a été mesurée après incubation dans le milieu minimum Krebs Henseleit additionné d'un mélange d'AA et de propionate à concentrations « physiologiques » ainsi que dans le milieu du commerce RPMI. Le Tableau 2 nous montre que l'activité de la G6PDH n'était pas diminuée lors de l'utilisation du milieu Krebs Henseleit. Ceci implique que le milieu contenant les concentrations physiologiques en nutriments suffit à assurer la viabilité des explants de foie pour une durée au moins égale à 4 heures. En effet, l'activité de la G6PDH reste relativement stable durant 4 heures quel que soit le milieu utilisé. Par contre, après 16 heures d'incubation, la valeur est diminuée de 72% ($P = 0,03$). De même le taux d'incorporation de Valine [U-^{14}C] dans les protéines de l'explant (Tableau 3) est identique suite à 2 heures d'incubation dans le milieu Krebs-Henseleit ou RPMI, suggérant, ici encore, qu'un milieu RMPI n'est pas nécessaire pour préserver les critères de viabilité que nous avons testés.

Les hormones et notamment l'insuline sont connues pour moduler la synthèse protéique (Tesseraud et coll., 2007) et la néoglucogenèse (Donkin et coll., 1997). Pour éviter d'obtenir un effet direct de l'insuline si elle est présente dans le milieu sur les explants de foie

et une réponse/sensibilité éventuellement différente à l'insuline des explant (les animaux nourris avec nos divers régimes pourraient présenter en effet une sensibilité ou réponse à l'insuline variées), aucune hormone ne sera présente dans nos milieux de culture. D'autres études *in vitro* étudiant le métabolisme des AA n'ont pas ajouté d'hormones (ni insuline, ni glucagon) (Birchenall-Sparks et coll., 1985; Lomax et coll., 1986; Emmison et coll. 1991; Luo et coll., 1995).

Le dernier test effectué concernant l'optimisation des milieux d'incubation est la substitution du glucose présent traditionnellement dans les milieux du commerce (par exemple le milieu RPMI) par le propionate. La concentration de propionate testée est, comme pour les concentrations en AA utilisées, la concentration de propionate observée en veine porte chez l'agneau (Savary-Auzeloux et coll., 2008b). Le ruminant absorbe en effet des quantités faibles de glucose au niveau digestif (Majdoub, 2002). Cependant, comme les autres espèces mammifères, les tissus périphériques et le cerveau utilisent le glucose comme nutriments énergétique (Brockman, 1993 ; Majdoub, 2002). Par conséquent, le ruminant synthétise son glucose dans le foie à partir de divers précurseurs (le propionate étant le précurseur majoritairement utilisé par le foie des ruminants) (Danfaer et coll., 1995).

Les études sur hépatocytes issus de ruminants incubés *in vitro* ont utilisé divers nutriments énergétiques dans les milieux d'incubation : propionate (Gill et coll. 1985 : Emmison et coll., 1991), glucose (Knapp et coll., 1992), acétate (Mutsvangwa et coll., 1997) ou mélange d'acides gras volatils (Luo et coll., 1995). Le tableau 4 nous montre la comparaison de l'incorporation de valine [^{14}C] dans les protéines constitutives de l'explants après 2h d'incubation dans un milieu minimum Krebs Henseleit dont la source énergétique était soit du glucose soit du propionate. Comme aucune différence significative n'a été notée (P = 0.36) dans l'incorporation en valine [^{14}C] entre le milieu Krebs + propionate et Krebs + glucose, nous utiliserons le propionate dans le milieu d'incubation.

- Le mode et système d'incubation

Les modes d'incubation de foie sont très divers et différentes techniques sont disponibles : homogénats de tissu permettant de séparer différents compartiments cellulaires par des centrifugations différentielles (Hogeboom et coll. 1948; Borsook et coll. 1949), isolement d'hépatocytes grâce à une perfusion de collagénase et de hyaluronidase (Howard et coll., 1967; Forsell et coll., 1985); culture en mono couche (Donkin & Armentano, 1993); foie perfusé (Haussinger, 1983; Ali et coll., 2000). Une autre technique consiste en la mise en

survie d'explants de foie. Pour la première fois décrite par Krebs & Henseleit (1932), cette technique permet de conserver la structure des cellules et les connexions entre elles (Olinga et coll., 1997). Pour cela, le foie doit être découpé en fines lamelles afin de permettre les échanges en nutriments et en gaz et être mises en survie dans des conditions proches des conditions physiologiques (température, osmoralité, oxygénation…). Cette méthode est donc plus proche des conditions *in vivo* que les techniques de culture classiques ; les cellules sont incubées dès l'abattage de l'animal et les voies métaboliques d'intérêt mesurées dans les quelques heures suivant la mise en culture. Ainsi, les adaptations métaboliques mises en place dans le foie durant la vie de l'animal persistent et peuvent être mises en évidence dans ce types explants (Graulet, 1999). De plus, cette technique était déjà utilisée dans le laboratoire pour étudier le métabolisme des lipides et leur sécrétion sous forme de VLDL par le foie des ruminants (Graulet et coll. 1998; Gruffat-Mouty et coll., 1999). Le principal désavantage de la mise en survie des explants est que ceux-ci ne peuvent être maintenus en état de viabilité que quelques heures, à la différence de la culture cellulaire classique qui permet de maintenir des hépatocytes fonctionnels pour des durées plus longues (supérieures à plusieurs jours, Donkin & Armentano, 1993).

Comme précisé dans le matériel et méthodes, nous avons testé deux systèmes d'incubation d'explants (Figures 1a et 1b). Le premier système a été développé par Graulet et coll. (1998) et le deuxième est utilisé par Dardevet et coll. (1996). L'incorporation de valine [U-^{14}C] dans les protéines des explants a été mesurée dans les deux conditions et, comme le montre le Tableau 4, le système utilisé par Dardevet et coll. (1996) a permis d'obtenir des valeurs d'incorporation en valine [U-^{14}C] dans les protéines d'explant environ 4 fois supérieures aux valeurs obtenues avec le système de Graulet et coll (1998). L'absence d'agitation dans le système de Graulet et coll (1998) pourrait expliquer les différences constatées. En effet, l'oxygénation et l'agitation se révèlent être des facteurs essentiels pour le maintien des activités métaboliques dans les explants (Smith et coll., 1985).

- La découpe et la taille des explants

Graulet et coll. (1998) découpent les foies en petits cubes de 2 à 3 mm de section. Afin de favoriser les échanges en nutriments et en oxygène dans les cellules des explants, nous avons voulu tester l'impact d'une découpe en fines tranches de moins d'1 mm d'épaisseur. Des appareillages de découpe de tissus en tranche fine sont d'ailleurs utilisés par certains auteurs (Fisher et coll., 1995).

Comme nous le montre le Tableau 4 seule une différence numérique existe dans l'incorporation de la valine [U-^{14}C] dans les protéines d'explants découpés en cube ou en fines tranches (P = 0,24). Cependant, bien que non significativement différente, l'incorporation est 1,5 fois supérieure dans le cas de la découpe en tranches fines; nous avons donc utilisé ce type de découpe par la suite.

En conclusion, le système d'incubation sous forme de fines lamelles incubées dans des flacons placés dans un bain marie agitant et dont le milieu de culture est un milieu Krebs-Henseleit additionné de concentrations physiologiques en AA et en propionate permet de maintenir la viabilité des explants sur une durée d'au moins 4 heures. Les différentes mesures présentées précédemment ont été complétées au cours de l'expérimentation par la mesure du ratio ADN/protéines de l'explant avant et après incubation. Ces valeurs n'étaient pas influencées par la durée d'incubation (résultats présentés dans la publication n°4; Kraft et coll., 2008b).

<u>Choix des conditions d'incubation pour la mesure de la synthèse protéique, néoglucogenèse et oxydation.</u>

- Utilisation de la méthode de surcharge pour étudier la synthèse protéique

La valine et la phénylalanine marquées sont communément utilisées pour la mesure de la synthèse protéique *in vivo* et *in vitro* (Obled et coll., 1989). Ces deux AA marqués sont relativement moins chers que les autres AA et, à l'inverse de la leucine, n'ont pas effet signal direct sur la synthèse protéique (Anthony et coll., 2001). Pour l'étude de la synthèse protéique, la surcharge en AA (Mc Nurlan et coll., 1979) est fréquemment utilisée *in vivo* et *in vitro*. Garlick et coll. (1980) et Smith et coll. (1998) ont montré que l'injection d'un AA en surcharge n'induisait pas de modification de la synthèse protéique *in vivo* par rapport à la méthode de perfusion du même AA à dose traceuse.

Lors de la mesure de la synthèse protéique *in vivo* et *in vitro* par méthode de surcharge, le calcul de la vitesse fractionnaire de synthèse des protéines n'est possible que si l'activité spécifique (AS : en dpm/nmol) en AA libres marqués reste stable sur la période de mesure. Pour tester cette stabilité d'AS, nous avons utilisé un AA marqué par un isotope stable (et donc mesuré l'enrichissement isotopique : équivalent de l'AS pour les isotopes stables) car cette mesure est plus fiable et plus rapide que la mesure de l'AS d'un AA radioactif (comptage de la radioactivité avec un compteur β et dosage de l'AA d'intérêt par chromatographie liquide). Nous avons donc testé, en utilisant la leucine [1-^{13}C] comme

traceur (seul AA marqué par un isotope stable à notre disposition lors de nos essais), l'évolution de l'enrichissement isotopique en leucine [1-^{13}C] dans les AA libres tissulaires de nos explants après 30 minutes, 1, 2 ou 4 heures d'incubation (Figure 2). La leucine [1-^{13}C] a été ajoutée dans le milieu à dose traceuse (courbes de gauche) ou en surcharge (courbe de droite). L'enrichissement en leucine [1-^{13}C] reste stable et proche de l'enrichissement du milieu de départ ainsi que dans les AA libres des explants dès 30 minutes et jusque 4 heures après ajout d'une surcharge en leucine [1-^{13}C]. Par contre, cet enrichissement est très éloigné (3 fois plus faible après 4 heures d'incubation) entre les AA libres des explants et celui du milieu initial lorsque la leucine est ajoutée au milieu en dose traceuse.

Si on suppose que la valine a un comportement identique à la leucine, l'ajout de la valine [U-^{14}C] en surcharge dans le milieu d'incubation permet très probablement d'obtenir une AS en valine [U-^{14}C] stable pendant 4 heures d'incubation des explants. Par cette méthode, nous avons également montré que l'incorporation de la valine [U-^{14}C] était linéaire au cours du temps (entre 0 et 4 heures d'incubation) (Figure 3). Ce résultat nous prouve ainsi que la synthèse protéique est maintenue constante entre 0 et 4 heures d'incubation et que nos explants restent donc dans un état de viabilité satisfaisant durant cette période.

Pour le reste de l'expérimentation, il a donc été choisi de mesurer la synthèse protéique avec la méthode de surcharge c'est-à-dire 2m*M* de valine non marquée radioactivement dans le milieu + 16 kBq de valine [U-^{14}C] par mL de milieu, soit une activité spécifique de 8,3 kBq/µmol de valine**.**

- la méthionine [^{35}S] pour étudier les protéines particulières

En ce qui concerne les protéines particulières, une forte quantité de radioactivité doit être incorporée aux protéines afin d'obtenir une activité mesurable sur des protéines particulières, présentes en faibles quantités. C'est pourquoi, la méthionine [^{35}S] a été choisie. Nous avons vérifié que la vitesse fractionnaire de synthèse des protéines totales des explants calculée en utilisant la valine [U-^{14}C] et la vitesse fractionnaire de synthèse des mêmes protéines calculée avec la méthionine [^{35}S] étaient similaires (données non présentées).

Pour le reste de l'expérimentation, il a donc été choisi de mesurer la synthèse des protéines individuelles secrétées dans le milieu avec la méthode de surcharge c'est-à-dire 200µ*M* de méthionine non marquée radioactivement dans le milieu + 3,7 MBq de méthionine [^{35}S] par mL de milieu, soit une activité spécifique de 18,5 MBq/µmol de méthionine.

- la néoglucogenèse et l'oxydation

A la différence de la synthèse protéique qui n'est pas modulée par une injection d'un AA en surcharge, l'activité de néoglucogenèse est sensible à l'apport de substrats dans le milieu. En effet, il a été montré que l'apport de doses croissantes de propionate dans le milieu d'incubation des hépatocytes stimulait la synthèse de glucose à partir du propionate (Leng & Annison, 1963; Demigné et coll., 1991). Afin de ne pas modifier artificiellement la néoglucogenèse, les concentrations en précurseurs de la néoglucogenèse employées dans notre étude sont donc restées physiologiques.

Nous avons choisi d'utiliser l'alanine et le propionate comme précurseurs de la néoglucogenèse. En effet, le propionate est largement prélevé par le foie pour permettre la synthèse de glucose (Majdoub, 2002). Cet acide gras volatil, produit par la fermentation ruminale, contribue jusqu'à 40-60 % de la synthèse *de novo* de glucose dans le foie chez les ruminants (Danfaer et coll., 1995). Les AA contribuent pour 2-40 % du glucose produit par le foie (Demigné et coll., 1991; Daenfer et coll., 1995). Parmi eux, l'alanine a le potentiel néoglucogénique le plus élevé chez les hépatocytes de moutons (2-5 % du glucose produit, Wolf & Bergman, 1972; Demigné et coll, 1991).

Une autre raison expliquant le choix de ces deux précurseurs particuliers est que l'alanine et le propionate entrent dans la voie de néoglucogenèse via des métabolites différents (Overton et coll., 1999; Velez & Donkin, 2005). Le propionate rentre dans le cycle de Krebs via le succinate alors que l'alanine rentre via le pyruvate. Or, l'expression de la pyruvate carboxykinase (**PC** : permettant la transformation de l'alanine en pyruvate) peut être différemment régulée de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (**PEPCK** : permettant la synthèse de phosphoénol pyruvate à partir de l'oxaloacétate, nécessaire à la synthèse de glucose à partir de l'ensemble des précurseurs) dans divers états physiologiques, en particulier lorsque les besoins en glucose sont accrus (Velez & Donkin, 2005). Il pourrait donc y avoir une régulation particulière de l'incorporation de l'alanine relativement à l'incorporation du propionate dans le glucose.

Enfin, la position du/des carbones marqués sur l'alanine et le propionate a été choisie pour les raisons suivantes : concernant le propionate, plusieurs auteurs ont utilisé le propionate [2-^{14}C] (Mills et coll., 1986; Demigné et coll., 1991; Donkin & Armentano, 1993) en s'appuyant sur les travaux de Faulkner & Pollock (1986). Cette dernière étude a montré que, à l'inverse du [2-^{14}C] propionate, le propionate [1-^{14}C] entraîne une sous-estimation de la valeur réelle d'incorporation du propionate dans le glucose en raison d'une perte de carbone lors de la transformation de l'oxaloacetate en phosphoénol pyruvate. Toutefois, récemment, Overton et coll. (1999) ont utilisé le propionate [1-^{14}C] pour tenir compte de l'utilisation du

propionate dans des voies d'oxydation (production de $^{14}CO_2$). Or ce catabolisme du propionate peut être non négligeable et diversement régulé dans certaines conditions alimentaires (Majdoub et coll., 2003). Comme au cours de l'expérimentation, les régimes offerts à nos agneaux sont riches en concentrés (Kraft et coll., 2008a), propices à la fermentation ruminale et à l'absorption nette portale en propionate, une partie non négligeable de propionate est susceptible d'être oxydé dans le foie (Majdoub et coll., 2003).

Pour le reste de l'expérimentation, il a donc été choisi de mesurer la néoglucogenèse et l'oxydation du propionate [1-^{14}C] avec une quantité physiologique de propionate dans le milieu (200µ*M*) + 28 kBq de propionate [1-^{14}C] par mL de milieu, soit une activité spécifique de 140 kBq/µmol de propionate.

En ce qui concerne l'alanine, l'alanine [1-^{14}C] n'était pas disponible dans le commerce, c'est donc l'alanine [U-^{14}C] qui a été choisie. Mills et coll. (1986) et Demigné et coll. (1991) ont également utilisé l'alanine [U-^{14}C]. Ce précurseur pourrait entraîner une surestimation de la contribution de l'alanine à la néoglucogenèse car, après oxydation, l'acétyl CoA produit peut être recyclé dans le cycle de Krebs pour donner à nouveau du glucose marqué radioactivement. Toutefois, ce désavantage nous assure également que le marquage du glucose sera suffisant. En effet, avec l'emploi d'alanine [1-^{14}C] l'incorporation de ^{14}C dans le glucose aurait été plus faible et peut-être non mesurable. Cependant, du fait de ces marquages différents utilisés pour l'alanine et le propionate, il est impossible de calculer la contribution relative de l'alanine et du propionate à la production de glucose globale dans notre étude.

Pour le reste de l'expérimentation, il a donc été choisi de mesurer la néoglucogenèse et l'oxydation de l'alanine [U-^{14}C] avec une quantité physiologique d'alanine dans le milieu (200µ*M*) + 56 kBq d'alanine [U-^{14}C] par mL de milieu, soit une activité spécifique de 275 kBq/µmol d'alanine.

<u>Optimisation de la mesure de la synthèse protéique totale, des protéines particulières, de la néoglucogenèse et de l'oxydation.</u>

- la synthèse des protéines totales

La technique de surcharge en valine [U-^{14}C] a été choisie pour estimer la synthèse des protéines constitutives dans les explants de foie (voir Figure 2), les protéines étant séparées du reste des éléments radioactifs par précipitation à l'acide trichloracétique (voir matériel et

méthodes). La valeur de synthèse fractionnaire de synthèse protéique dans nos explants est en moyenne de 4,7 % / jour. Cette valeur, similaire à celles obtenues dans d'autres études *in vitro* (Birchenall-Sparks et coll., 1985) est plus faible que les valeurs obtenues généralement *in vivo* (10-20 % / jour chez le mouton, Lobley, 1993). Un écart similaire est observé pour les vitesses de synthèse fractionnaires sur muscles de rats incubés *in vitro* qui sont de l'ordre de 1 % / j (Dardevet et coll., 1996) alors que les valeur obtenues sur le même type de muscle *in vivo* sont de l'ordre de 3 % / j (Mosoni et coll., 1993; Savary et coll., 1998).

- Mise point de la séparation de protéines particulières sécrétées par les explants grâce à la technique de SDS-PAGE (Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes).

Le choix des protéines particulières étudiées a été défini selon trois critères: leur importance quantitative dans les protéines plasmatiques, leur rôle dans l'organisme et le fait qu'elles soient connues pour être régulées par l'apport alimentaire ou la nature de l'alimentation. Nous avons ainsi identifié 6 protéines dont la séparation était envisagée :

L'albumine, la plus représentée des protéines plasmatiques (environ 30 g/L chez le mouton) (Connell et coll., 1997; Kraft et coll., 2008a)

L'Apo B, la protéine constitutive des lipoprotéines à très faible densité qui prennent en charge le transport des triglycérides. Or d'après nos résultats, la concentration circulante des triglycérides est modulée par nos régimes (Kraft et coll., résultats non publiés)

Le fibrinogène et l'α1 glycoprotéine-acide, protéines positives de la réaction inflammatoire (Ruot, 2001) dont la synthèse est régulée par diverses hormones (glucagon, hormone de croissance et insuline : Jeejeebhoy et coll., 1975; insuline, déxamethasone, glucagon, et épinephrine : O'Riordain et coll., 1995) et par l'apport en protéines dans la ration (Jahoor et coll., 1996).

La transferrine, transporteur du fer et d'autres molécules, dont la vitesse de synthèse est modifié lors de faible apport en énergie (Afolabi et coll., 2007). C'est également une protéine négative de la réaction inflammatoire dont la synthèse est régulée par l'insuline (O'Riordain et coll., 1995).

L'α2 macroglobuline, une des protéines positives de la réaction inflammatoire dont la concentration plasmatique est relativement élevée (jusqu'à 4 % des protéines circulantes chez le rat (Ruot et coll., 2000)).

La grande diversité de taille des protéines (de 550 kDa pour l'ApoB à 23 kDa pour l'α glycoprotéine) nécessitait une optimisation de la séparation de ces protéines sur le gel de polyacrylamide. Plusieurs gradients ont ainsi été testés (notamment un gradient de polyacrylamide de 7 à 12 %) ainsi qu'un gel à 10 % de polyacrylamide. La comparaison des profils en protéines dans ces différents gels nous a permis de choisir le gel à 10 % d'acrylamide comme le plus discriminant pour nos protéines d'intérêt (Figure 4). En l'absence de marqueur disponible, la séparation de l'α2 macroglobuline a été abandonnée. De même la séparation de l'Apo B nécessitait une quantité d'acrylamide très faible pour que cette grosse protéine pénètre dans le gel et ceci au détriment de la séparation des autres protéines, c'est pourquoi nous ne l'avons pas séparée.

La seconde étape a consisté à mesurer la radioactivité contenue dans chacune des bandes. Une vingtaine de bandes a pu être individualisée sur chaque gel. Après séparation d'un mélange protéique issu d'un milieu de culture incubé en présence de méthionine [^{35}S], seule une douzaine de bandes contenait une radioactivité supérieure au bruit de fond. La bande contenant l'α-1 glycoprotéine acide ne présentait pas, en particulier, de radioactivité suffisante.

Les douze autres bandes dont la mesure de radioactivité était au dessus du bruit de fond ont été analysées par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) afin de connaître ou vérifier la composition en protéines de chaque bande. Nous avons ainsi confirmé la présence d'albumine, fibrinogène et transferrine dans les bandes que nous avions définies. Les autres bandes étaient composées d'un mélange de protéines et donc difficilement utilisables.

Le Tableau 5 nous montre l'incorporation de méthionine [^{35}S] dans nos trois bandes protéiques sélectionnées. L'incorporation de méthionine [^{35}S] dans l'albumine et dans le fibrinogène représentent respectivement 20 et 3 % du total des protéines synthétisées et secrétées dans le milieu. Ces valeurs sont proches de celles obtenues pour les protéines plasmatiques chez l'Homme (Ruot, 2001) et le ruminant (Connell et coll., 1997).

- *Néoglucogenèse du propionate et de l'alanine*

Comme précisé dans le Matériel et Méthodes, la technique d'Azain et coll. (1999) (dérivée de celle de Mills et coll., 1981) a été testée pour séparer le glucose produit de ses précurseurs mais des mises au point ont été nécessaires. Cette méthode consiste en une déprotéinisation par le $Ba(OH)_2$ mais dans notre laboratoire, cette technique entraînait des

contaminations en propionate et en alanine marquées dans la fraction de glucose obtenue qui excédaient 10% de la radioactivité déposée sur les colonnes.

L'étape de déprotéinisation a été optimisée afin de mieux maîtriser le pH de la solution déposée sur les colonnes. Nous avons préféré déprotéiniser l'homogénat avec de l'acide perchlorique (0,4 *M*) puis après centrifugation, le surnageant était neutralisé avec K_2CO_3 à 3,2 *M* (Majdoub, 2002). La neutralisation se faisait avec précaution afin de ne pas dépasser un pH de 6-7. Cette technique de neutralisation de l'homogénat par le K_2CO_3 engendre la production de gaz et de cristaux qui sont éliminés par centrifugation.

Les quantités de résine utilisées ainsi que les volumes d'élution ont été optimisés en réalisant des profils d'élution. Il est apparu que 1,5 mL de résine cationique et 1 mL de résine anionique devaient être utilisées afin de parvenir à la meilleure séparation du propionate et de l'alanine et l'élution devait être réalisée avec 2 mL d'eau désionisée (en plus des 2 mL de surnageant neutralisé déjà déposé).

Ces améliorations nous ont permis d'obtenir des résultats de rendement en glucose proche de 90 % (88 % ± 4,5 %) et des contaminations en alanine et en propionate dans le glucose séparé par les colonnes inférieures à 0,5 % de la quantité de radioactivité déposée sur les colonnes.

- *Oxydation du propionate et de l'alanine*

L'hydroxyde hyamine, qui piège le CO_2 produit par les explants, ne doit pas être en contact avec le milieu d'incubation. Un système de recueil du CO_2 produit dans des flacons a donc été mis au point. Des nacelles ont été suspendues au bouchon et différents joints ont été testés afin d'assurer l'étanchéité su système.

Par la suite nous nous sommes assurés que même après 4 heures d'incubation en présence de CO_2, l'hydroxyde hyamine placé dans les nacelles n'étaient pas saturé en CO_2 Enfin un test de linéarité de production de $^{14}CO_2$ issu de l'alanine et du propionate a été réalisé (Figure 5). Il peut être noté que la production de CO_2 à partir de l'alanine est plus faible que celle à partir du propionate (comme cela a déjà été observé par ailleurs (Overton et coll., 1999)). C'est pourquoi nous avons doublé l'activité spécifique en alanine dans le milieu initial relativement à celle du propionate (280 MBq/µmol pour l'alanine et 140 MBq/µmol pour le propionate). Ensuite, il est observé que la production de CO_2 à partir de propionate et d'alanine augmente linéairement durant les 4 heures d'incubation (Figure 5). Comme pour la synthèse protéique, cette augmentation linéaire de la production de CO_2 montre une nouvelle fois que les explants ont maintenu leur activité métabolique durant les 4 heures d'incubation.

Conclusion

Ainsi, malgré l'utilisation d'une concentration physiologique en nutriments ajoutée dans le milieu d'incubation (contrairement à la majorité des études utilisant les concentrations pharmacologiques en nutriments (Donkin et Armentano, 1993; Overton et coll., 1999)), nous avons montré que la survie des explants de foie de moutons était possible sur une durée de 4 heures au moins. En effet, les rapports ADN/protéines, activité de la G6PDH, linéarité de l'incorporation de valine [U-^{14}C] dans la synthèse de protéines et oxydation de l'alanine et du propionate, montrent un maintien de l'activité métabolique des explants de foie durant les 4 heures d'incubation.

Le système d'incubation utilisé a permis la mesure de plusieurs voies métaboliques hépatiques. Chacune de ces voies a nécessité diverses adaptations méthodologiques :

- la vitesse de synthèse des protéines constitutives et exportées hépatiques en présence de valine [U-^{14}C] (optimisation des conditions de surcharge).

- la synthèse de certaines protéines particulières exportées dans le foie comme l'albumine, le fibrinogène et la transferrine (optimisation des conditions de séparation des trois protéines, vérification de la présence des protéines d'intérêt dans les bandes par spectrométrie de masse). La vitesse de synthèse des autres protéines exportées par le foie nécessiterait l'emploi d'autres méthodes séparatives (électrophorèse bidimentionnelle par exemple; Bouley et coll., 2004).

- l'incorporation du propionate [1-^{14}C] et de l'alanine [U-^{14}C] dans le glucose (optimisation de la séparation du glucose de ses précurseurs (alanine et propionate marqués)).

- l'oxydation du propionate [1-^{14}C] et de l'alanine [U-^{14}C].

Remerciement

Merci à Jérémy Pinguet et Christophe Chambon pour les analyses en spéctrométrie de masse, à Dominique Gruffat Dominique Dardevet et Claire Sornet pour les essais réalisés en parallèle sur les différents systèmes d'incubation, à Jean-Pierre Chaise et Joel Ferreira pour la mise au point des systèles d'incubation en flacons avec nacelles centrales et à Céline Cossoul, Anne-Sophie Bage et Françoise Duboisset pour leur aide technique notamment lors de l'incubation des explants.

Références bibliographiques

Abd Ellah M. R., Niishimori K., Goryo M., Okada K., & Yasuda J. 2004. Gluthathion peroxidase and Glucose-6-Phosphate dehydrogenase activites in bovine blood and liver. J. Vet. Med. Sci. 66:1219-1221.

Afolabi P. R., Jahoor F., Jackson A. A., Stubbs J., Johnstone A. M., Faber P., Lobley G. E., Giney E., & Elia M. 2007. The effect of total starvation and very low energy diet in lean men on kinetics of whole body protein and five hepatic secretory proteins. Am. J. Physiol. 293:E1580-E1589.

Ali A. M., Rossouw H. C., Silove M., & Van der Walt J. G. 2000. Development of an improved technique for the perfusion of the isolated caudal lobe of sheep liver. Exp. Physiol. 85:469-478.

Anthony J. C., Anthony T. G., Kimball S. R. & Jefferson L. S. 2001. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. J. Nutr. 131:856S-860S.

Azain M. J., Kasser T. R., & Baile C. A. 1999. A method fort he determination of glucose synthesis in isolated bovine hepatocytes. J. Nutr. Biochem.10:205-209.

Birchenall-Sparks M. C., Roberts M. S., Staeker J., Hardwick J. P., & Richardson A. 1985. Effect of dietary restriction on liver protein synthesis in rats. J. Nutr. 115:944-950.

Borsook H., Deasy C. L., Haagen-Smit A. J., Keighley G., & Lowy P. H. 1949. The incorporation of labelled lysine into the proteins of guinea pig liver homogenate. J. Biol. Chem. 179:689-704.

Bouley J., Chambon C., Picard B. 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Proteomics. 4:1811-1824.

Brockman R. P. 1993. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. In : Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. pp 249-265. [Forbes J. M. ed.]. CABI Publishing. Cambridge, Royaume-Uni

Chilliard Y. Gagliostro G., Flechet J., Lefaivre J., & Sebastian I. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 5. Milk fatty acids and adipose tissue lipogenic activities.

Connell A., Calder A. G., Anderson S. E. & Lobley G. E. 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. Br. J. Nutr. 77:255-271.

Danfaer A., Tetens V. & Agergaard N. 1995. Review and experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. Comp Biochem Physiol 111, 201-210.

Dardevet D. Sornet C., Vary T. & Grizard J. 1996. Phosphatidykinositol 3-kinase and p70 S kinase participate in the regulation of protein turnover in skeletal muscle by insulin-like growth factor I. Endocrinol. 137:4087-4094.

Demigne C. Yacoub C. Morand C.& Remesy C. 1991. Interactions between propionate and amino acid metabolism in isolated sheep hepatocytes. Brit. J. Nutr. 65:301-317.

Donkin S. S. & Armentano L. E. 1993. Preparation of extended in vitro cultures of bovine hepatocytes that are homonally responsive. J. Aniam. Sci. 71:2218-2227.

Donkin S. S., Bertics S. J. & Armentano L. E. 1997. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagons in neonatal calf hepatocytes. J. Anim. Sci. 75:3082-3087.

Emmison N., Agius L., & Zammit V. A. 1991. Regulation of fatty acid metabolism and gluconeogenesis by growth hormone and insulin in sheep hepatocyte cultures. Biochem J. 274:21-26.

Faulkner A. & Pollock H. T. 1986. Propionate metabolism and its regulation by fatty acids in ovine hepatocytes. Comp. Biochem Physiol B. 84:559-563.

Fisher R. L., Hasal S. J., Sanuik J. T., Gandolfi A. J., & Brendel K. 1995. Determination of optimal incubation media and suitable slice diameters in precision-cut liver slices: optimization of tissue slice culture, Part 2. Toxicol. Mech. Meth. 5:115-130.

Forsell J. H., Jesse B. W. & Shull L. R. 1985. A technique for isolation of bovine hepatocytes. J. Anim. Sci. 60:1597-1609.

Garlick P. J., McNurlan M. A., & Preedy V. R. 1980. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] Phenylalanine. Biochem J. 192:719-723.

Gill W., Mitchell Jr. G. E., Boling J. A., Tucker R. E., Schelling G. T., & DeGregorio R. M. 1985. Glucagon influence on gluconeogenesis and oxidation of propionic acid and threonine by perfused ovine liver. J. Dairy. Sci. 68:2886-2894.

Glock G. E., McLean P. 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochem J. 55:400-408.

Graulet B. 1999. Métabolisme hépatique des triglycérides chez le veau préruminant : synthèse, stockage et sécrétion sous forme de lipoprotéines de très faible densité. Effets d'un régime lacté à base d'huile de coprah. Thèse de Biochimie. Université d'Auvergne. France.

Graulet B, Gruffat D, Durand D, & Bauchart D. 1998. Fatty acid metabolism and very low density lipoprotein secretion in liver slices from rats and preruminant calves. J. Biochem. 124:1212-1219

Gruffat-Mouty D., Graulet B.,Durand D., Samson-Bouma M-E, Bauchart D. 1999. Apolipoprotein B production and very low density lipoprotein secretion by calf liver slices. J. Biochem. 126:188-193.

Haussinger D. & Gerok W. 1983. Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 136:421-425.

Hageboom G. H., Schneider W. C., & Pallade G. E. 1948. Cytochemical studies of mammalian tissues. I. Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. Biol. Chem. 172:619-635.

Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, & Pesch LA. 1967. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. J. Cell. Biol. 35:675-684

INRA 1978. Principes de la nutrition et de l'alimentation des ruminants. [Jarrige R. ed.] Paris, France, Institut National de la Recherche Agronomique.

Jahoor F., Bhattiprolu S., Del Rosario M., Burrin D., Wykes L. & Frazer M. 1996. Chronic protein deficiency differentially affects the kinetics of plasma proteins in young pigs. J. Nutr. 126:1489-1495.

Jeejeebhoy K. N., Ho J., Greenberg G. R., Phillips M. J., Bruce-Robertson A., & Sotke U. 1975. Albumin, fibrinogen and tranferrin synthesis in isolated rat hepatocyte suspensions. A model for the study of plasma protein synthesis. Biochem. J. 146:141-155.

Knapp J. R., Freetly H. C. Reis B. L., Calvert C. C., & Baldwin R. L. 1992. Effects of somatotropin and substrates on patterns of liver metabolism in lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 75:1025-1035.

Kraft G., Ortigues-Marty I., Durand D., Rémond D., Jarde T., Bequette B., & Savary-Auzeloux I. 2008a. Adaptations of hepatic amino acid metabolism contribute to nitrogen economy or waste in lambs fed nitrogen- or energy- imbalanced diets. Soumis à Animal. ***Publication n°1***.

Kraft G., Gruffat D., Dardevet D., Rémond D., Ortigues-Marty I., & Savary-Auzeloux I. 2008. Nitrogen and energy imbalanced diets differentially affected hepatic protein

synthesis and neoglucogenesis in growing lambs. Soumis à J. Anim. Sci. ***Publication n°4***

Krebs H. A., & Henseleit K. 1932. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. J. Mol. Med. 11:757-759.

Labarca C. & Paigen K. 1980. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Anal. Biochem. 102;344-352.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Leng R. A., & Annison E. F. 1963. Metabolism of acetate, propionate and butyrate by sheep liver slices. Biochem. J. 86:319-327.

Luo Q. J., Maltby S. A., Lobley G. E., Calder A. G., & Lomax M. A. 1995. The effect of amino acids on the metabolic fate of $^{15}NH_4Cl$ in isolated sheep hepatocytes. Eur. J. Biochem. 228:912-917.

Lobley G. E. 1993. Species comparisons of tissue protein metabolism: effects of age and hormonal action. J. Nutr. 123:337-343.

Lobley G. E. & Milano G. D. 1997. regulation of hepatic nitrogen metabolism in ruminants. Proc. Nutr. Soc. 56:547-563.

Lobley G. E., Milano G. D., & van der Walt J. G. 2000. The liver : Integrator of nitrogen metabolism. In Ruminant Physiology : Digestion, metabolism, growth and reproduction. pp 149-168. [Cronje P. B. ed.] CAB Intenational, Willingfor, Royaume-Uni.

Lomax M. A., Donaldson I. A., & Pogson C. I. 1986. The effect of fatty acids and starvation on the metabolism of gluconeogenic precursors by isolated sheep liver cells. Biochem J. 240:277-280.

Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., & Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Majdoub L. 2002. Orientation propionaique du profil fermentaire ruminal : consequences sur le métabolisme splanchnique des nutriments énergétiques et sur la fourniture et l'utilisation du glucose par le muscle chez l'Agneau recevant du fourrage vert. Thèse de Biologie et Agronomie. Ecole nationale supérieur agronomique de Rennes. France.

Majdoub L., Vermorel M. & Ortigues-Marty I. 2003. Intraruminal propionate supplémentation modifies hindlimb energy metabolism without changing the splanchnic release of glucose in growing lambs. Br. J. Nutr. 89:39-50.

McNurlan M. A., Tomkins A. M., Garlick P. J. 1979. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. Biochem. J. 178:373-379.

Mills S. E., Armentano L. E., Russell R. W., Young J. W. 1981. Rapid and specific isolation of radioactive glucose from biological samples. J. Dairy Sci. 64:1719-1723.

Mills S. E., Beitz D. C., Young J. W. 1986. Characterization of metabolic changes during a protocol for inducing lactation ketosis in dairy cows. J. Dairy. Sci. 69:352-361.

Morzel M., Chambon C., Hamelin M., Santé-Lhoutellier V., Sayd T., & Monin G. 2004. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. Meat Sci. 67:689-696.

Mosoni L., Patureau Mirand P., Houlier M. L., & Arnal M. 1993. Age-related changes in protein synthesis measured in vivo in rat live rand gastrocnemius muscle. Mech. Ageing Dev. 68:209-220.

Mutsvangwa T., Buchanan-Smith J. G., & McBride B. W. 1997. Effects of ruminally degradable nitrogen intake and in vitro addition of ammonia and propionate on the metabolic fate of L-[1-14C]alanine and L-[15N]alanine in isolated sheep hepatocytes. J. Anim. Sci. 75:1149-1159.

Obled C., Barré F., Millward D. J. & Arnal M. 1989. Whole body protein synthesis: studies with different amino acids in the rat. Am. J Physiol. 257:E639-646.

Olinga P. Groen K. Hof I. H. De Kanter R., Koster H. J., Leeman W. R., Rutten A. A., Van Twillert K., & Groothuis G. M. 1997. Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. J. Pharmacol Toxicol Methods. 38:59-69.

O'Riordain M. G., Ross J. A., Fearon K. C. H, Maingay J., Farouk M., Garden O. J., & Carter D. C. 1995. Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. Am. J. Physiol. 269:E323-E330.

Overton T.R., Drackley J.K., Ottemann-Abbamonte C.J., Beaulieu A.D., Emmert L.S. & Clark J.H. 1999. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. J. Anim. Sci. 77:1940-1951.

Ruot B., Breuillé D., Rambourdin F., Bayle G., Capitan P., & Obled C. 2000. Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis. Am. J. Physiol. 279:E244-E251.

Ruot B. 2001. Synthèse des proteins de la reaction inflammatoire en réponse à l'infection. Determinisme de l'hypoalbuminémie. Thèse de Nutrition. Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé. Université d'Auvergne. Clermont-Ferrand, France.

Savary I., Debras E., Dardevet D., Sornet C., Capitan P., Prugnaud J., Patureau Mirand P., & Grizard J. 1998. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. Br. J. Nutr. 79:297-304.

Savary-Auzeloux I., Kraft G., Bequette B., Papet I., Rémond D., Ortigues-Marty I. 2008a. Protein metabolism in the splanchnic area using leucine and phenylalanine as tracers is differentially affected by dietary nitrogen/energy ratio in lamb. En cours d'ecriture. ***Publication n°2***.

Savary-Auzeloux I, Kraft G, Dardevet D, Rémond D, Loncke C, Ortigues-Marty I. 2008b. In : Liver protein synthesis regulation by energetic and nitrogenous nutrient supply. Amino Acid/Protein Metabolism in Health and Disease: mechanisms and pathways controlling protein expression and turnover, Padoue, Italie, Juillet 2008.

Smith P. F., Gandolfi A. J., Krumdieck C. L., Putnam C. W., Zukoski III C. F., Davis W. M., & Brendel K. 1985. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. Life Sci. 36:1367-1375.

Smith K., Reynolds N., Downie S., Patel A., & Rennie M. J. 1998. Effects of flooding amino acids on incorporation of labelled amino acids into human muscle protein. Am. J. Physiol. 275:E73-E78.

Tesseraud S., Métayer S., Duchêne S., Bigot K., Grizard J. & Dupont J. 2007. Regulation of protein metabolism by insulin : value of different approaches and animal models. Dom. Anim. Endocrinol. 33:123-142.

Velez J. C., & Donkin S. S. 2005. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. J. Dairy Sci. 88:2938-2948.

Wolff J.E. & Bergman E.N. 1972. Gluconeogenesis from plasma amino acids in fed sheep. Am J. Physiol. 223:455-460.

Tableau 1 Composition du milieu Krebs Henseleit (additionné d'acides aminés et de propionate à concentrations « physiologiques ») et RPMI (Sigma, référence R0883)

	Krebs	RPMI
Sels et protéines (mM)		
NaCl	120	100
$NaHCO_3$	25	24
KCl	2,9	5,4
$CaCl_2$	2,5	
$MgSO_4$	1,2	0,4
$KHPO_4$	1,2	
Na_2HPO_4		5,6
$Ca(NO_3)_2$		0,4
Hépès	5	
Albumine bovine (en g/L)	1	1
Acides aminés et nutriments énergétiques(µM)		
Ala	200	
Asn	50	380
Asp	20	150
Cys	10	
Cyst	75	538
Glu	120	138
Gln	30	2052
Gly	500	133
His	100	96
Ile	100	380
Leu	150	380
Lys	125	170
Met	20	100
Phe	75	90
Pro	100	347
Ser	100	285
Thr	150	170
Trp	20	141
Tyr	150	160
Val	200	170
Propionate	200	
Glucose		11000
Vitamine (g/L)		
Biotine		0,0002
Choline		0,003
Acide Folique		0,001
myo-Inositol		0,035
Niacinamide		0,001
Acide benzoique		0,001
Acide panthothénique		0,00025
Pyridoxine		0,001
Riboflavine		0,0002
Thiamine		0,001
Vitamine B 12		0,000005
Autres (g/L)		
Glutathion		0,001
Rouge de Phenol		0,0053

Figure 1a Système d'incubation de type « boite à gant » developpé par Graulet et coll. (1998).

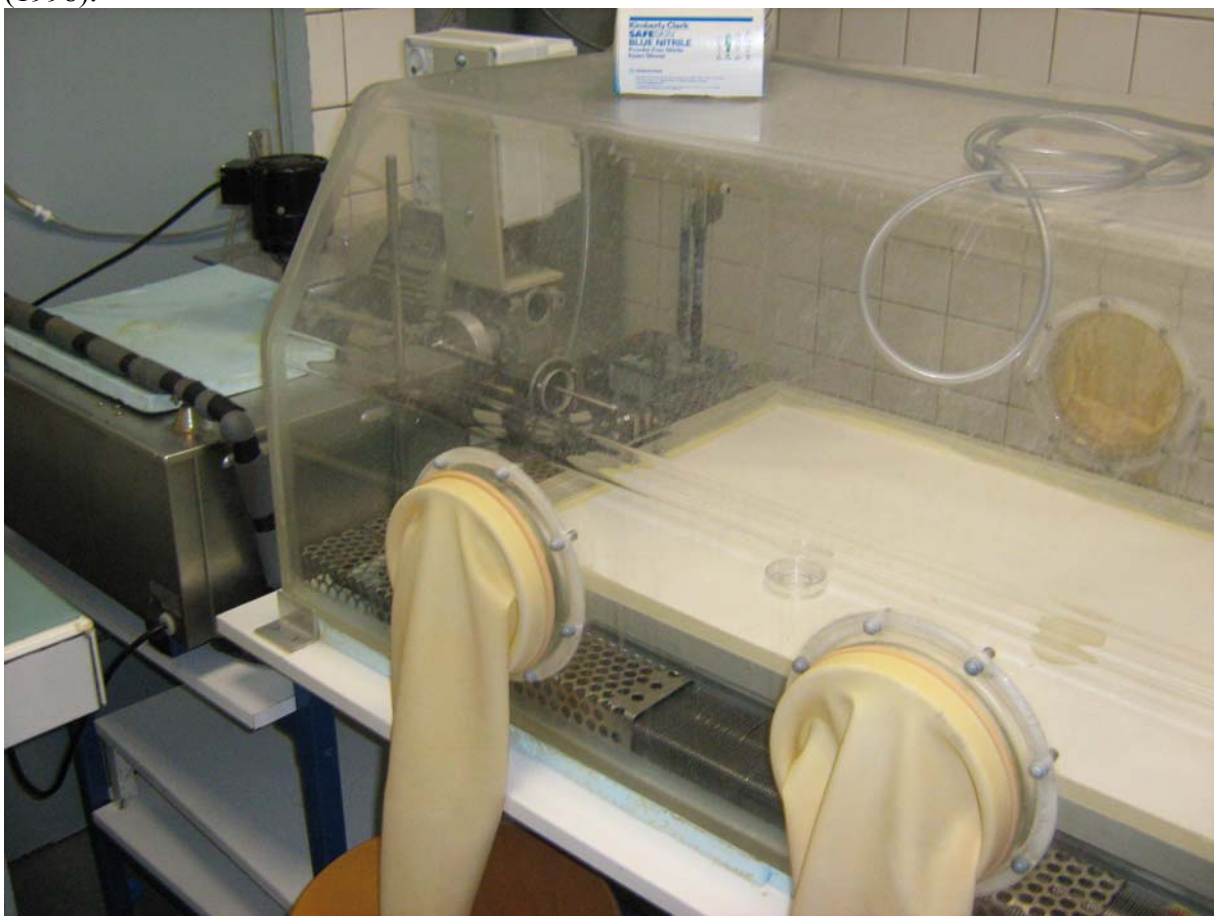


Figure 1b Flacon muni d'une nacelle utilisé pour la mesure de l'oxydation du propionate [1-^{14}C] et de l'alanine [U-^{14}C].

Tableau 2 Activité de l'enzyme Glucose 6-Phosphate Deshydrogénase (G6PDH) dans les explants de foie de mouton (exprimé en % de l'activité mesurée dans le foie avant incubation) après 1, 2, 3, 4 et 16 heures d'incubation dans le milieu minimum Krebs ou RPMI ‡ (n = 4 par heure).

Temps d'incubation	Krebs	RPMI	Probabilité *
1h	67,4 ± 0,04	69,9 ± 0,04	0,65
2h	83,6 ± 0,05	80,8 ± 0,04	0,69
3h	90,0 ± 0,11	75,7 ± 0,04	0,42
4h	62,3 ± 0,07	57,2 ± 0,03	0,46
16h	19,0 ± 0,01	10,7 ± 0,03	0,05

* Test *t* de Student de comparaison de moyennes entre les valeurs obtenues pour le milieu Krebs et les valeurs obtenues pour le milieu RPMI pour un même temps d'incubation.
‡ La composition des deux milieux testés est détaillée dans le Tableau 1.

Tableau 3 Incorporation de Valine [U-^{14}C] (dpm/h/g d'explant) dans les protéines constitutives des explants après 2h d'incubation dans le milieu minimum Krebs ou le milieu RPMI ‡(n = 4).

	Krebs	RPMI	Probabilité*
Incorporation de Valine	6008 ± 694	6024 ± 2064	0,99

* Test *t* de Student de comparaison de moyennes entre les valeurs obtenues pour le milieu Krebs et les valeurs obtenues pour le milieu RPMI.
‡La composition des deux milieux testés est détaillée dans le Tableau 1.

Tableau 4 Incorporation de Valine [U-^{14}C] (dpm/h/g d'explant) dans les protéines constitutives de l'explant après 2h d'incubation: Effet du système d'incubation (boite à gant *vs* bain marie agitant‡); du type de découpe (cubes *vs* tranches fines); du nutriment énergétique utilisé dans le milieu Krebs (glucose *vs* propionate) (n = 4 par condition)

Nutriment énergétique ajouté au milieu Krebs			Système d'incubation			Type de découpe		
Glucose	Propionate	Probabilité*	Boite à gant	Bain marie agitant	Probabilité	Cubes	Tranches fines	Probabilité
6010 ± 2375	9276 ± 2110	0,36	2368 ± 322	9276 ± 2110	0,03	5874 ± 1300	9276 ± 2110	0,24

* Test *t* de Student de comparaison de moyennes.
‡ Boite à gant développée par Graulet et coll. (1998) ; bain marie agitant utilisé par Dardevet et coll. (1996).

Figure 2 Evolution de l'enrichissement isotopique en Leucine [1-^{13}C] dans les AA libres du milieu d'incubation (en bleu) et les AA libres de l'explant (en vert) lors de l'utilisation d'une dose initiale traceuse de Leucine [1-^{13}C] (à gauche) ou une surcharge en Leucine [1-^{13}C] (à droite) (n = 3 répétitions par heure).

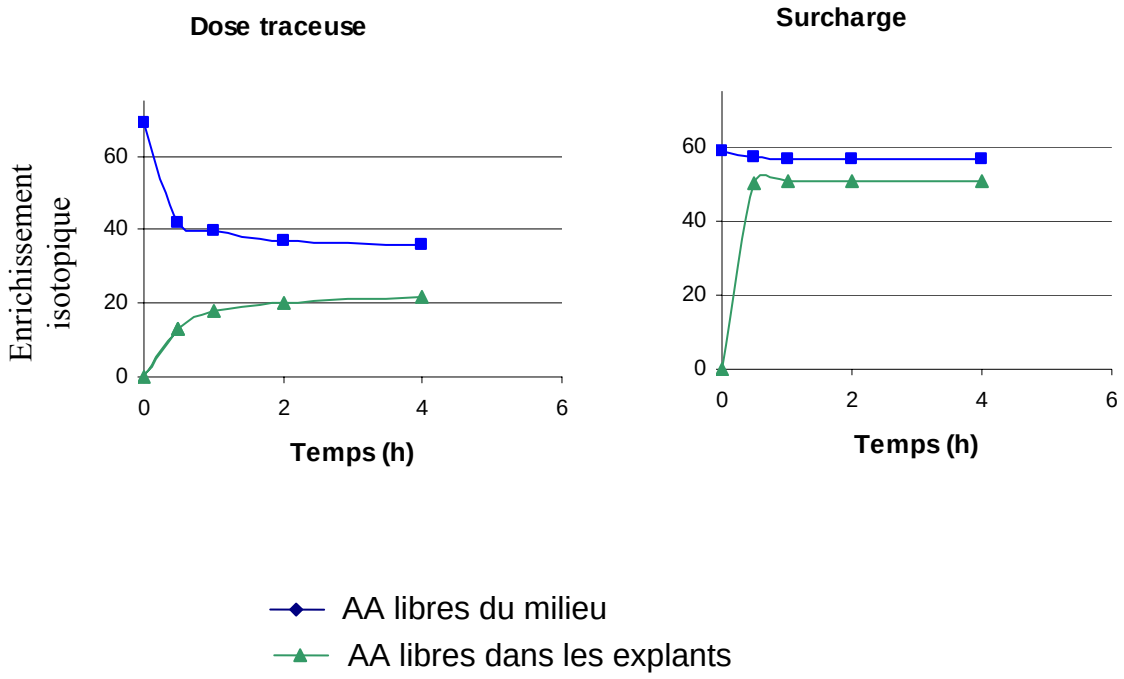
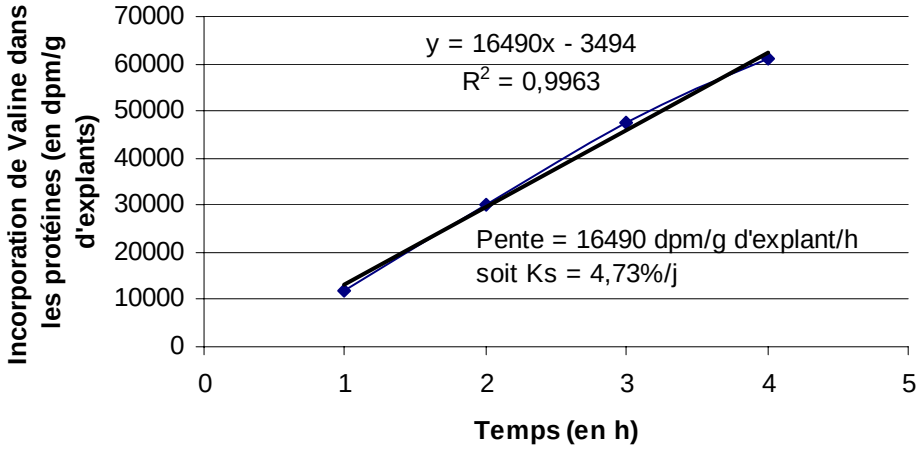
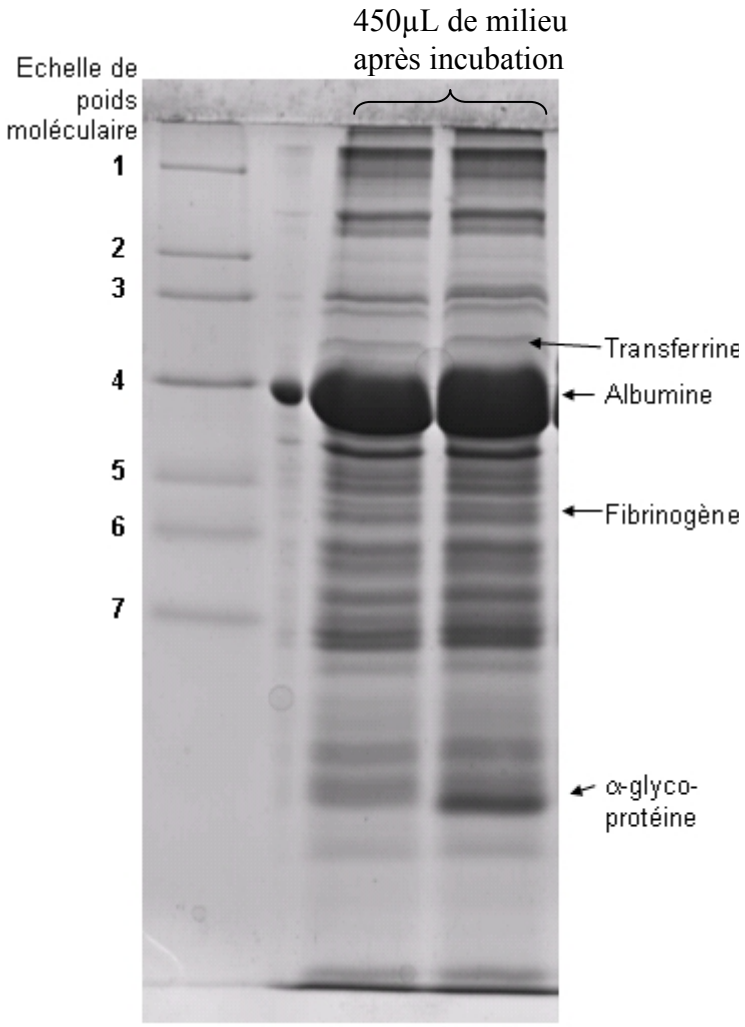


Figure 3 Evolution de l'incorporation de Valine [U-^{14}C] dans les protéines constitutives de l'explant (en dpm/g d'explants) (n = 3 par heure)



La pente permet le calcul de la vitesse de synthèse fractionnaire (Ks) en tenant compte de la quantité de protéine dans l'explant, la teneur en valine dans les protéines de l'explant (520nmol Val/mg de protéines d'après Mac Rae et coll., 1993) et l'enrichissement isotopique du compartiment précurseur de la synthèse protéique (200dpm/nmol Valine).

Figure 4 Gel d'électrophorèse (10% de polyacrylamide) permettant la séparation des protéines présentes dand le milieu d'incubation des explants de foie après 4 heures d'incubation.



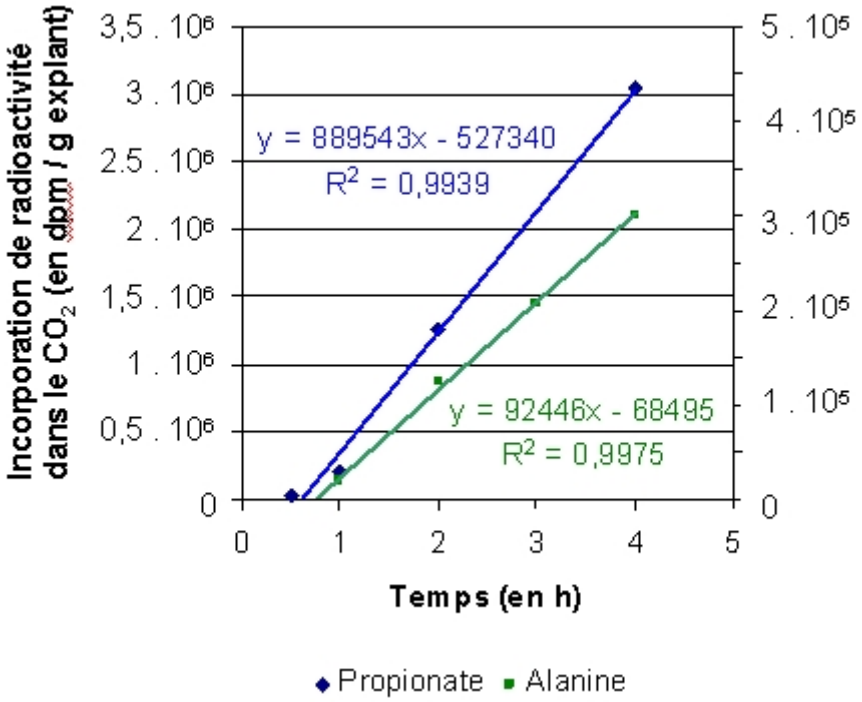
A la fin de l'incubation, les protéines du milieu d'incubation étaient séparées par SDS-PAGE puis le gel était coloré par le bleu de Coomasie. Nous avons utilisé des standards de poids moléculaires ainsi que des protéines d'intérêt pures pour identifier les bandes correspondant à l'albumine, au fibrinogène, à la transferrine et à l'α-1 glycoprotéine acide. Les protéines de plus haut poids moléculaire se trouvent en haut.

La piste de gauche correspond à la séparation du marqueur de poids moléculaire (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA ; Ref : S8320) : 1) Myosine 200kDa ; 2) β galactosidase 116kDa ; 3) Phosphorylase b 97kDa ; 4) Albumine 66kDa ; 5) Glutamate deshydrogenase 55kDa ; 6) Ovalbumine 45kDa ; 7) Glyceraldehyde phosphate deshydrogenase 36kDa.

Tableau 5 Incorporation de méthionine [^{35}S] dans les protéines exportées par les explants de foie (nmol de méthionine [^{35}S] / mg d'explant / h) contribution de chacune des protéines spécifiques à l'incorporation totale de méthionine [^{35}S] dans les protéines exportées (%) (résultats pour l'albumine, le fibrinogène et la transferrine).

	Incorporation de méthionine [^{35}S] dans les protéines	SEM	Contribution à l'incorporation totale de méthionine [^{35}S] dans les protéines exportées par le foie (mesuré par la technique de précipitation au TCA)	SEM
Transferrine	0,031	0,003	1,1	0,14
Albumine	0,625	0,075	21,5	2,24
Fibrinogène	0,097	0,007	3,4	0,16

Figure 5 Production de $^{14}CO_2$ mors de l'incubation des explants en présence de propionate [1-^{14}C] (en bleu, échelle de gauche) ou d'alanine [U-^{14}C] (en vert, échelle de droite)



Publication n° 4

Des régimes déséquilibrés en azote ou en énergie affectent différemment la synthèse protéique hépatique et la néoglucogenèse chez des agneaux en croissance

Guillaume Kraft, Dominique Gruffat, Dominique Dardevet, Didier Rémond, Isabelle Ortigues-Marty et Isabelle Savary-Auzeloux

Accepté avec modifications à Journal of Animal Science

Résumé : Le but de cette étude est de déterminer le devenir métabolique des acides aminés (AA) (synthèse des protéines endogène et exportées, néoglucogenèse, oxydation) lors d'un apport déséquilibré en énergie ou en azote dans la ration d'agneaux en croissance. Dix-huit agneaux INRA 401 (3 mois, 29,7 kg ± 0,45 kg) étaient nourris avec 3 ration expérimentales, un régime témoin (T) permettant un apport adéquat en azote et en énergie relativement aux recommandations INRA, un apport 23% plus faible en azote (N), ou un apport 19% plus faible en énergie (E). Les animaux étaient conduits en 6 groupes de 3 animaux; dans un groupe chaque animal recevait un des 3 régimes expérimentaux, et chaque groupe était abattu le même jour. Des explants de foie issus de ces animaux étaient incubés dans un milieu minimum (Krebs-Henseleit) contenant une concentration physiologique en propionate et en AA comme source énergétique et azotée. La synthèse des protéines (endogènes et exportées) était mesurée en présence de valine [U-^{14}C] ou de méthionine [^{35}S]. L'activité de néoglucogenèse à partir de propionate [1-^{14}C] et d'alanine [U-^{14}C] a également été mesurée ainsi que leur oxydation complète en CO_2. Une épargne relative des AA dans le foie des animaux nourris avec le régime N est montrée *in vivo* en raison de la baisse d'azote excrété dans les urines (-42 %, N vs T ; $P < 0,001$). Dans les explants de foie, une augmentation de la synthèse des protéines endogènes et exportées a été montrée dans le régime N (+51 % et +46 %, N vs T; $P = 0,01$) (également observée pour le fibrinogène mais pas pour l'albumine ni la transferrine). Une tendance à l'augmentation de la néoglucogenèse à partir de l'alanine est également observée dans le régime N (+58 %, N vs E, $P = 0,08$). Par ailleurs, le régime E était associé à une perte importante d'azote dans l'urine (+24 %, E vs T ; $P < 0,05$) sans effet sur la synthèse protéique et la néoglucogenèse *ex vivo*. Ces données montrent que les animaux nourris avec le régime N présentent une meilleure efficacité d'utilisation des AA vers les voies anaboliques (relativement aux deux autres régimes), sans doute liée à une stimulation des système de transport intracellulaires des AA, afin de contrecarrer la baisse d'apport en AA avec le régime N. Au contraire, aucune adaptation de ce type n'apparaît pour les animaux nourris avec le régime E, suggérant que les mécanismes de régulation mis en en jeu dans ce cas sont liés à l'apport en nutriments ou hormones qui ne sont pas modifiés dans notre modèle expérimental d'explants de foie incubés *ex vivo*.

Nitrogen and energy imbalanced diets differentially affected hepatic protein synthesis and neoglucogenesis in growing lambs

G. Kraft[*], D. Gruffat[*], D. Dardevet[†], D. Rémond[†], I. Ortigues-Marty, I[*]. Savary-Auzeloux[*1]

[*] *INRA Theix, Herbivores Research Unit, UR 1213 F63122 St Genes Champanelle*
[†]*INRA Theix, Human Nutrition Unit UMR 1019 F63122 St Genes Champanelle*

[1]Corresponding author: Savary-Auzeloux Isabelle
INRA
Unité de Recherches sur les Herbivores, UR 1213
Equipe Nutriments et Métabolismes
Site de Theix
F63122 Saint-Genès-Champanelle
FRANCE
Tel: (33) (0)4 73 62 47 32
Fax: (33) (0)4 73 62 46 39
E-mail: Savary@clermont.inra.fr

Word count:

Number of figures: 0

Number of tables: 6

Running Title: Amino acid metabolism in liver slices

Key words: amino acid, lamb, ex vivo, protein synthesis, gluconeogenesis, oxidation

Abstract

The aim of this study was to assess the metabolic fate of the amino acids (AA) (endogenous or export protein synthesis, gluconeogenesis, oxidation) after an imbalanced supply of energy and nitrogen in the diet of growing lambs. Eighteen INRA 401 lambs (3 mo old, 29.7 ± 0.45 kg of BW) were fed 3 experimental diet (C, N or E) allowing an appropriate nitrogen and energy supply (C) to fit with growth requirements, a lower nitrogen supply relatively to energy (N) (-23%, C vs N) and a lower energy supply relatively to nitrogen (E) (-19%, C vs E). Animals were conducted in 6 blocks of 3 animals, each animal receiving one of the 3 diets, and the animals from each block were killed on the same day. Liver slices from these lambs were incubated in a minimum salt medium (Krebs-Henseleit) containing physiological concentrations of propionate and AA as energy and nitrogen sources. Protein synthesis (endogenous and export) using [U-^{14}C] valine and [^{35}S] methionine as well as gluconeogenesis and oxidation from [1-^{14}C] propionate and [U-^{14}C] alanine were measured. A relative sparing of AA at the liver level was hypothesized in the N diet due to a reduced urinary nitrogen (-42%, N vs C, $P < 0.001$). In the liver slices, an increased endogenous and export protein synthesis (+ 51%, N vs C, $P = 0.01$) (also observed for fibrinogen synthesis but not albumin nor transferrin) associated with a tendency for an increased gluconeogenesis from alanine (+58%, N vs E, $P = 0.08$) were observed in N diet. On the other hand, E diet was associated with an important loss of nitrogen in the urine (+24%, E vs C, $P < 0.05$) but no strong effect of the E diet was demonstrated for protein synthesis and gluconeogenesis *ex vivo*. These data show an increased efficiency for utilization of AA in the N fed animals towards anabolic purposes, probably via an activation of some AA-transport systems, to cope with the shortage in nitrogenous nutrients in the N diet. On the contrary, no such adaptation occurs in the E lambs, probably because the regulatory mechanisms which prevail in this case are the nutrients supply or hormones which are not altered in our *ex vivo* experimental model.

Introduction

The liver is a major organ involved in amino acids (AA) metabolism within the body. The hepatic extraction rate of total AA represents an average of 45% of AA net portal appearance (Lapierre et al, 2005) and thus affects the efficiency of AA use for muscle growth in meat producing animals. This AA extraction rate by the liver depends on nutritional factors (Lapierre et al., 2000) and on the physiological state (Reynolds, 2006) and is directly related to the activity of the metabolic pathways using AA within the liver.

Indeed, the net hepatic uptake of AA remains stable when food intake is increased above maintenance (Savary-Auzeloux et al., 2003) whereas it is increased when a nitrogen supplementation alone increased (Guerino et al., 1991; Ferrell et al., 2001). Recent data from our group also showed that when lambs were fed a nitrogen- or an energy- imbalanced diets (N and E), the net hepatic uptake of essential AA (EAA) was decreased in N and E relatively to a control diet (C, balanced for nitrogen and energy) (Kraft et al., 2008). This was due to a decreased exported protein synthesis in E (Savary-Auzeloux et al., 2007) whereas the regulation of unknown other pathways (ureagenesis presumably) were involved in N diet. Consequently, we hypothesized that interactions between the nitrogen and energy supply in the diet may then impact on the net hepatic AA uptake via a differential regulation of specific metabolic pathways using AA.

These results raise several questions concerning i) the pathways involved in the decreased net EAA hepatic balance in N and E diets and particularly gluconeogenesis which was not measured *in vivo* ii) the regulatory mechanisms explaining the adaptation of the pathways. To address these issues, liver slices from lambs fed C, N and E diets were incubated *ex vivo* to measure protein synthesis and neoglucogenesis. The nutrients concentrations used in the incubation medium were physiological and no hormones were added in order to reveal the hepatic long term adaptative mechanisms potentially activated by the diets without any other regulatory factors (hormones, variations in nutrients supply between diets …) also altered differently between the three diets To our knowledge it is the first time that hepatic protein synthesis and neoglucogenesis were studied simultaneously *ex vivo* using physiological levels of nutrients.

Material & Methods

Experimental Animal

A total of 18 male INRA 401 lambs (3-mo old; 29.7 ± 0.45 kg of BW) were used for this experiment. Each animal was assigned to a block of 3 animals (blocked by their initial body weight, less than 1 kg difference between the 3 animals) and within a block, each animal was randomly assigned to one of the 3 experimental diets. The animals from the same block were pair fed according to their metabolic weight. The animals from one block were killed on the same day. Six blocks of 3 animals were used in this experiment. The 3 diets were composed of 30% hay and 70% concentrate (Table 1) differing only in concentrate composition and total dry matter (**DM**) allowances (Table 1). The control diet (C) was designed to offer an adequate, balanced supply of nitrogen and energy for a theoretical growth rate of 150 g per day (INRA, 1989) using concentrate #1 (Table 1). The nitrogen-imbalanced diet (N) was made up using concentrate #2 (Table 1) and allowed a N digested 36% inferior to the N digested of C and E diets. The energy-imbalanced diet (E) was made using concentrate #3 and allowed a 19% lower ME intake compared to C and N diets through lower DM allowances (Table 1). Each treatment period lasted 3 wk. The daily feed allowances were adjusted at the start of each treatment on the basis of the initial metabolic weight (body weight $^{0.75}$) of the animals and dispensed in eight equal meals at 3-h intervals. Over the last 6 d of each treatment period, the whole body nitrogen balance was determined by urine and faeces collection and samples were analyzed for dry matter and Kjeldahl nitrogen.

The animals from each block were slaughtered the same day. The day before slaughter, 10 mL of jugular vein blood was withdrawn from the three lambs of the same block, 1 hour after the last meal. Subsequent analyses were performed on blood or plasma using heparin (5 UI/mL blood) or 3 m*M* EDTA-K (10 µL/mL blood) as anticoagulants. Amino acid content in heparinized plasma was determined using the isotope dilution technique as previously described (Calder et al, 1999). Triglycerides (TG) were determined colorimetrically (Fossati & Prencipe, 1982). Phospholipids (PL) were measured by Trinder reaction after hydrolysation by phospholipaseD (Takayama et al. 1977). Free cholesterol (FC) and total cholesterol (TC) were measured using the cholesterol oxidase method (Richmond, 1973) and esterified cholesterol (EC) calculated as described by Leplaix-Charlat et al. (1996). Non-esterified fatty acids (NEFA) were determined with enzymatic kit “NEFA C Wako” (Unipath SA, Dardilly, France). TG, PL, FC, TC, EC, NEFA were assayed on plasma collected with EDTA-K as an anticoagulant. Glucose (Trinder, 1969), 3-hydroxybutyrate (Williamson and Mellanby, 1974), acetate (Enzyplus acetic acid, Biocontrol system, Lyon, France) and lactate (Gutmann and

Wahlefeld, 1974) were measured on heparinized blood deproteinized with perchloric acid (0.4 *M*). Urea (Berthelot, 1859) was measured on EDTA-K blood after deproteinisation of with TCA (0.56 *M*). Total protein (Lowry et al., 1951) and albumin concentration was determined in plasma using a commercial kit (Sodioba, Montbonnot St Martin, France) (Doumas et al, 1971). Lastly, insulin and glucagon concentrations in plasma (trasylol (Bayer Helthcare AG, Leverkusen, Germany) was used as an antiprotease (300 U.I.K. / mL) were assayed by Radio Immuno Assay (MP Biomedicals, Illkirch, France).

Tissue Preparation and Liver Slices Incubation

Liver were removed and placed in ice-cold saline water (NaCl 9 g/L) within 5 min after animals' slaughter. Liver tissues were then cut after removing the Gilman's capsule, to obtain slices as thin as possible (< 1 mm, see-through). Approximately 200 mg of fresh liver slices were placed in a 10 mL flask fitted with a rubber cap for air tightness. The medium used for incubation was a Krebs Henseleit (KH) buffer (NaCl 120 m*M*, $NaHCO_3$ 25 m*M*, KCl 2.9 m*M*, $CaCl_2$ 2.5 m*M*, $MgSO_4$ 1.2 m*M*, $KHPO_4$ 1.2 m*M*, pH 7.4) supplemented with 5 m*M* Hepes, and 1 g/L BSA (99% fatty acid free) (Dardevet et al., 1996) containing physiological concentrations of propionate and amino acids as main sources of energy and nitrogen. Free amino acids concentration in the incubation medium was based on *in vivo* amino acid concentrations in ovine portal venous blood from the animals fed the imbalanced nitrogen diet (Kraft et al., 2008) (i.e in µM: ala 20*0*, asn 5*0*, asp 20, cys 10, cyst 75, glu 120 , gln 30, gly 500, his 100, ile 100, leu 150 , lys 125, met 20 phe 75 , pro 100 , ser 100, thr 150, try 20, tyr 150, val 200, final concentration). Similarly, propionate was added to the incubation medium (200 µ*M*, final concentration) based on *in vivo* portal blood concentrations in the same animals (Kraft et al., 2008)

Liver slices were first pre-incubated for 1 h in KH saturated with a 95% O2-5% CO2 gas mixture. They were then transferred into a fresh KH containing radiolabeled substrates (U-^{14}C Valine, ^{35}S Methionine, U-^{14}C Alanine or 1-^{14}C Propionate). Other liver slices were also incubated in non labeled KH on the same day and in similar conditions for determination of protein and DNA content. Incubations with each radio-labeled substrates (realized in triplicates) were carried out for 2 or 4 h at 38°C under continuous agitation and oxygenation renewed every hour of incubation.

We performed preliminary experiments to assess the viability of our incubation system as only few studies have already used physiological concentration of nutrient in incubation medium (Luo et al., 1995; Mutsvangwa et al., 1997). The measurements of protein synthesis

and CO_2 production from propionate using our KH medium increased linearly after 30 min, 1, 2, 3 and 4 h of incubation (data not shown). In addition, the stability of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) activity in the liver slices was assessed. A 20% decrease of the activity of the enzyme has been observed after the slicing but the values remained then stable throughout the 4-h incubation (data not shown). This indicated that our incubation conditions were appropriate for the measurement of the various metabolic pathways in the liver slices up to 4 hours in the same medium.

Measurement of total hepatic protein synthesis after incubation with [U-^{14}C] valine

The incubation medium was supplemented with a flooding dose of [U-^{14}C] Valine (GE Heathcare, Buckinghamshire, UK) (2 m*M* final concentration, 8 kBq/µmol) as previously described (Ricca et al., 1978). After 2 h incubation, the liver slices were removed and rinsed. Slices and media were immediately frozen (-80°C) and stored until analysis. Liver slices were homogenized using a Dounce homogenizer in 2 mL of 25 m*M* Tris-HCl (pH 8), 50 m*M* NaCl buffer. Proteins from the homogenates or in the incubation medium were precipitated with 10% trichloroacetic acid (Dardevet et al., 1996). TCA-insoluble material was washed 3 times with 5% trichloroacetic acid and the pellet was solubilized in 1 *M* NaOH 1 h at 37°C. The extract was neutralized with 1 *M* HCl and the radioactivity incorporated into hepatic proteins and proteins released in the medium was counted by scintillation (TriCarb 2100 TR, Parkard Bioscience). The protein content in the neutralized NaOH extract was also determined (Lowry et al. 1951).

Measurement of specific hepatic exported proteins after incubation with ^{35}S Methionine

The KH medium was supplemented with a flooding dose of [^{35}S] Methionine (GE Heathcare, Buckinghamshire, UK) (200µ*M* final concentration 18.5 MBq/µmol). After 4 h of incubation (the time of incubation is longer compared to the one used with [U-^{14}C] valine to allow an appropriate incorporation of the tracer in specific proteins), the liver slices were removed and rinced with 200 µL fresh medium; liver slices and media were then immediately frozen (-80°C) and stored until analysis.

On the day of analysis, the media were prepared for SDS PAGE separation (10% acrylamide (Laemmli, 1970) as previously described by Gruffat-Mouty et al. (1999). Briefly, 450µL of medium was reduced by β-mercaptoethanol and loaded on the gel. After migration and staining with Coomassie blue, specific strips (corresponding to albumin, fibrinogen and transferring) were precisely cut off the gel , solubilized in 1mL H_2O_2 30% at 70°C for 2 h and

the radioactivity incorporated in each band was determined by scintillation counting after addition of Ready Safe scintillation cocktail.

A migration of standards (purified albumin, transferrin and fibrinogen (Sigma, Lyon, France)) allowed a proper identification of albumin, transferrin and fibrinogen strips. The composition of the cut off strips was also checked by MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight) mass spectrometer as described previously (Morzel et al., 2004).

Measurement of oxidation and gluconeogensis from Propionate and Alanine.

The medium was supplemented with either [1-^{14}C] Propionate (MP Biomedicals, Eschwege, Germany) (200 m*M*, 140 kBq/µmol in the medium) or with [U-^{14}C] Alanine (GE Heathcare, Buckinghamshire, UK) (200 m*M*, 280 kBq/µmol in the medium,). Gluconeogenesis and oxidation were measured simultaneously. For oxidation measurement, the flask rubber caps were holding plastic center wells filled with 400 µL hydroxide hyamine to trap radiolabelled CO_2 during the last hour of incubation and the radioactivity was counted. For gluconeogenesis measurement, the incubation time was 2 h when propionate was used as a substrate and 4h when Ala was used as substrate to ensure an appropriate incorporation of the tracer into glucose. At the end of the incubation times, liver slices were rinced and immediately frozen and stored (-80°C).

Slices were homogenized with their respective incubating medium (with a Dounce homogenizer) and internal standard [1-^{3}H] glucose (Sigma, Steinheim, Germany) was added to each homogenate (8 kBq per flask) as previously described (Overton et al. 1999). The homogenate (2.2 mL) was deproteinized by addition of 220µL perchloric acid (PCA) 0.4 *M* and centrifuged at 2000g for 20 min at 4°C. The supernatant was neutralized with K_2CO_3 3.2 *M* to reach a pH of 6-7. The neutralized supernatant was again centrifuged at 2000g for 10 min at 4°C. Glucose in the supernatant was isolated according to Mills et al. (1981). Briefly, a column filled with 1.5 mL of Dowex AG1-X8 (Biorad, Hercules, CA, USA) (100-200 mesh – acetate form) was fitted above a column filled with 1mL of Dowex AG50W-X8 (Biorad, Hercules, CA, USA) (100-200 mesh – hydrogen form). The 2 mL of neutralized supernatant was poured on the first column and eluated with 2 mL of water. The fraction recovered at the bottom of the second column was counted for both ^{14}C and ^{3}H into a scintillation vial containing adequate amount of liquid scintillation cocktail. The recovery rate of the internal standard, ^{3}H glucose was 88% ± 4.5%. The final rate of glucose recovery was also corrected for incomplete trapping of [1-^{14}C]Propionate and [U-^{14}C]Alanine on column (tested on

separate samples), which was <0.5% of radioalabeled alanine or propionate added to the columns (data not shown).

DNA, RNA,protein content measurements

On the day of slaughter, liver was cut into pieces and frozen at -80°C for subsequent analysis of RNA, protein and DNA. The measurement of total RNA and protein concentrations allowed the calculation of the protein synthesis capacity (ratio RNA / protein (milligrams of RNA per gram of protein)) as previously described (Savary et al, 1998).

After incubation, the slices incubated with unlabelled KH medium were removed and rinced with 200µL of fresh medium and the slices and media were immediately frozen (-80°C) and stored until analysis. Measurement of DNA and protein after homogeneisation allowed the calculation of the ratio DNA / protein before and after the incubation. This DNA / protein ratio is an index of survival of the slices in our experimental conditions as previously described (Donkin and Armentano, 1993). The DNA measured in liver slice was also used to state the results as explained below.

Calculations

The rate of tracer incorporation into products (proteins, glucose or CO_2) was expressed as nmol/ (mg of DNA ·h), using the following equation:

$$\text{Rate of tracer incorporation} = DPM / (T \cdot W \cdot SA \cdot \text{DNA content})$$

where DPM refers to the amount of radioactivity found in the product (dpm), T refers to the incubation time (h)), W refers to the weight of liver slice (mg), and SA refers to the specific activity of the tracer in the incubation medium (ie precursor pool) (dpm/nmol of tracer) and DNA content is the DNA content in the incubated slices (mg DNA/mg of liver slice).

Statistical analysis

Triplicates values obtained for each tracer utilized and each animal were averaged before statistical analysis. The rates of incorporation of tracers into the products were subjected to ANOVA using general linear model of Statistica (Statsoft, France) where the effect of treatments (the diet) and triplets were tested. If statistically significances were detected, a Duncan post-hoc analysis was performed to assess differences between individual

means. Differences were declared significant at $P < .05$ and tendencies were declared for $.05 < P < .10$ for all statistical tests.

Results

Growth, intake and nitrogen balance

The overall very small residual variability observed for DM, ME and nitrogen intake (and the very significant 'block effect') can be easily explained by the pair feeding used within each block of lambs. The live weight of the animals was not significantly different ($P = 0.20$) but a significant block effect ($P < 0.001$) is observed because the animals were matched within each block according to their initial body weight.

As expected, the nitrogen intake was reduced (-23%, $P < 0.001$ compared to C diet) in the N diet whereas the ME intake was reduced in E diet (-19%, $P < 0.001$ compared to C diet). The ratio of Nitrogen digested / ME intake was then 1.08, 0.70 and 1.42 g nitrogen/MJ for C, N and E diets respectively. This led to a decreased average daily gain of 40% ($P = 0.04$) and 56% (P = 0.01) for N and E vs. C respectively. The retained nitrogen in the whole body confirmed the data obtained for daily gain, as a 27% and a 22% significant ($P = 0.05$) decreased nitrogen retention was observed for N and E diet compared to C. Nitrogen in the feces was not significantly modified by the diets. The decreased nitrogen retention observed in the E diet was due to an important increased loss of nitrogen in the urine compared to C (+30%, $P = 0.001$). On the contrary, the decreased nitrogen retention observed in N diet is due to a decreased nitrogen intake and a decreased nitrogen apparent digestibility whereas the nitrogen loss in the urine is decreased in N diet compared to C (-43%, $P < 0.001$). This metabolic adaptation of the N diet (reduced nitrogen digestibility and intake compensated by a reduced loss of nitrogen in the urine) leads to a stable efficiency of utilization of nitrogen (30.4 and 28.9 % for C and N diets respectively).

Metabolites concentrations in blood and plasma

Plasma concentrations of free AA are shown in Table 3. A lower leucine concentration (-12%; $P = 0.02$), and a higher glycine concentration (+25%, $P = 0.04$) were observed in the N diet compared with C. The isoleucine concentration was also increased in the N diet compared with the E diet (+10%, $P = 0.05$). Blood urea concentration was also decreased in the N diet (-60%, $P = 0.004$ compared to C) and increased for the E group (+64%, P = 0.003

compared to C). This fits with the data obtained for urea-N content into urine. Total plasma proteins were similar whatever the diet considered but albumin concentration was slightly higher in the E diet compared with N (+7.6%, $P = 0.02$).

Concerning the others metabolites, no modification of lipids concentration occurred except for a higher NEFA concentration in the E diet compared with the two others (+35%, $P = 0.04$ compared with C) and glucose concentration was decreased in the E diet (-8%, $P = 0.01$) compared with C. These findings suggested a mobilization of lipids in the body of the E animals. Finally insulin and glucagon concentrations were not altered by the diets.

Liver slices incubation

The protein / DNA ratios of the slices are shown in Table 4 and is considered as indicator for isolated hepatocytes survival (Donkin & Armentano, 1993).The ratio was unaffected by the diets after slaughter, or 4h of incubation (Table 4, $P = 0.79$ and $P = 0.30$ for Diet effect at slaughter or after 4 hours of incubation respectively). More importantly, the protein / DNA ratio remained also stable between slaughter and 4 hours of incubation ($P = 0.15$)

Incorporation of labelled amino acids into endogenous and exported hepatic proteins

Rates of total, endogenous and exported protein synthesis using [U-^{14}C] Valine are presented in Table 5. The N diet induced an increased incorporation of into total proteins (due to an increased synthesis of endogenous and exported proteins) (+51%, $P = 0.01$ for endogenous and +46%, $P = 0.01$ for exported proteins in N diet compared with C). Contrarily, no effect of the E diet on the incorporation of [U-^{14}C] Val into proteins was observed ($P = 0.54$ for endogenous and $P = 0.66$ for exported proteins compared with C). The capacity for protein synthesis (total RNA / protein ratio) was not modified by the diets ($P = 0.22$).

The individual protein synthesis measured by the incorporation of [^{35}S] Met in the liver slices. Albumin and transferrin were not modified by the diets whereas the incorporation of [^{35}S] Met into fibrinogen was increased by 60% with the N diet relatively to C ($P = 0.02$).

Incorporation of [1-^{14}C] propionate and [U-^{14}C] alanine into glucose and CO_2

The [1-^{14}C] propionate incorporation into glucose was not modified by the diets ($P = 0.76$), whereas its oxidation was increased in both N and E diet (+50%, $P = 0.04$ and +45%, $P = 0.05$ respectively) compared with C.

Concerning [U-^{14}C] alanine, its incorporation into glucose was higher in the N than in the E diet (+138%, P = 0.04) and numerically but not significantly increased compared with C (+60%, P = 0.13). Incorporation of labelled carbons from [U-^{14}C] alanine into CO_2 was not modified by the three diets but increased numerically for the N diet compared with C (+55%,)

Discussion

The nitrogen digested and metabolizable energy ingested were decreased by 36% and 20% in N and E diets respectively, inducing an alteration in the ratio nitrogen / energy intake by the animals (1.08, 0.70 and 1.42 for C, N and E diets respectively). The N diet induced a lower (-42%) urinary nitrogen loss relatively to C whereas an increased nitrogen loss in urine (+31%) was observed in E diet. This led to a sustained efficiency for the utilization of digested nitrogen between N and C (P = 0.23) whereas this efficiency is decreased in E (-27%, P = 0.02). The extend of urinary loss of nitrogen is the main factor responsible for the increased/decreased efficiency of utilization of nitrogen in this study. Because of the importance of the liver in AA utilization and ureagenesis, its role in the variations in the efficiency of nitrogen utilization in this study is hence highly probable. The nitrogen retention and average daily gain followed the same pattern of change. Both N and E diets lead to lower growth and protein net retention. The reduction of the level of intake or of the energy intake only has already been shown to induce a decreased N retention in previous studies (Calloway, 1975; Lapierre et al, 1999; Kraft et al. 2008). Concerning the impact of a decreased supply of nitrogen in the diet, either a reduction of the nitrogen retention is observed (Bruckentahl et al, 1997, this study) or nitrogen retention is unaltered (Calloway, 1975; Castillo et al., 2001; Kraft et al, 2008). The importance of the variation in the nitrogen supplied to the animals and the level of energy supply in the experimental diets may explain the discrepancies observed in the literature. Lastly, a significant decreased leucine and urea plasma concentration in N diet (at the same time as the decreased urea-N in urine) as well as plasma glucose concentration in E diet was observed. This is again consistent with what previously observed in ruminants fed nitrogen or energy supplemented/imbalanced diets (Raggio et al, 2004; Savary-Auzeloux et al, 2003; Kraft et al, 2008) and is directly related to the deficiency in nitrogen or energy in the diets.

The incubated liver slices: methodological aspects

The medium used for the incubation of the liver slices in this experiment was made of salts, albumin, physiological concentrations of amino acids and propionate. No hormones

such as insulin were added in the medium. This approach is quite novel since the vast majority of studies using liver slices or hepatocytes have used supraphysiological concentration of nutrients (Birchenall-Sparks et al. 1985, Pocius and Herbein 1985, Mutsvangwa et al. 1996, Overton et al., 1999). Even if the concentrations in nutrients used in our experiment is closer to *in vivo* conditions, the viability of the liver slices during the incubation period needed to be checked, as described in the Materials and methods section. The ratio protein / DNA (a criterion of viability of the cells; Donkin and Armentano, 1993) remained stable even after 4 hours of incubation. Similarly, the fractional synthesis rate of proteins is a good index of viability of the cells. When expressed as a fractional synthesis rate (FSR, %/d) (assuming that Val protein content in the sheep liver is equal to 520nmol of Val/mg of protein (Mac Rae et al., 1993)), the protein synthesis measured by incorporation of [U-^{14}C] valine in the liver slices in our experimental conditions ranged from 2 to 10%/d. These values are lower than *in vivo* values for FSR of hepatic proteins in ruminants (20%/d, Lobley et al., 1994). However, these data are consistent with values obtained in incubated hepatocytes (FSR : 11%, Birchenall-Sparks et al., 1985). Lastly, gluconeogenesis is lower in our study compared to values usually found *in vitro* (Donkin and Armentano, 1993). This can be explained by the utilization of supra-physiological concentration of the gluconeogenic precursors (up to 100 times higher, Overton et al., 1999) or enriched media (Donkin and Armentano, 1993) which directly stimulate these metabolic pathways.

Protein synthesis

Endogenous and exported protein synthesis was similar between C and E diets and increased significantly (+46 %) in N animals. Similarly to our *ex vivo* results, protein synthesis was increased in isolated hepatocytes of restricted rats compared to ad libitum fed animals (Birchenall-Sparks et al., 1985). These data are inconsistent with what found *in vivo* since protein synthesis in the liver usually increases with intake or after an AA (Connell et al., 1997; Mosoni et al., 1996) and in perfused livers (Flaim et al., 1982) or hepatocytes (Hutson et al., 1987). Concerning export protein synthesis *in vivo*, it is also generally increased when intake or nitrogen supply is increased in the diet (De Feo et al., 1992; Cayol et al., 1996; Connell et al., 1997; Caso et al., 2007). However, export protein synthesis has also been shown unresponsive to a mild increased protein supply in the diet (Raggio et al, 2007; Savary-Auzeloux et al, 2007). Yet, to our knowledge, no *in vivo* study has found an increased export protein synthesis in animals or humans when the nitrogen supply is decreased.

This difference in the response of the liver between the *ex vivo* and *in vivo* data can be explained by the homogeneity of the media used for the liver slices from C, N and E animals. *Ex vivo*, the liver slices are not subject to variations in metabolites supply (amino acids, energy nutrients) and hormones (insulin, glucagon, IGF-1) since the composition of the medium is fixed and similar for all liver slices (from animals fed C, N and E diets). On the contrary, the concentrations in metabolites and hormones are known to depend on the nutritional status *in vivo* (Wester et al., 1995). The increased protein synthesis observed *ex vivo* in the N slices is then due to a long-term and persistent adaptation of the hepatic metabolism to the N diet and does not depend on a short term response to nutrients or hormones. Whatever the underlying mechanism, a metabolic adaptation of the liver slices from the N fed animals led to an increased efficiency for the utilization of AA for protein synthesis. This phenomenon cannot be explained by an increased capacity for protein synthesis (ie an increased number of ribosomes relatively to proteins), as shown in Table 5. Consequently, an increased entry rate of AA within the cell (inducing an activation of protein synthesis) via an activation of AA transport systems (Fafournoux et al. 1982) or an increased efficiency for protein synthesis via an activation of translation events (Kimball et al, 1991; Anthony et al, 2001a,b) can be speculated. The first assumption is highly probable because Fehlmann et al. (1979) have already shown that fasting could stimulate a high affinity amino acids transport system in rats hepatocytes. Moreover during amino acid restriction, SNAT2 mRNA has been shown to be up-regulated, showing that amino acid transport system A is can be stimulated during amino acids deficiency in fibroblasts (Gazzola et al. 1981), placenta (Jones et al. 2006) and other cellular types (Gaccioli et al. 2006).

Concerning the E diet, protein synthesis was not modified *ex vivo* compared to C. No data on the effect of strict energy supplementations/depletion in the diet on *in vitro* hepatic protein synthesis were reported. Addition of glucose to the incubation medium of isolated rat diaphragm did not stimulate protein synthesis when insulin was not added simultaneously (Fulks et al., 1975). However, an increased intake is known to increase exported protein synthesis in ruminants (Connell et al, 1997) and recent results from our laboratory on animals fed a similar E diet have shown a decreased exported protein synthesis compared to a C diet (Savary-Auzeloux et al, 2007). Because we did not observe any alteration of protein synthesis *ex vivo* in E liver slices, the metabolites supply (propionate) or hormones (insulin) in the portal vein of the E animals may explain the decreased exported protein synthesis observed *in vivo* but not *ex vivo*. Insulin is a potential candidate since it is known to stimulate total hepatic protein synthesis and albumin synthesis *in vivo* (Ahlman et

al., 2001; Tesseraud et al., 2007) and *in vitro* (Jeejeebhoy et al., 1975; Fulks et al. 1975). In addition to the potential affect of propionate and insulin, other metabolites or hormones not accounted for (such as glucagon) might also be involved in the regulation of *in vivo* export protein synthesis.

The measurement of incorporation of ^{35}S methionine in specific proteins (albumin, fibrinogen and transferrin) aimed at checking if overall proteins were similarly affected by the diets or not. ^{35}S incorporation into albumin and transferrin remained stable whereas it increased in fibrinogen in liver slices from the N fed animals (similarly to what previously shown for total proteins). Consequently, the increased protein synthesis observed in the liver slices from the N fed lambs appears to be due to the increased synthesis of some specific proteins (among them, fibrinogen) whereas the synthesis of other proteins remained stable (albumin and transferrin). The difference in response of albumin and fibrinogen synthesis to various nutritional or hormonal stimuli has already been observed *in vivo* (De Feo and Lucidi, 2002). Albumin (a negative acute phase protein, Engler, 1995) synthesis has been demonstrated to be 'insulin-sensitive' *in vivo* and *in vitro* (Liang and Grieninger, 1981; De Feo et al., 1991, 1993; O' Riordain et al., 1995). On the contrary, fibrinogen (a positive acute phase protein, Engler, 1995) is less sensitive to insulin (Liang and Grieninger, 1981) and is responding to metabolic stresses (such as inflammation, cancer and sepsis). Since insulin is absent from our incubation medium, the lack of alteration of albumin synthesis (insulin-sensitive) *ex vivo* is logical. Contrarily, the increased fibrinogen synthesis shown in the N diet may then result, as for total hepatic proteins, from a more long-term adaptative mechanism (*ie* increased entry rate of AA within the liver or increased translational efficiency). The hypothesis of an increased translational efficiency becomes less tempting because its activation often leads to an overall and not specific increased protein synthesis.

Gluconeogenesis and oxidation of propionate and alanine

Propionate and alanine were chosen as the two gluconeogenic precursors in this study. Propionate was chosen because it is the main source of glucose production in ruminant liver (between 60 and 90%, Daenfer et al., 1995). The contribution of AA to neoglucogenesis is lower (about 10%) (Lindsay, 1978 and Wolff and Bergman, 1972) in ruminants fed at a maintenance level. However, among the AA, alanine was chosen because it is (with glutamine and glycine) one of the most potent gluconeogenic AA (Wolf and Bergman, 1972).

The incorporation of [U-^{14}C] alanine or [1-^{14}C]propionate into glucose was not altered in the liver slices from the E fed animals. Conversely, The N liver slices presented an increased incorporation of [U-^{14}C] alanine into glucose but not of [1-^{14}C] propionate. Consistent results were obtained by Velez and Donkin (2005) where a feed restriction in dairy cows did not influence propionate incorporation into glucose whereas lactate incorporation was higher. Gluconeogenesis from lactate is regulated by pyruvate carboxylase, similarly to alanine used in our study (Overton et al, 1999). On the other hand, Carlson et al. (2006) did not found any effect of feed restriction on propionate and alanine incorporation into glucose. In those two studies, the propionate present in the incubation medium remained constant. Leng and Annison (1963) and Demigné et al. (1991) have shown that, in sheep hepatocytes incubated *in vitro*, an increased concentration of propionate in the incubation medium led to an increased incorporation of propionate into glucose. *In vivo*, the net hepatic glucose flux is also increased as feed intake and propionate supply to the liver increase (Baird et al., 1980; Danfaer et al., 1995). Consequently, the supply of propionate to the liver is essential and drives hepatic glucose synthesis (Brockman, 1993). Because the nutrients concentrations is similar in the medium used for C, N and E liver slices, the absence of effect observed in our experimental model is not surprising.

Whereas the propionate conversion into glucose is mainly responsive to the propionate availability (Danfaer et al, 1995), the regulation of the relative contribution of other gluconeogenic nutrients is more complex. In the literature, when propionate availability is altered, the contribution of other gluconeogenic nutrients such as alanine is increased to allow glucose production and cover the requirements (Danfaer et al., 1995; Mutsvangwa et al., 1997; Majdoub et al, 2001). Similar mechanisms take place when glucose demand is increased such as during lactation (Mills et al., 1986) or after treatment with Phlorizin (Overton et al., 1999). The utilization of alanine is increased in the N whereas no increased gluconeogenesis from alanine was observed in E diet. The activation of AA transport systems in N diet, such as hypothesized for protein synthesis, may have also up-regulated gluconeogenesis (and also oxidation of alanine, even if not significantly increased) from alanine in a mass-action effect.

Lastly, liver slices from N and E animals presented an increased oxidation of [1-^{14}C]propionate compared to C animals. An increased activity of the TCA cycle (and CO_2 production) which could connected to an increased oxidation of propionyl-CoA or its by-products (succinyl-CoA, malonyl-CoA, …) (Faulkner and Pollock, 1986) can be hypothesized in both N nd E diets. An important energy requirement may be indeed necessary in both cases

: 1) to increase protein synthesis observed *ex vivo* in the N liver slices 2) to compensate the important shortage in energy nutrients in the liver of E lambs.

Implications

This model of liver slices incubated *ex vivo* and taken from animals fed nitrogen or energy imbalanced diets allowed the clear determination of some metabolic adaptations of the liver usually impossible to display *in vivo* due to the complex environment in terms of metabolites/hormones supply and the competitions between the tissues and organs for nutrients utilization. We clearly showed that the liver of growing ruminants is capable to increase its efficiency for AA utilization towards anabolic purposes, and particularly protein synthesis (and to a lesser extend gluconeogenesis) after a decreased nitrogen supply in the diet. This increased efficiency, probably due to an activation of hepatic AA transport systems, may perserve AA (in this situation in AA shortage) from catabolism. On the contrary, no such adaptative mechanisms take place when the energy supply is decreased relatively to nitrogen, where the liver protein synthesis and gluconeogenesis is more driven by the nutrients and hormones supply in this case.

Literature cited

Ahlman B., M. Charlton, A. Fu, C. Berg, P. O'Brien, and K. S. Nair. 2001. Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein sythesis.

Aiello, R. J., L. E. Armentano, S. J. Bertics, and A. T. Murphy. 1989. Volatile fatty acid uptake and propionate metabolism in ruminant hepatocytes. J. Dairy. Sci. 72:942-949.

Anthony, T. G., J. C. Anthony, F. Yoshizawa, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson. 2001a. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. J. Nutr. 131:1171-1176.

Anthony, T. G., A. K. Reiter, J. C. Anthony, S. R. Kimball, and L. S. Jefferson. 2001b. Deficiency of dietary EAA preferentially inhibits mRNA translation of ribosomal proteins in liver of meal-fed rats. Am. J. Physiol. 281:E430-E439.

Ash, R., and Baird G. D. 1973. Activation of volatile fatty acids in bovine liver and rumen epitheliaium. Evidence of control by autoregulation. Biochem. J. 136:311-319.

Attaix, D., A. Manghebati, J. Grizard, and M. Arnal. 1986 Assessment of in vivo protein synthesis in lamb tissues with [^{3}H] Valine flooding doses. Biochim. Biophys. Acta. 882:389-397.

Baird, G. D., M. A. Lomax, H. W. Symonds, S. R. Shaw. 1980. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. Biochem. J. 186:47-57.

Berthelot M.P.E. 1859. Repert. Chim. Appl. 284.

Birchenall-Sparks, M. C., M. S. Roberts, J. Staeker, J. P. Hardwick, and A. Richardson. 1985. Effect of dietary restriction on liver protein synthesis in rats. J. Nutr. 115:944-950.

Brockman R. P. 1993. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. Pages 247-265 in Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism. J. M. Forbes and J. France, eds. CAB International, Wallingford, United Kingdom.

Bruckental, I., G.B. Huntington, C.K. Baer, and R.A. Erdman. 1997. The effect of abomasal infusion of casein and recombinant somatotropin hormone injection on nitrogen balance and amino acid fluxes in portal-drained viscera and net hepatic and total splanchnic blood in Holstein steers. J. Anim. Sci. 75:1119-1129.

Calder A. G., K. E. Garden, S. E. Anderson, and G. E. Lobley. 1999. Quantitation of blood and plasma amino acids using isotope dilution electron impact gas chromatography/mass spectrometry with U-(13)C amino acids as internal standards. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 13:2080-2083.

Calloway D. H. 1975. Nitrogen balance of men with marginal intakes of protein and energy. J. Nutr. 105: 914-923.

Carlson D. B., N. B. Litherland, H. M. Dann, J. C. Woodworth and J. K. Drackley. 2006. Metabolic effects of abomasal L-Carnithine infusion and feed restriction in lactating Holstein cows. J. Dairy. Sci. 89:4819-4834.

Caso, G., J. Feiner, I. Mileva, L. J. Bryan, P. Kelly, K. Autio, M. C. Gelato, and M. A. McNurlan. 2007. Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and elderly subjects. Am. J. Clin. Nutr. 85:446-451.

Castillo A. R., Kebreab E., Beever D. E., Barbi J. H., Sutton J. D., Kirby H. C., France J. 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. J. Anim. Sci. 79:247-253.

Cayol, M., Y. Boirie, J. Prugnaud, P. Gachon, B. Beaufrere, and C. Obled. 1996. Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans: effects of tracer route infusion and dietary proteins. Am. J. Physiol. 270:E980-E987.

Connell, A., A. G. Calder, S. E. Anderson, and G. E. Lobley. 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. Brit. J. Nutr. 77:255-271.

Danfaer, A., V. Tetens, and N. Agergaard. 1995. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. Comp Biochem. Physiol. 111:201-210.

Dardevet, D., C. Sornet, and J. Grizard. 1999 Glucocorticoid-induced insulin resistance of protein synthesis is independent of the rapamycin-sensitive pathways in rat skeletal muscle. J. Endocrinol. 162:77-85.

Dardevet, D., C. Sornet, T. Vary, and J. Grizard. 1996. Phosphatidylinositol 3-Kinase and p70 S6 kinase participate in the regulation of protein turnover in skeletal muscle by insulin-like growth factor I. Endocrinology. 137:4087-4094.

Davis, T. A., D. G. Burrin, M. L. Fiorotto, P. J. Reeds, and, F. Jahoor. 1998. Roles of insulin and amino acids in the regulation of protein synthesis in the neonate. J. Nutr. 128:347S-350S.

De Feo, P., M. Gan Gaisano, and M. W. Haymond 1991. Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. J. Clin. Invest. 88:833-840.

De Feo, P., F. F. Horber, and M. W. Haymond. 1992. Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. Am. J. Physiol. 263:E794-E799.

De Feo, P., and P. Lucidi. 2002. Liver protein synthesis in physiology and in disease states. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 5:47-50.

De Feo, P., E. Volpi, P. Lucidi, G. Cruciani, G. Reboldi, D. Siepi, E. Mannarino, F. Santeusanio, P. Brunetti, and G. B. Bolli. 1993. Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. Diabetes. 42:995-1002.

Demigné, C., C. Yacoub, C. Morand, and C. Rémésy. 1991. Interactions between propionate and amino acid metabolism in isolated sheep hepatocytes. Br. J. Nutr. 65:301-317.

Donkin, S. S., and L.E. Armentano. 1993. Preparation of extended in vitro cultures of bovine hepatocytes that are hormonally responsive. J. Anim. Sci. 71:2218-2227.

Doumas, B. T., W. A. Watson, and H. G. Biggs. 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clin. Chim. Acta. 31 :87-96.

Egerland, A., J. P. Reynier, O. Ballevre, J. Dicostanzo, C. Obled, and M. Arnal. 1996. Protein synthesis measurement in cancer patients with 13C Valine. Clin. Chim. Acta. 252:51-60.

Engler, R. 1995. Protéines de la phase aigüe de l'inflammation. C.R. Seances Soc. Biol. Fil. 189:563-578.

Fafournoux, P., C. Rémésy, and C. Demigné 1982. Stimulation of amino acid transport into liver cells from rats adapted to a high-protein diet. Biochem. J. 206:13-18.

Fafournoux, P., C. Rémésy, and C. Demigné. 1990. Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. Am. J. Physiol. 259:E614-E625.

Faulkner A., and Pollock H. T. 1986. Propionate metabolism and its regulation by fatty acids in ovine hepatocytes. Comp. Biochem. Physiol. 64B:559-563.

Fehlmann, M., A. Le Cam, P. Kitabgi, F. F. Rey, and P. Freychet. 1979. Regulation of amino acid transport in the liver. Emergence of a high affinity transport system in isolated hepatocytes from fasting rats. J. Biol. Chem. 254:401-407.

Ferrell, C.L., H.C. Freetly, A. L. Goetsch, and K. K. Kreikemeier. 2001. The effect of dietary nitrogen and protein on feed intake, nutrient digestibility, and nitrogen flux across the portal-drained viscera and liver of sheep consuming high-concentrate diets ad libitum. J. Anim. Sci. 79:1322-1328.

Flaim, K. E., S. M. Hutson, C. E. Lloyd, J. M. Taylor, R. Shiman, and L. S. Jefferson. 1985. Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. Am J Physiol 249:E447-453.

Flaim, K.E., D. E. Peavy, W. V. Everson, and L.S. Jefferson. 1982. The role of amino acids in the regulation of protein synthesis in perfused rat liver. I. Reduction in rates of synthesis resulting from amino acid deprivation and recovery during flow-through perfusion. J. Biol. Chem. 257:2932-2938.

Fossati P., and L. Prencipe. 1982. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. Clin. Chem. 28:2077-2080.

Fulks R. M., J. B. Li, A. L. Goldberg. 1975. Effects of insulin, glucose and amino acids on protein turnover in rat diaphragm. J. Biol. Chem. 250:290-298.

Gaccioli F., C. C. Huang, C. Wang, E. Bevilacqua, R. Franchi-Gazzola, G. C. Gazzola, O. Bussolati, M. D. Snider, and M. Hatzolglou. 2006. Amino acid starvation induces the SNAT2 neutral amino acid transporter by a mechanism that involves eukaryotic initiation factor 2α phosphorylation and cap-independent translation. J. Biol. Chem. 281:17929-17940.

Garlick, P. J., M. A. McNurlan, T. Bark, C. H. Land, and M. C. Gelato. 1998. Hormonal regulation of protein metabolism in relation to nutrition and disease. J. Nutr. 128:356S-359S.

Gazzola, G. C., V. Dall'Asta, and G. G. Guidotti. 1981. Adaptative regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. Sites and mechanism of action. J. Biol. Chem.

256:3191-3198.

Grizard, J., M. Balage, and M. Manin. 1986. Hormonal control of hepatic metabolism in ruminants. Reprod. Nutr. Develop. 26:245-257.

Gruffat-Mouty, D., B. Graulet B., D. Durand, M. E. Samson-Bouma, and D. Bauchart. 1999. Apolipoprotein B production and very low density lipoprotein secretion by calf liver slices. J. Biochem. 126:188-193.

Guerino, F., G. B. Huntington, and R. A. Erdman. 1991. The net portal and hepatic flux of metabolites and oxygen consumption in growing beef steers given postruminal casein. J. Anim. Sci. 69:387-395.

Gutmann, I., and H. U. Wahlefeld. 1974. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. Pages 1464-1468 in Methods of enzymatic analysis. M. U. Bergmeyer, ed. Verlag chemie, Weinheim, Germany.

Heitmann, R. N., and E. N., Bergman. 1980. Transport of amino acids in whole blood and plasma of sheep. Am. J. Physiol. 239:E242-E247.

Hutson, S. M., C. Stinson-Fisher, R. Shiman, and L.S. Jefferson. 1987. Regulation of albumin synthesis by hormones and amino acids in primary cultures of rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 252:E291-E298.

Jarrige, R. 1989. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and Feed Tables. Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique, pp. 389.

Jeejeebhoy K. N., J. Ho, G. R. Greenberg, M. J. Phillips, A. Bruce-Robertson and U. Sotke. 1975. Albumin, Fibrinogen and transferrin synthesis in isolated rat hepatocyte suspensions. A model for the study of plasma protein synthesis. Biochem. J. 146:141-155.

Jones H. N., C. J. Ashworth, K. R. Page, and H. J. McArdle. 2006. Expression and adaptative regulation of amino acid transport system A in a placental cell line under amino acid restriction. Reprod. 131:951-960.

Kimball, S. R., D. A. Antonetti, R. M. Brawley, and L. S. Jefferson. 1991. Mechanism of inhibition of peptide chain initiation by amino acid deprivation in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 266:1969-1976.

Kimball, S. R., R. L. Horetsky, and L. S. Jefferson. 1995. Hormonal regulation of albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 268:E6-14.

Kraft.G, I. Ortigues-Marty, D. Durand, Remond , T. Jarde, B. Bequette, I. Savary-Auzeloux. 2008. Role of the splanchnic tissues in the utilization of the nitrogenous nutrients in

lambs fed a diet imbalanced in nitrogen or energy. Submitted to *Animal*. ***Publication n° 1***

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

Lapierre, H., J.F. Bernier, P. Dubreuil, C.K. Reynolds, C. Farmer, D.R. Ouellet, and G.E. Lobley. 1999. The effect of intake on protein metabolism across splanchnic tissues in growing beef steers. Br. J. Nutr. 81:457-466.

Lapierre, H., R. Berthiaume, G. Raggio, M. C. Thivierge, L. Doepel, D. Pacheco, P. Dubreuil, and G. E. Lobley. 2005. The route of absorbed nitrogen into milk protein. Anim. Sci. 80:11-22.

Leng, R. A., and E. F. Annison. 1963. Metabolism of acetate, propionate and butyrate by sheep-liver slices. Biochem. J. 86:319-327.

Leplaix-Charlat L., D. Bauchart, D. Durand, M. Laplaud, and M. J. Chapman. 1996. Plasma lipoproteins in preruminant calves fed diets containing tallow or soybean oil with and without cholesterol. J. Dairy. Sci. 79:1267-1277.

Liang, T. J., and G. Grieninger. 1981. Direct effect of insulin on the synthesis of specific plasma proteins: biphasic response of hepatocytes cultured in serum- and hormone-free medium. Proc. Natl. Acad. Sci. 78:6972-6976.

Lindsay, D. B. 1978. Gluconeogenesis in ruminants. Biochem. Soc. Trans. 6:1152-1156.

Lobley G. E. 1992. Control of the metabolic fate of amino acids in ruminants: a review. J. Anim. Sci. 70:3264-3275.

Lobley, G. E., A. Connell, E. Milne, A. M. Newman, and T. A. Ewing. 1994. Protein synthesis in splanchnic tissues of sheep offered two levels of intake. Brit. J. Nutr. 71:3-12.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Luo, Q. J., S. A. Maltby, G. E. Lobley, A. G. Calder, and M. A. Lomax. 1995. The effect of amino acids on the metabolic fate of 15NH4CL in isolated sheep hepatocytes. Eur. J. Biochem. 228:912-917.

MacRae, J. C., A. Walker, D. Brown, G. E. Lobley. 1993. Accretion of total protein and individual amino acids by organs and tissues of growing lambs and the ability of nitrogen balance techniques to quantitate protein retention. Anim. Prod. 57:237-245.

Majdoub L, Vermorel M, Ortigues-Marty I. 2003. Intraruminal propionate supplementation modifies hindlimb energy metabolism without changing the splanchnic release of glucose in growing lambs. Br. J. Nutr. 89:39-50.

Morzel, M., C. Chambon, M. Hamelin, V. Santé-Lhoutellier, T. Sayd, and G. Monin. 2004. Proteome changes during pork meat ageing following use of two different pre-slaughter handling procedures. Meat. Sci 67:689-696.

Mills, S. E., L. E. Armentano, R. W. Russell, and J. W. Young. 1981. Rapid and specific isolation of radioactive glucose from biological samples. J. Dairy. Sci. 64:1719-1723.

Mills, S. E., D. C. Beitz, and J. W. Young. 1986. Evidence for impared metabolism in liver during induced lactation ketosis of dairy cows. J. Dairy. Sci. 69:362-370.

Mosoni, L., T. Malmezat, M. C. Valluy, M. L. Houlier and P. Patureau-Mirand. 1996. Muscle and liver protein synthesis adapt efficiently to food deprivation and refeeding in 12-month-old rats. J. Nutr. 126:516-522.

Mutsvangwa, T., J. G. Buchanan-Smith, and B. W. McBride. 1996. Interactions between ruminal degradable nitrogen intake and in vitro addition of substrates on patterns of amino acid metabolism in isolated ovine hepatocytes. J. Nutr. 126:209-218.

Mutsvangwa, T., J. G. Buchanan-Smith, and B. W. McBride. 1997. Effects of ruminally degradable nitrogen intake and in vitro addition of ammonia and propionate on the metabolic fate of L-[1-14C]alanine and L-[15N]alanine in isolated sheep hepatocytes. J. Anim. Sci. 75:1149-1159.

O'Riordain, M. G., J. A. Ross, K. C. H. Fearon, J. Maingay, M. Farouk, O. J. Garden, and D. C. Carter. 1995. Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. Am. J. Physiol. 269: E323-330.

Overton, T. R., J. K. Drackley, C. J. Ottermann-Abbamonte, A. D. Beaulieu, L. S. Emmert, and J.H. Clark. 1999. Substrate utilisation for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. J. Anim. Sci. 77:1940-1951.

Pocius, P. A., and J. H. Herbein. 1986. Effects of in vivo administration of growth hormone on milk production and in vitro hepatic metabolism in dairy cattle. J. Dairy Sci. 69:713-720.

Raggio, G., R. Pacheco, R. Berthiaume, G. E. Lobley, D. Pellerin, G. Allard, P. Dubreuil, and H. Lapierre. 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 87:3461-3472.

Raggio, G., G. E. Lobley, R. Berthiaume, D. Pellerin, G. Allard, P. Dubreuil, and H. Lapierre. 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 90:352-359.

Reynolds C.K. 2006. Splanchnic amino acid metabolisms in ruminants. Pages 225-248 in Ruminant Physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Sejrsen K. Hvelplund T. & Nielsen M.O., eds. Wageningen Academic Publisher, Wageningen, The Netherlands.

Ricca, G. A., D. S. Liu, J. J. Coniglio, and A. Richardson. 1978. Rates of protein synthesis by hepatocytes isolated from rats of various ages. J. Cell. Physiol. 97:137-146.

Richmond W. 1973. Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. Clin. Chem. 19:1350-1356.

Savary, I., E. Debras, D. Dardevet, C. Sornet, P. Capitan, J. Prugnaud, P. Patureau-Mirand, and J. Grizard. 1998. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. Br. J. Nutr. 79:297-304.

Savary-Auzeloux I., L. Majdoub, N. Le Floc'h, and I. Ortigues-Marty. 2003. Ryegrass-based and barley supplementation: partition of nitrogenous nutrients among splanchnic tissues and hind limb in finishing lambs. J. Anim. Sci. 81:3160-3173.

Savary-Auzeloux I., G. Kraft & I. Ortigues-Marty I. 2007. Can liver protein synthesis be affected by an imbalanced dietary supply of energy or nitrogen in growing lambs? In Proceedings of the 2nd International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition, pp 351-352. [Ortigues-Marty I. ed.] Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Smith K. L., M. R. Waldron, L. C. Ruzzi, J. K. Drackley, M. T. Socha and T. R. Overton. 2008 Metabolism of dairy ows as affected by prapartum dietary carbohydrate source and supplementation with chromium throughout the periparturient period. J. Dairy. Sci. 91:2011-2020.

Takayama M., S. Itoh, T. Nagasaki, and I. A. Tanimizu. 1977. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. Clin. Chim. Acta. 79:93-98.

Tesseraud S., S. Metayer, S. Duchene, K. Bigot, J. Grizard, and J. Dupont. 2007. Regulation of protein metabolism by insulin value of different approaches and animal models. Domest. Anim. Endocrinol. 33:123-142.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6:21-27.

Velez, J. C., and S. S. Donkin. 2005. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. J. Dairy Sci. 88:2938-2948

Volpi, E., P. Lucidi, G. Cruciani, F. Monacchia, G. Reboldi, P. Brunetti, G. B. Bolli, and P. De Feo. 1996. Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. Diabetes 45:1245-1252.

Wester T. J., R. A. Britton, T. J. Kopfenstein, G. A. Ham, D. T. Hickok and C. R. Krehbiel. 1995. Differential effects of plane of protein or energy nutrition on visceral organs and homones in lambs. J. Anim. Sci. 73:1674-1688.

Wester, T. J., G. E. Lobley, L. M. Birnie, L. A. Crompton, S. Brown, V. Buchan, A. G. Calder, E. Milne, and M. A. Lomax. 2004. Effect of plasma insulin and branched-chain amino acids on skeletal muscle protein synthesis in fasted lambs. Br. J. Nutr. 92:401-409.

Williamson, D. H., J. Mellanby. 1974. D-(-)-3-Hydroxybutyrate. Pages 2266-2302 in Methods of enzymatic analysis. M. U. Bergmeyer, ed. Verlag chemie, Weinheim, Germany

Wolff, J. E., and E. N. Bergman. 1972. Gluconeogenesis from plasma amino acids in fed sheep. Am. J. Physiol. 223:455-460.

Table 1. Composition of the concentrates (#1, #2 and #3) used in the three experimental diets, chemical composition and dry matter allowances of the three concentrates and forage.

	Concentrate			Forage
	#1	#2	#3	(Hay)
Ingredients, g/kg of DM (for the concentrate)				
Maize	500	500	580	
Corn starch	160	240	0	
Corn gluten meal	55	10	100	
Soya bean meal 48%	55	40	80	
Rapeseed meal	65	55	70	
Barley	65	55	70	
Molasses	40	40	40	
Bicarbonate	20	20	20	
Mineral & Vitamin premix[a]	40	40	40	
Chemical composition, g/kg DM				
DM[b], g/kg OM	87.6	87.6	87.9	90.4
Ash	71	62	67	65
CP	127	92	172	80
Cellulose	55	38	59	306
Starch	519	634	518	
Lipid	22	20	27	
Nitrogen, g/kg DM	22.2	15.7	26.7	11.8
ME, kJ/kg DM (estimated[c])	12.94	13.06	13.30	6.85
DM allowances, g / (d · $kg^{0.75}$)				
Diet C	42.9			18.8
Diet N		42.9		18.6
Diet E			34.9	15.2

[a] Vitamin and mineral premix 2%, Agro-Base Bourg-en-Bresse, France. (22% Ca, 7.3% Na, 1% Mg, 0.99% S, Fe, Zn, Mn, I, Co, Se and Vitamins A, D, E, B1, B2 B6, B12, PP, K3, folates)
[b] DM, Dry Matter; OM, Organic Matter; MM, Mineral Matter; OMd, Organic Matter digestibility; ME, Metabolizable Energy
[c] Estimation from institut National de Recherches Agronomiques feeding system (Jarrige, 1989).

Table 2. Live weight, daily gain, intake, digestibility and N balance of growing lambs fed the Control (C), Nitrogen Imbalance (N) or Energy imbalance (E) diets*.

	Diet				*P*-value	
	C	N	E	SEM	Diet	Block
Intake						
Total DM, g/d	791[a]	783[b]	624[c]	2	< 0.001	< 0.001
Hay	241[a]	237[b]	190[c]	0.4	< 0.001	< 0.001
Concentrate 1	551					
Concentrate 2		546				
Concentrate 3			435			
Apparent DM digestibility of diets, %	78.9	76.6	77.6	0.84	0.18	0.08
Ingested Metabolizable energy, MJ/d	8.77[a]	8.69[b]	7.08[c]	0.022	< 0.001	< 0.001
Ingested Nitrogen, g/d	14.13[a]	10.90[b]	14.26[a]	0.08	< 0.001	< 0.001
Digested nitrogen g/d	9.51[a]	6.09[b]	10.10[a]	0.23	< 0.001	0.06
Apparent nitrogen digestibility, %	69.3[a]	56.0[b]	70.9[a]	1.7	< 0.001	0.04
Nitrogen digested / ME intake, g/MJ	1.08	0.70	1.42	0.03	<0.001	0.06
Live weight						
Average live weight, kg	30.0 [a]	29.7 [a]	28.9 [a]	0.45	0.20	< 0.001
Average daily gain, g/d	147.5 [a]	88.3 [b]	65.3 [b]	16.7	0.02	0.14
Nitrogen balance						
Fecal Nitrogen, g/d	4.6	4.8	4.2	0.21	0.12	0.02
Urinary Nitrogen, g/d	5.2[b]	3.0[a]	6.8[c]	0.24	< 0.001	0.03
Retained Nitrogen, g/d	4.3[a]	3.1[b]	3.3[b]	0.30	0.05	0.23
Retained Nitrogen, % of digested Nitrogen	45.1[a]	50.6[a]	32.7[b]	1.01	0.11	0.23

*Least square means with SEM given for n=6 for C, N and E diets
Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) for diet effect.

Table 3 Concentrations of total, essential, non essential, branched chain amino acids and individual amino acids (μ*M*) in plasma, blood urea (μ*M*), plasma proteins (g/L), energy nutrients in blood (μ*M*) and plasma hormones (pg/mL) in growing lambs fed the Control (C), Nitrogen imbalanced (N) or Energy imbalanced (E) diets*

		Diet				*P*-value	
Metabolite		C	N	E	SEM	Diet	Block
Plasma amino acids, μ*M*							
TAA[1]		2969.9	3226.2	3155.5	316.1	0.70	0.71
NEAA		1953.3	2182.0	1952.8	99.2	0.22	0.76
EAA		1016.7	1044.2	1202.8	139.6	0.61	0.62
BCAA		475.8	455.5	481.0	21.7	0.69	0.08
EAA	Histidine	110.5	102.8	107.4	5.1	0.59	0.54
	Isoleucine	106.4[ab]	111.3[a]	99.6[b]	3.5	0.08	0.06
	Leucine	172.8[a]	152.5[b]	185.0[a]	4.9	0.01	0.03
	Lysine	136.5	179.8	139.0	17.3	0.17	0.56
	Methionine	76.5	75.6	75.3	1.2	0.77	0.19
	Phenylalanine	80.5	77.3	92.5	7.1	0.48	0.73
	Thréonine	136.9	153.2	115.7	17.4	0.36	0.38
	Valine	196.6	191.7	178.1	11.0	0.49	0.04
NEAA	Alanine	263.3	293.0	236.4	18.3	0.16	0.73
	Asparagine	134.8	137.4	142.9	11.7	0.93	0.02
	Aspartate	20.5	22.3	20.5	2.2	0.67	0.16
	Glutamate	166.8	183.2	179.3	9.4	0.44	0.02
	Glutamine	424.6	469.2	435.6	34.0	0.61	0.22
	Glycine	584.8[a]	730.6[b]	510.8[a]	42.2	0.02	0.93
	Proline	154.4	134.3	156.7	7.5	0.18	0.18
	Serine	98.4	109.8	98.8	8.6	0.63	0.84
	Tyrosine	105.7	102.2	116.1	5.1	0.40	0.51
Blood Urea, μ*M*		2632.1[b]	1055.9[a]	4323.5[c]	278.3	< 0.001	0.07
Plasma proteins, g/L							
	Total proteins	79.2	81.2	84.1	1.65	0.30	0.46
	Albumin	39.7[ab]	38.0[a]	40.9[b]	0.60	0.05	0.11
Other metabolites, μ*M*							
Plasma	TG	406.9	383.1	394.3	9.6	0.54	0.58
	PL	999.9	941.4	895.0	31.1	0.48	0.11
	TC	944.3	843.4	786.1	44.9	0.35	0.46
	FC	106.6	109.5	74.9	13.9	0.31	0.61
	EC	1407.4	1232.8	1194.7	76.2	0.51	0.34
	NEFA	37.5[a]	37.5[a]	50.5[b]	3.4	0.08	0.04
Blood	Glucose	2956.8[a]	2951.6[a]	2720.5[b]	44.3	0.01	0.02
	β-OH	651.0	618.3	665.0	64.6	0.90	0.44
	Lactate	2393.6	2539.5	2208.3	245.6	0.21	0.02
	Acetate	664.8	618.7	817.5	63.9	0.15	0.44
Plasma hormones, pg/mL							
	Insulin	872.0	945.2	977.8	158.7	0.89	0.25
	Glucagon	1010.3	967.7	944.2	221.2	0.94	0.63

*Least square means, n=6 for C, N and E diets.
Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) for diet effect.
[1]TAA = total amino acids (AA); EAA = essential AA; NEAA = non essential AA; BCAA = branched-chain AA; TG = triglycerides; PL = phospholipids; TC = total cholesterol; FC = free cholesterol; EC = esterified cholesterol; NEFA = non-esterified fatty acids; β-OH = 3-hydroxybutyrate

Table 4. Ratio Protein / DNA concentration (mg protein / µg DNA) in liver slices after slaughter or after 4 hours of incubation from growing lambs fed the Control (C), Nitrogen imbalanced (N) or Energy imbalanced (E) diets

	Diet				*P*-value	
	C	N	E	SEM	Diet	Block
Ratio Protein/DNA*						
At slaughter	23.1	23.1	22.4	0.83	0.79	0.28
After 4h incubation	22.9	23.7	24.9	0.54	0.30	0.26

* Least square means, n=5 for C, N and E diets at slaughter and n=3 for C, N and E diets after 4 hours of incubation
Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) for diet effect

	At slaughter	After 4h incubation	SEM	*P*-value
				Incubation time
Ratio Protein/DNA*	22.8	23.8	0.71	0.15

* Least square means, n=3 for C, N and E diets.
Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) for Time effect

Table 5. Total, endogenous, exported and individual proteins (Albumin, fibrinogen, transferrin) synthesis measured by incorporation of [U-^{14}C] Val or ^{35}S Met in proteins from liver slices incubated ex vivo and capacity of synthesis in the liver from lambs fed Control (C), Nitrogen imbalanced (N) or Energy imbalanced (E) diets.

	Diet				*P*-value	
	C	N	E	SEM	Diet	Block
Synthesis of proteins using [U-^{14}C] valine[*1], nmol Val/ mg DNA / h						
Total proteins	7.74^{a}	11.29^{b}	6.77^{a}	0.88	0.01	0.07
Endogenous proteins	7.01^{a}	10.59^{b}	6.29^{a}	0.805	0.01	0.07
Exported proteins	0.48^{a}	0.70^{b}	0.51^{a}	0.050	0.02	0.03
Capacity of synthesis, µg total RNA / mg protein	44.5	43.6	40.9	1.4	0.22	0.15
Synthesis of individual proteins using ^{35}S methionine[2], nmol Met / mg DNA / h						
Albumin synthesis	0.111	0.131	0.133	0.0154	0.59	0.42
Fibrinogen synthesis	0.015^{a}	0.024^{b}	0.019^{a}	0.0018	0.04	0.22
Tranferrin synthesis	0.006	0.007	0.006	0.0006	0.38	0.10

[*]Least square means, n=6 for C, N and E diets.

[1] Acid soluble proteins synthesis measured using [U-^{14}C] Valine and liver slices incubation for 2 hours
[2] Individual proteins synthesis measured using ^{35}S Methionine and liver slices incubation for 4 hours

Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) for Time effect

Table 6. Incorporation of [1-^{14}C] propionate and [U-^{14}C] alanine into glucose and CO_2 measured in liver slices from growing lambs fed the Control (C), Nitrogen imbalanced (N) and Energy imbalanced (E) diets

	Diet				*P*-value	
	C	N	E	SEM	Diet	Block
Utilization of propionate[1], nmol of propionate / mg DNA / h						
Into glucose	5.19	5.45	4.77	0.69	0.76	0.63
Into CO_2	25.2 [a]	37.7 [b]	36.6 [b]	3.24	0.04	0.17
Utilization of alanine[2], nmol of alanine / mg DNA / h						
Into glucose	2.47 [ab]	3.96 [a]	1.66 [b]	0.64	0.08	0.85
Into CO_2	2.69	4.17	2.99	0.72	0.34	0.99

Within a row, means without a common superscript letter differ ($P < 0.05$) for diet effect.
[1] Incubation of liver slices for 2h
[2] Incubation of liver slices for 4h

Discussion générale

Discussion générale

Ce travail de thèse a donc permis de mieux appréhender, chez le Ruminant en croissance, le degré de plasticité et d'adaptation du métabolisme des AA dans les tissus de l'aire splanchnique vis-à-vis d'un apport déséquilibré en azote ou en énergie dans la ration. La compréhension de ces adaptations métaboliques est une étape importante pour proposer des stratégies nutritionnelles innovantes ou soutenir des stratégies nutritionnelles utilisées en pratique par les éleveurs (Veysset et coll., 2007).

Ainsi, chez des agneaux en croissance, nous avons étudié l'impact d'un régime témoin (T), déséquilibré en azote (N) ou déséquilibré en énergie (E) sur la rétention azotée totale et l'utilisation nette des AA par les tissus de l'aire splanchnique *in vivo*. Dans un second temps, et pour expliquer les prélèvements nets en nutriments observés dans l'aire splanchnique (notamment au niveau hépatique) suite à l'ingestion des différents régimes, nous avons mesuré *in vivo* et *in vitro* l'activité de voies métaboliques impliquées dans l'utilisation hépatique des AA (synthèse protéique, néoglucogenèse, oxydation). La confrontation des données obtenues sur l'activité de certaines voies métaboliques mesurées *in vivo* et *in vitro*, nous a permis de poser des hypothèses concernant les mécanismes de régulation de ces voies ainsi que l'adaptation métabolique du foie aux différents régimes.

1. Impact des régimes sur la rétention azotée corporelle et l'adéquation entre émission nette splanchnique d'AA et utilisation supposée du muscle.

1.1. Rétention azotée et croissance

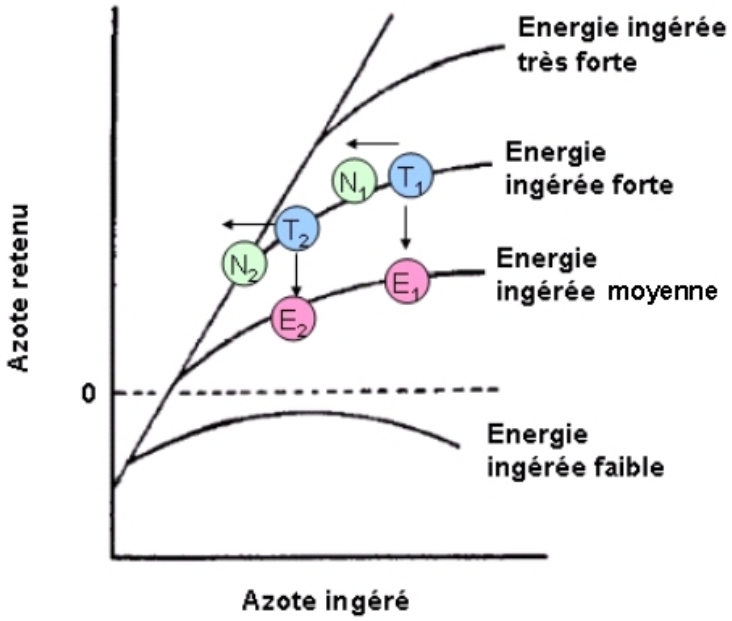
Nos résultats de rétention azotée corporelle (***Publication 1 et 4***) montrent l'importance du concept d'équilibre énergético-azoté dans la ration. En effet, une réduction modérée de l'azote digéré (-23,5 %) dans la ration (donc une baisse du ratio azote digéré/energie métabolisable ingérée) ne se traduit pas par une baisse de la croissance ni de la rétention azotée (***Expérimentation 1***) et même par une augmentation de l'efficacité (Tableau 11). Ceci est cohérent avec les données obtenues sur vaches laitières où une supplémentation en protéines métabolisables chez des vaches ne se traduisait pas non plus par une augmentation de production laitière (Metcalf et coll., 1994; Castillo et coll., 2001). Cependant, lorsque la baisse d'azote digéré est plus importante (-36 %), on constate une baisse de la croissance et de la rétention azotée (-28 % pour la rétention azotée, P = 0,05) mais l'efficacité de production reste identique au régime T (***Expérimentation 2***) (Tableau 11, Figure 44). Ce décalage entre

les deux experimentations pourrait être dû à un niveau de base d'apport azoté (régime T) plus faible dans la seconde expérimentation (Figure 44).

Tableau 11 Ratio azote digéré / énergie métabolisable ingéré (N digéré/ EM ingéré), Bilan d'azote (azote urinaire, fécal et retenu en g / j et en % du digéré) et métabolisme de l'urée (production nette hépatique, urée dans l'urine et urée recyclée vers les tissus drainés par la veine porte (TDVP)) pour les animaux nourris avec les régimes témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en énergie (E), lors des deux expérimentations : Expérimentation 1 *in vivo*, Expérimentation 2 *ex vivo*.

	Expérience 1					Expérience 2				
	T	N	E	*SEM*	*P*	T	N	E	*SEM*	*P*
N digéré/EM ingéré	1,15^{b}	0,87^{a}	1,31^{c}	*0.05*	*0.001*	1,08^{b}	0,70^{a}	1,42^{c}	*0.03*	*<0.001*
Azote urinaire en g / j	8,1^{b}	5,1^{a}	9,7^{c}	*0,28*	*0,001*	5,2^{b}	3,0^{a}	6,8^{c}	*0,24*	*<0,001*
en % du digéré	50.1^{b}	41.0^{a}	66.9^{c}	*2.08*	*0.001*	-	-	-	-	-
Azote fécal en g/j	7,1^{b}	6,3^{a}	5,7^{a}	*0,25*	*0,02*	4,6	4,8	4,2	*0,21*	*0,12*
Azote retenu en g/j	8,1^{a}	7,3^{a}	5,0^{b}	*0,51*	*0,01*	4,3^{a}	3,1^{b}	3,3^{b}	*0,30*	*0,05*
en % du digéré	49,9^{b}	59,0^{c}	33,1^{a}	*2,08*	*<0.001*	45,1^{a}	50,6^{a}	32,7^{b}	*1.0*	*0.11*
Urée										
production nette hépatique en g/j	10,9^{a}	6,9^{b}	11,6^{a}	*0,46*	*<0,001*					
excrétée dans l'urine en g/j	5,6a	2,9b	7,3c	*0,37*	*<0,001*					
recyclée vers les TDVP en g/j	5,7	4,7	5,4	*0,47*	*0,33*					

Figure 44 Effet de l'énergie et de l'azote ingéré par les Ruminants sur l'azote retenu (Balch 1967).
Les résultats correspondants à l'azote retenu chez les agneaux nourris avec les régimes témoin (T), déséquilibrés en azote (N), et déséquilibrés en énergie (E) sont positionnés sur le graphique. Les indices 1 et 2 correspondent aux expérimetations 1 (*in vivo*) et 2 (*ex vivo*)



Dans ces deux expérimentations, une partie de l'azote apporté dans le régime T est catabolisée, comme en témoigne la plus forte quantité d'urée (en pourcentage de l'azote digéré) excrétée par les animaux T relativement aux animaux N (Tableau 11). De plus le recyclage de l'urée vers les TDVP et maintenu dans le régime N malgré la plus faible quantité d'urée produite par le foie. Ces données tendent à prouver 1) que les animaux N sont plus efficaces pour utiliser l'azote alimentaire relativement aux animaux T et 2) que les recommandations INRA en azote (PDI) surestiment les besoins azotés stricts des agneaux en croissance.

Par contre, la baisse, même modérée, d'apport énergétique dans la ration (-20 %) (ou l'augmentation du ratio azote digéré / énergie métabolisable ingérée) a un impact sur le gain moyen quotidien (-28 et -32 % respectivement dans les deux études, $P < 0,05$; ***Expérimentation 1*** et ***Expérimentation 2***) et sur l'efficacité de production (Figure 44). Avec ce régime déficitaire en énergie, l'azote produit par le foie ainsi que l'azote urinaire (en fonction de l'azote digéré) sont fortement augmentés, sans que le recyclage ne soit modifié, ce qui suggère que cette baisse de rétention azotée dans le régime E est associée à un catabolisme azoté important (urée excrétée dans l'urine augmentée : + 30 %, T *vs* E, P = 0,01) (Tableau 11) (***Publication 1***). A l'inverse des PDI, les recommandations INRA en terme d'apport d'énergie métabolisable sont adaptées aux besoins des animaux dans notre cas.

Nous avons déjà vu dans l'introduction du travail que les modifications d'apports azotés et énergétiques dans la ration avaient des répercutions différentes sur la rétention azotée (Balch, 1967). En plaçant sur le schéma de Balch nos différents régimes, deux raisons peuvent expliquer la baisse de rétention d'azote dans le régime N de la seconde expérimentation (N_2) : 1) la baisse d'apport en azote est plus forte dans cette seconde expérimentation, 2) notre régime témoin (T) est plus proche des besoins des animaux et la baisse a une répercution directe sur la rétention azotée (Figure 44).

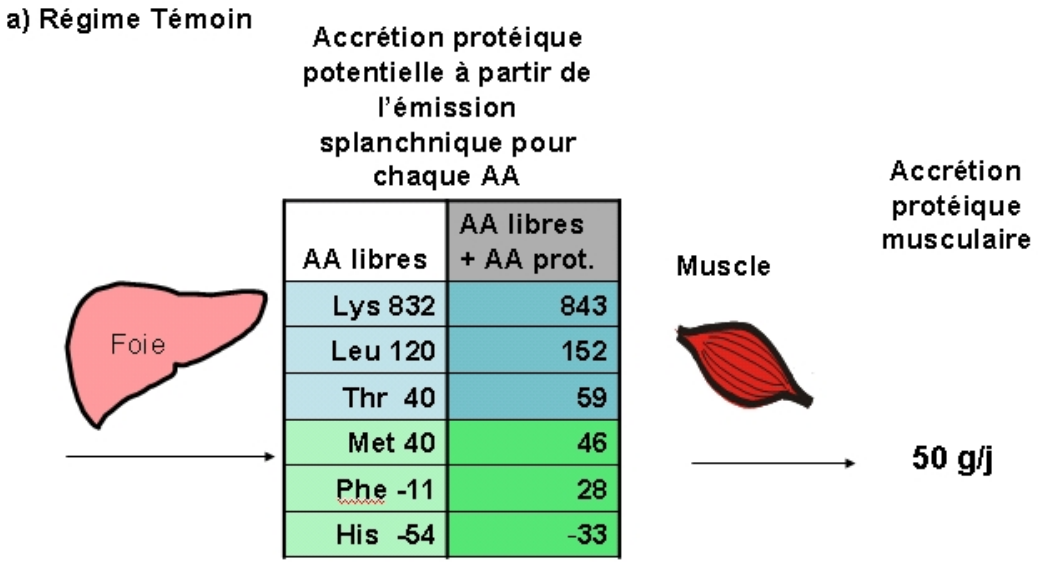
1.2. Emission nette des AA particuliers par l'aire splanchnique

L'impact des régimes sur la rétention azotée totale de l'animal peut cacher des différences dans la répartition de l'utilisation de l'azote au sein des tissus et organes. L'étude de la répartition dans l'utilisation nette des nutriments entre l'aire splanchnique et les tissus périphériques dans le cas des régimes T, N et E peut apporter des informations sur l'importance relative de l'aire splanchnique dans l'utilisation nette des AA (***Expérimentation 1***).

Nous avons donc réalisé le calcul de l'accrétion protéique potentielle à partir de l'émission nette splanchnique pour chaque AA et avons confronté ces données à l'accrétion

protéique réelle calculée à partir de nos bilans azotés. Les calculs sont explicités en Figure 45. Nous faisons l'hypothèse que la part des tissus splanchniques dans la rétention azotée est négligeable (MacRae et coll., 1993) et nous sommes conscients que l'ensemble des AA ne sera pas utilisé uniquement pour de l'accrétion protéique musculaire. L'émission nette splanchnique en AACR et lysine est largement supérieure à la quantité en ces AA utilisée pour la croissance quel que soit le régime (Figure 45 a, b et c). Ceci est en accord avec une autre étude sur vache laitière (Lobley & Lapierre, 2003) qui a réalisé des calculs similaires. Les AACR et la lysine en excès sont donc utilisés (essentiellement oxydés) ailleurs que dans l'aire splanchnique (Goodwin et coll. 1987, Pink et coll., 2003) afin d'éliminer les AA en excès.

Figure 45 Accrétion protéique potentielle calculée à partir de l'émission nette splanchnique pour la lysine, leucine, thréonine, méthionine, histidine et phénylalanine. Comparaison avec l'accrétion protéique musculaire mesurée à partir des bilans azotés corporels.
Détail du calcul : Pour chacun des 6 AA libres plasmatiques étudiés, les valeur d'émission nette splanchnique sont exprimée en g/h, puis en tenant compte de la composition en AA de la carcasse, cette émission nette pour chaque AA est transformée en quantité de protéines de carcasse théoriquement synthétisée à partir de chaque AA. Un calcul similaire est réalisé en ajoutant à chaque AA libre, les AA présents dans les protéines plasmatiques dont la vitesse de synthèse absolue est connue (Publication n°2). Ces valeurs d'accrétion protéique théorique sont confrontées pour chaque AA à la valeur d'accrétion protéique déterminée par les bilans azotés corporels.



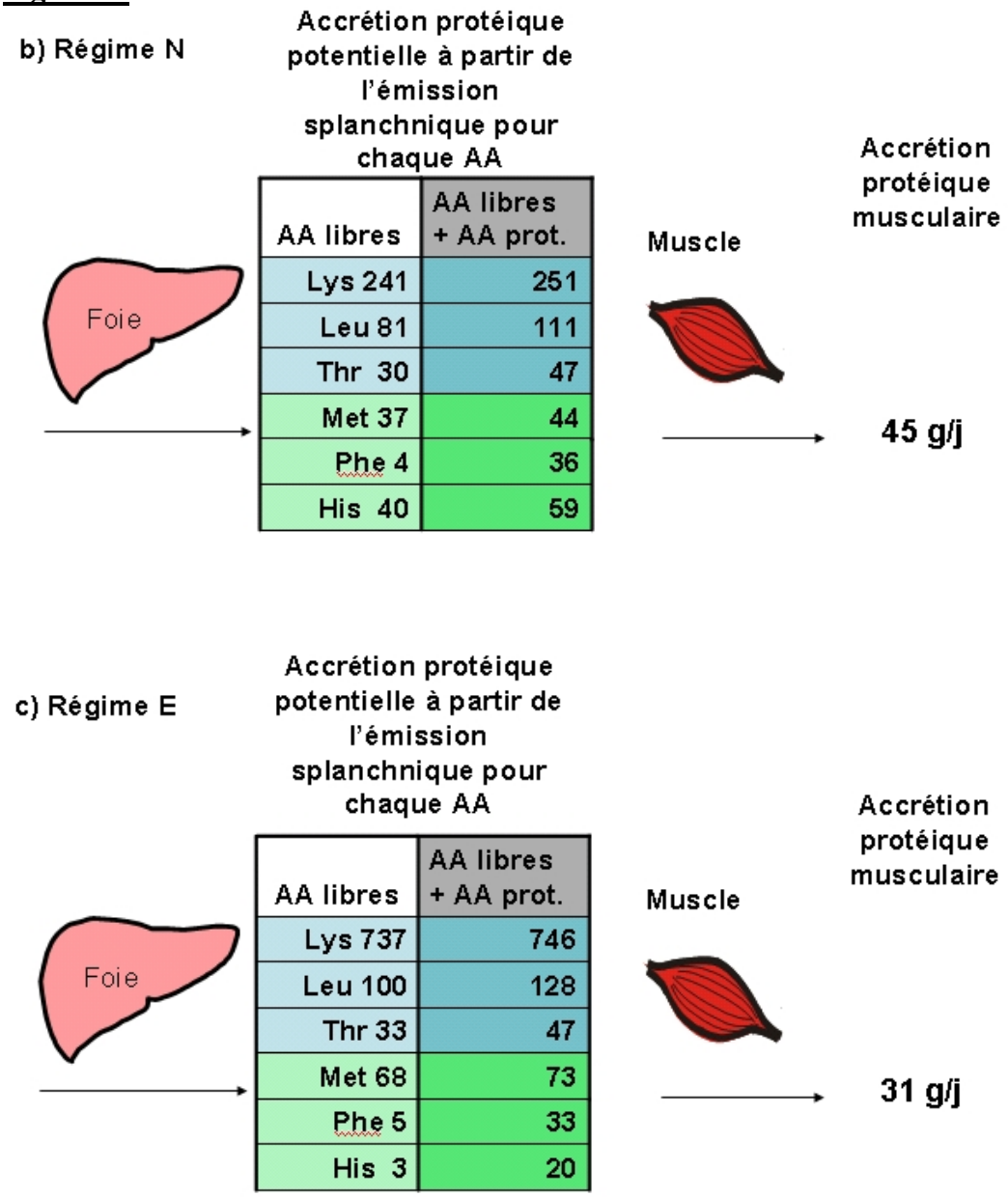
AA libres	AA libres + AA prot.
Lys 832	843
Leu 120	152
Thr 40	59
Met 40	46
Phe -11	28
His -54	-33

Données Kraft et coll., 2008 pour le régime Témoin (a), déséquilibré en azote (b) et deséquilibré en énergie (c)

Au contraire, l'émission nette splanchnique en thréonine, méthionine et surtout phénylalanine et histidine libres semble insuffisante pour assurer le dépôt protéique théorique. L'étude précédemment citée sur vaches laitières (Lobley & Lapierre, 2003) n'a pas montré ce décallage. Dans notre étude, ce décallage peut être lié au fait que l'accrétion protéique et

l'utilisation des AA pour la croissance sont estimés (à la fois par la mesure des bilans azotés et par la composition en AA des muscles ; MacRae et coll., 1993 ; voir ***Bibliographie partie 1.1.*** pour les limites de la méthodologie des bilans nets d'azote corporels) alors que l'étude de Lobley & Lapierre (2003) mesurait directement la composition en AA des protéines. Une autre hypothèse serait qu'une autre source d'AA (complémentaire des AA libres) est nécessaire pour assurer la croissance musculaire chez nos agneaux en croissance, alors que cette source alternative ne serait pas utilisée chez les vaches laitières. Maxwell et coll. (1990) ont montré que les muscles étaient capables d'utiliser les AA issus de l'albumine et de Feo et coll. (1992) suggèrent que les protéines plasmatiques (essentiellement synthétisées au niveau hépatique) pourraient représenter un apport en AA aux muscles alternatif et complémentaire des AA libres. Nous avons donc complété nos calculs en ajoutant aux AA libres l'apport théorique en AA issu des protéines plasmatiques (Figure 45 a, b et c). Ce calcul a été possible grâce à la mesure de la vitesse de synthèse absolue des protéines plasmatiques totales détaillée dans la ***Publication n°2*** et la composition en AA des protéines plasmatiques (Ruot, 2001). L'émission splanchnique en AA (libres et issus des protéines plasmatiques) est présentée en Figure 45 a, b et c. Ainsi, en ajoutant les AA provenant des protéines plasmatiques, l'émission nette splanchnique en méthionine, thréonine et phénylalanine est suffisante ou proche de ce qui est nécessaire pour assurer le dépôt protéique mesuré par bilan azoté corporel. L'albumine, très riche en phénylalanine (2 fois plus de phénylalanine / g de protéines dans l'albumine que dans le muscle) pourrait donc être une source alternative potentielle importante de phénylalanine pour le muscle. Seule l'émission nette en histidine reste inférieure aux besoins en histidine pour le dépôt protéique. Cependant, les stocks importants de carnosine (dipeptide contenant de l'histidine) et la présence d'une carnosinase dans le muscle permettent de fournir l'histidine nécessaire aux besoins de croissance (Heger et coll., 2007; Savary-Auzeloux et coll., 2008).

Figure 45 Suite…



AA libres	AA libres + AA prot.
Lys 241	251
Leu 81	111
Thr 30	47
Met 37	44
Phe 4	36
His 40	59

AA libres	AA libres + AA prot.
Lys 737	746
Leu 100	128
Thr 33	47
Met 68	73
Phe 5	33
His 3	20

Données Kraft et coll., 2008 pour le régime Témoin (a), déséquilibré en azote (b) et deséquilibré en énergie (c)

Concernant l'impact des régimes N et E (Figure 45 b et c), il est important de noter que dans le cas du régime N, l'émission nette en AACR et lysine, bien que toujours en excès par rapport aux besoins pour le dépôt protéique, reste inférieure à l'émission nette dans les régimes T et E. Le catabolisme de ces AA dans les muscles doit être probablement réduit. A l'inverse, l'émission nette en AA dans le cas du régime E est élevée comparativement aux régimes N et T. Or, la rétention azotée est inférieure dans le régime E, ce qui suggère que l'apport d'AA n'est pas suffisant pour stimuler l'anabolisme protéique et que la baisse

d'apport énergétique (associée à la baisse d'hormones comme l'insuline) pourrait engendrer une augmentation du catabolisme des AA dans les tissus périphériques.

2. Devenir des AA dans les tissus splanchniques et en particulier dans le foie.

Les régimes T, N et E ont donc des répercussions variées sur l'anabolisme protéique et sur l'utilisation nette des AA dans les tissus splanchniques et périphériques. La question suivante est de savoir quelles voies métaboliques sont modulées pour expliquer les variations d'utilisation nette des AA. Pour cela, l'analyse détaillée de l'utilisation nette d'AA spécifiques au niveau splanchnique associée à la mesure de l'activité des voies métaboliques doit permettre d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes adaptatifs mis en jeu par les agneaux suite à l'ingestion des trois régimes expérimentaux, notamment grâce à la perfusion d'AA marqués. Nous pouvons déjà observer que, malgré des impacts divers des différents régimes sur la rétention azotée des animaux constatés précédemment, les flux de phénylalanine [$^{2}H_5$] et en leucine [1-^{13}C] sont diminués en moyenne de 10 à 15 % dans les régimes N et E ($P < 0,05$) relativement au régime T. Une répartition différente des AA vers des voies anaboliques ou cataboliques entre les régimes N et E au sein de l'organisme doit donc expliquer la baisse similaire des flux d'AA marqués dans les régimes N et E.

2.1. Absorption nette d'AA par les TDVP et prélèvement net d'AA par le foie

2.1.1. L'absorption nette portale d'AA est-elle fonction de l'apport d'azote dans la ration ?

Quantitativement, l'apparition nette portale en AA totaux est diminuée (-40 %, P = 0,005) pour le régime N relativement au régime T, et n'est pas modifiée significativement avec le régime E (P = 0,23) (***Publication 1).*** Seule l'apparition nette portale en AACR est diminuée significativement de 21 % (P = 0,01) dans le régime E *vs* T. Le profil en AA particuliers apparaissant en veine porte est peu altéré entre les trois régimes.

Comme cela a déjà été suggéré par Reynolds (2006) et montré dans diverse études sur bouvillons (Lapierre et coll., 2000), vaches laitières (Blouin et coll., 2002; Raggio et coll., 2004) ou moutons (El-Kadi et coll., 2006), l'apparition nette portale en AA semble répondre à l'apport d'azote dans le régime selon une loi dose-réponse. Une méta-analyse de Lapierre et coll. (2007) compilant 17 publications confirme ces données puisqu'ils ont montré que, indépendamment de l'apport énergétique dans la ration, l'augmentation de l'apparition nette portale en AA était liée à l'augmentation de l'azote ingéré. Une méta-analyse plus récente

effectuée dans notre laboratoire (Loncke et coll., 2008), avec un plus grand nombre de publication (n = 35), a montré que l'apparition nette portale d'azote α-aminé était légèrement mieux prédite par l'utilisation des PDIE ingérés comparés aux PDIN ingérés. Cette étude montre la cohérence du système PDI utilisé par l'INRA dans le cas de modifications modérées du ratio entre PDIE et PDIN.

2.1.2. Le prélèvement net hépatique d'AA est-il fonction de l'apparition nette portale d'AA ?

Le prélèvement net en AAT, AAI et AANI est diminué significativement dans le régime N (Tableau 12). Seule une tendance à la diminution du prélèvement net hépatique des AAI (mais pas des AANI ni des AAT) est constatée dans le régime E (Tableau 12). Il semblerait donc que le prélèvement net hépatique d'AA soit affecté de manière globale dans le régime N alors que les AAI sont plus spécifiquement affectés dans le cas du régime E. Le prélèvement net hépatique d'AA exprimé en fonction de l'apparition nette portale reste constant pour les régimes T, N et E (67-69 % pour les AAT, 90-100 % pour les AANI, 38-46 % pour les AAI et 10 à 21 % pour les BCAA, Tableau 12).

Ces données sont cohérentes avec les données du Tableau 7 et de Reynolds (2006) qui montrent que dans des conditions nutritionnelles non extrêmes (conditions extrêmes : ingéré inférieur aux besoins d'entretien par exemple), le taux d'extraction hépatique d'AA, c'est à dire le prélèvement net hépatique d'AA exprimé en proportion de l'absorption nette portale, restait stable. Autrement dit, le prélèvement net hépatique en AA répond à l'émission nette d'AA par les TDVP. Cependant, ce taux d'extraction peut être modifié lorsque la demande en AA par les tissus périphériques (très forte croissance, lactation, perfusion d'hormone de croissance) est augmentée (Tableau 7). Dans le cas de notre étude, la croissance des agneaux n'est probablement pas suffisante pour induire une modification substantielle du taux d'extraction hépatique d'AA.

Lorsque le prélèvement net hépatique en AA totaux est exprimé en fonction de l'influx total (débit x concentration en AA en veine porte et en artère hépatique), on remarque que le prélèvement est diminué dans le cas du régime N (Tableau 12). Cette baisse de prélèvement relative à l'influx est liée à une baisse de prélèvement des AANI (Tableau 12). Ainsi, ce mode d'expression des données montre que dans le cas du régime N, des mécanismes d'épargne des AA (et en particulier des AANI) se mettent en place dans le foie. Le fait que le prélèvement des AACR soit peu sensible aux modulations du régime était prévisible car le prélèvement hépatique des AACR (et de la lysine) est faible (Lapierre et coll., 2000; Savary-Auzeloux et coll., 2003a), ce qui suggère un besoin faible mais fixe en AACR dans le foie (2 à 3 % de l'influx total) pour maintenir la synthèse protéique.

Tableau 12 Prélèvement net d'acides aminés (AA) par le foie exprimé en fonction de l'apparition nette portale ou de l'influx d'AA [veine porte + artère hépatique] x débit plasmatique, pour les AA totaux (AAT), AA non indispensables (AANI), AA indispensables (AAI) et AA à chaînes ramifiées (AACR)) ainsi que certains AAI individuels, chez des agneaux nourris avec trois régimes expérimentaux (témoin (T), déséquilibré en azote (N) et déséquilibré en Energie (E)).

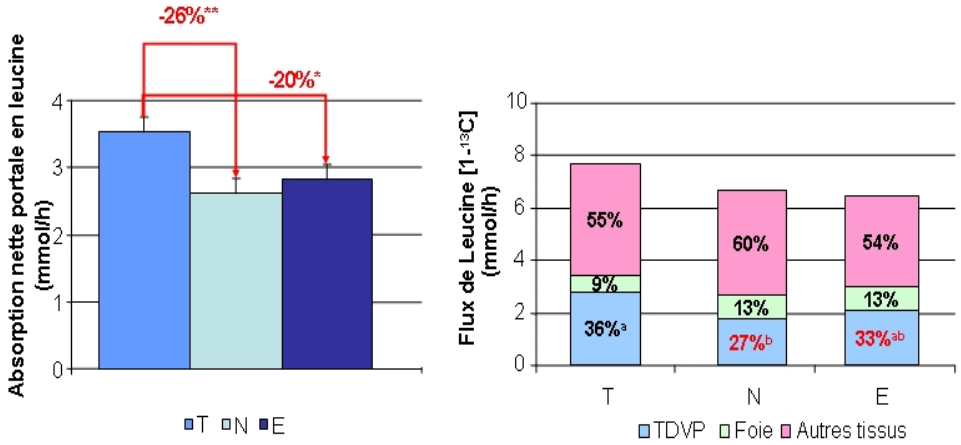
		Prélèvement net hépatique (g d'azote /j ou en mmol/h)					En fonction de l'apparition nette portale (%)					En fonction de l'influx total (%)				
		T	N	E	*SEM*	*P.*	T	N	E	*SEM*	*P.*	T	N	E	*SEM*	*P.*
	AAT	9,0[a]	5,5[b]	8,1[a]	*0,55*	*0,005*	66,8	67,9	69,0	*6,2*	*0,97*	8,0[a]	5,5[b]	8,3[a]	0,4	0,004
	AANI	5,42[a]	2,95[b]	5,13[a]	*0,44*	*0,01*	89,1	97,0	>100	*7,5*	*0,52*	9,3[a]	5,6[b]	10,2[a]	0,7	0,005
	AAI	3,63[a]	2,54[b]	2,92[ab]	*0,27*	*0,05*	46,2	46,6	38,8	*5,2*	*0,53*	6,4	5,5	5,7	0,4	0,25
	AACR	0,45	0,43	0,28	*0,10*	*0,44*	18,2	21,4	10,6	*4,2*	*0,24*	2,8	3,1	1,8	0,6	0,38
AA individuels	Histidine	1,47[a]	1,12[b]	1,45[b]	*0,12*	*0,12*	>100[a]	67,8[b]	98,5[ab]	*12,5*	*0,06*	12,3	10,3	14,1	1,2	0,16
	Isoleucine	0,25	0,24	0,23	*0,09*	*0,98*	13,5	8,3	9,9	*4,9*	*0,84*	2,3	2,4	2,3	1,0	1,00
	Leucine	0,68	0,68	0,43	*0,12*	*0,34*	20,4	21,3	11,7	*3,7*	*0,16*	3,1	3,6	1,8	0,6	0,17
	Méthionine	0,50[a]	0,37[b]	0,29[b]	*0,05*	*0,04*	71,2[a]	57,2[b]	44,5[b]	*4,1*	*0,01*	11,1	10,0	8,1	1,0	0,22
	Phénylalanine	2,02[a]	1,52[b]	1,62[b]	*0,11*	*0,03*	>100	93,0	98,2	*4,0*	*0,19*	19,1[a]	15,8[b]	18,7[a]	0,7	0,03
	Thréonine	1,07	0,45	0,70	*0,26*	*0,29*	54,2	30,1	54,5	*13,1*	*0,70*	5,9	3,0	4,7	1,4	0,36
	Valine	0,41	0,35	0,17	*0,11*	*0,33*	19,4	15,9	8,8	*5,5*	*0,45*	2,1	2,2	1,2	0,7	0,53

2.2. Voies métaboliques expliquant les prélèvements d'AA par les tissus drainés par la veine porte et par le foie

2.2.1. Tissus drainés par la veine porte

Les données de bilans nets au niveau des TDVP en AA sont très cohérentes avec celles obtenues avec les flux de leucine [1-^{13}C]. En effet, le flux de leucine [1-^{13}C] au niveau des TDVP est diminué significativement dans les régimes N et E (-36 % et -23 % respectivement, P = 0,04) en parallèle de la baisse de l'émission nette en AA par les TDVP. Cependant, lorsqu'il est exprimé en pourcentage du flux de leucine [1-^{13}C] corporel, le flux de leucine [1-^{13}C] dans les TDVP est significativement plus faible pour le régime N (27 %) que celui du régime T (33 %, Figure 46). Ainsi, la leucine, dans le régime N, est spécifiquement « épargnée » par les TDVP. Ce résultat est cohérent avec des données sur porcelet de van der Schoor et coll. (2001) qui ont montré que suite à une restriction protéique (-40 %, *vs* régime témoin isocalorique), l'utilisation du glutamate alimentaire pour la production de CO_2 était diminuée et compensée (partiellement) par une augmentation de l'oxydation du glucose. La leucine étant oxydée par le tube digestif du ruminant (Lobley et coll., 2003), il se pourrait donc que les agneaux nourris avec le régime N aient relativement moins utilisé la leucine au même titre que le glutamate chez les porcelets. Le fait que le flux de phénylalanine [$^{2}H_5$] n'ait pas été modifié dans le cas du régime N n'est pas surprenant puisque, à la différence du porcelet (Bush et coll., 2003), la phénylalanine ne semble pas oxydée dans les TDVP des ruminants (Lobley et coll., 2003; El-Kadi et coll., 2006).

Figure 46 Bilans nets en leucine (mmol/h) au niveau des tissus drainés par la veine porte (TDVP), et flux de Leucine [1-^{13}C] (mmol/h) dans divers compartiments tissulaires (TDVP, Foie et autres tissus).
Dans le graphique de droite, les pourcentages représentent la contribution des différents compartiments au flux corps entier de Leucine [1-^{13}C].

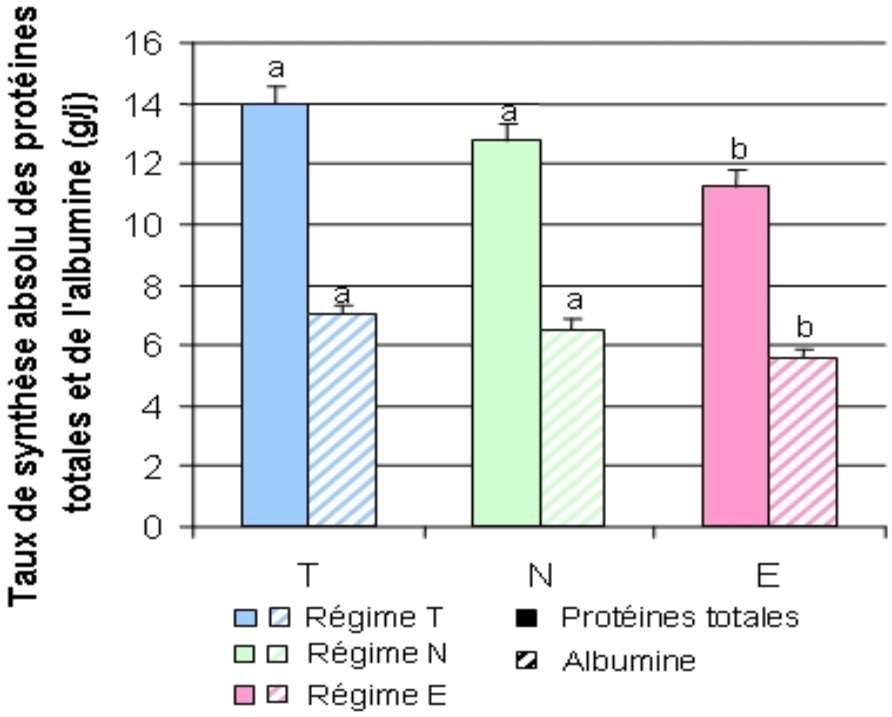


2.2.2. Foie

L'analyse des prélèvements nets hépatiques en AA particuliers (***Publication 1***), enrichie des données obtenues par perfusion de leucine [1-^{13}C] et phénylalanine [$^{2}H_5$] (***Publication 2***) permet de mieux comprendre quelles voies métaboliques sont modulées par les régimes expérimentaux.

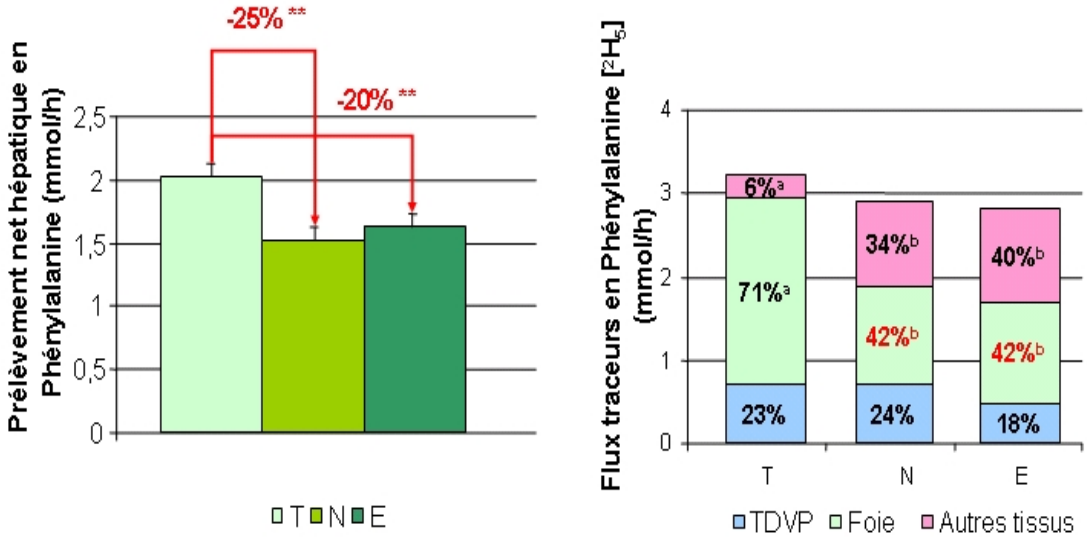
Concernant le régime E, une tendance à la baisse du prélèvement hépatique des AAI est expliquée par une baisse significative du prélèvement en méthionine (-42 %, P=0,01) et phénylalanine (-20 %, P=0,03). Or ces deux AA sont très représentés dans les protéines exportées par le foie (Ruot et coll., 2001), suggérant une diminution de la synthèse des protéines exportées par le foie dans le régime E. Ceci a été confirmé par mesure directe de la vitesse fractionnaire de synthèse des protéines totales et de l'albumine exportées qui est diminuée (-11 % et –13,7 %, respectivement, P<0,05) dans le cas du régime E relativement à T (Figure 47). Cette baisse de l'utilisation des AA pour la synthèse protéique hépatique permet d'expliquer, au moins en partie, la baisse de prélèvement des AA par le foie. Nous ne pouvons pas formuler d'hypothèse sur les autres voies d'utilisation des AA pour les animaux nourris avec le régime E. Cependant le maintien de l'uréogenèse tend à montrer que l'utilisation des AA dans cette voie n'est pas ou peu modifiée.

Figure 47 Synthèse des protéines plasmatiques et de l'albumine par la methode d'infusion de leucine [1-^{13}C] chez des agneaux cathétérisés nourris avec un régime témoin (T), un régime déficitaire en azote (N) ou un régime déficitaire en énergie (E)



Inversement, dans le cas du régime N la baisse 1) du prélèvement hépatique de phénylalanine (et de nombreux autres AA) 2) du flux hépatique de phénylalanine [$^2H_5$] et 3) de la contribution du foie au flux corporel de phénylalanine [$^2H_5$] (Figure 48) n'est pas liée à une baisse de la synthèse protéique (Figure 47) mais à la réduction de l'activité d'autres voies métaboliques d'utilisation des AA, et en particulier de l'oxydation. Cette diminution de l'oxydation des AA dans le foie des agneaux alimentés avec le régime N est confirmée par la diminution de la production nette d'urée par le foie (-37 %, P<0,001) et d'urée dans l'urine (Tableau 11). La diminution du prélèvement net en AANI (-43 %, P = 0,004, T vs N et concerne Ala, Ser, Asn, Gln et Tyr) pourrait également participer à la diminution d'uréogenèse. Cependant, pour cause de difficultés techniques survenues lors du dosage de l'ammoniaque sanguin, l'émission nette d'ammoniaque par les TDVP et son captage par le foie n'ont pu être déterminés, ce qui aurait pu confirmer ou non cette hypothèse. En effet, en l'absence des données sur l'ammoniaque, il nous est impossible de dire formellement que la baisse de production d'urée n'est pas uniquement due à une diminution de l'émission nette portale d'ammoniaque mais aussi à une diminution du catabolisme des AA. Cependant, en l'absence de baisse de synthèse protéique, il est difficile d'envisager que la diminution de l'activité d'autres voies métaboliques que l'oxydation puisse induire une diminution du flux hépatique de phenylalanine [$^2H_5$] de – 48 % (T vs N, P=0,008) et de la contribution du foie au flux corporel de phénylalanine [$^2H_5$] de 71 à 42 % entre les régimes T et N (P<0.05) (Figure 48).

Figure 48 Bilans nets hépatiques en phénylalanine (mmol/h), et flux de phénylalanine [$^2H_5$] (mmol/h) dans divers compartiments tissulaires (Tissus drainés par le veine porte (TDVP), Foie et autres tissus).
Dans le graphique de droite, les pourcentages représentent la contribution des différents compartiments au flux corps entier de phénylalanine [$^2H_5$].



Enfin, l'alanine et dans une moindre mesure la serine présentent une diminution (-31 % et –29 %, pour N *vs* T respectivement, P=0,001) de leur prélèvement net hépatique avec le régime N. La baisse de prélèvement en ces deux AA, impliqués dans la néoglucogenèse chez le Ruminant (Demigné et coll., 1991; Majdoub, 2002), suggère une diminution de la néoglucogenèse à partir de ces AA dans le foie.

3. Quels mécanismes peuvent réguler les voies métaboliques d'utilisation des AA par le foie

Les données des ***Publications 1 et 2*** soulèvent un certain nombre de questions concernant les mécanismes d'activation / inhibition des voies métaboliques hépatiques d'utilisation des AA. En effet, le déficit en nutriments énergétiques inhibe la synthèse des protéines exportées par le foie *in vivo* même si l'apport portal d'AA n'est que peu diminué relativement au régime T. D'un autre côté, cette synthèse est maintenue dans le régime N où, à l'inverse, l'apparition portale en AA est fortement diminuée. L'apport en AA au foie ne permet donc pas d'expliquer les modifications de synthèse protéique dans le foie.

Les apports en nutriments et en hormones au foie ainsi que des adaptations métaboliques du foie aux régimes (modulation de la sensibilité ou de la réponse du tissu aux stimuli exogènes, activités d'enzymes régulées à long terme) sont deux types de mécanismes de régulations potentiels. Pour tenter d'aller plus loin dans la compréhension de ces mécanismes de régulation, nous avons mis en place une étude *ex vivo* dans laquelle les concentrations physiologiques en nutriments dans les milieux de culture d'explants de foie sont fixées. Ainsi, à la différence des études *in vivo*, les apports en nutriments et en hormones sont similaires pour tous les régimes. Seules les adaptations métaboliques du foie (persistantes après quelques heures d'incubation) sont ainsi mises en évidence.

3.1. Quels mécanismes de régulations sont mis en jeu pour expliquer la baisse de synthèse protéique hépatique dans le régime E ?

Les résultats *in vivo* montrent que la baisse de synthèse des protéines exportées est modifiée en parallèle d'une baisse de concentration en insuline dans la veine porte et d'une baisse d'émission nette en nutriments énergétiques (AGV) par les TDVP (Tableau 13). Des résultats récents de Freyse et coll. (2006) sur chiens ont montré que la perfusion d'insuline par voie portale stimulait plus la synthèse des protéines exportées par le foie alors qu'une perfusion systémique d'insuline n'avait pas d'effet sur cette voie métabolique. Ces données sont en accord avec les résultats de Lapierre et coll. (2000) qui ont montré chez le Ruminant, une meilleure corrélation entre le prélèvement net hépatique en AA et les niveaux d'insuline et de glucagon en veine porte comparativement aux niveaux des mêmes hormones en artère.

La baisse des concentrations en insuline en veine porte chez les agneaux nourris avec le régime E (Tableau 13) pourrait donc être un des déterminants majeurs de la baisse de la synthèse des protéines exportées par le foie.

Tableau 13 Apparition nette portale en acides aminés totaux (AAT) et en acides gras volatils totaux (AGV) (en mmol/h), concentration en insuline en artère et en veine porte (nUI/L) et synthèse protéique (résultats obtenus lors de l'expérimentation 1, *in vivo*)

	T	N	E	SEM	Probabilité
Apparition nette portale (mmol/h)					
AAT	30,9 [a]	19,0 [b]	25,4 [a]	2,04	0,01
AGV	187,4 [a]	186,4 [a]	135,0 [b]	8,81	0,004
Concentration en insuline (nUI/L)					
en artère	66,2	62,5	49,5	5,9	0,17
en veine porte	89,5[a]	87,2[a]	67,3b	6,9	0,39
Taux de synthèse des protéines exportées (g/j)					
	14,0[a]	12,8[a]	11,2[b]	0,54	0,02

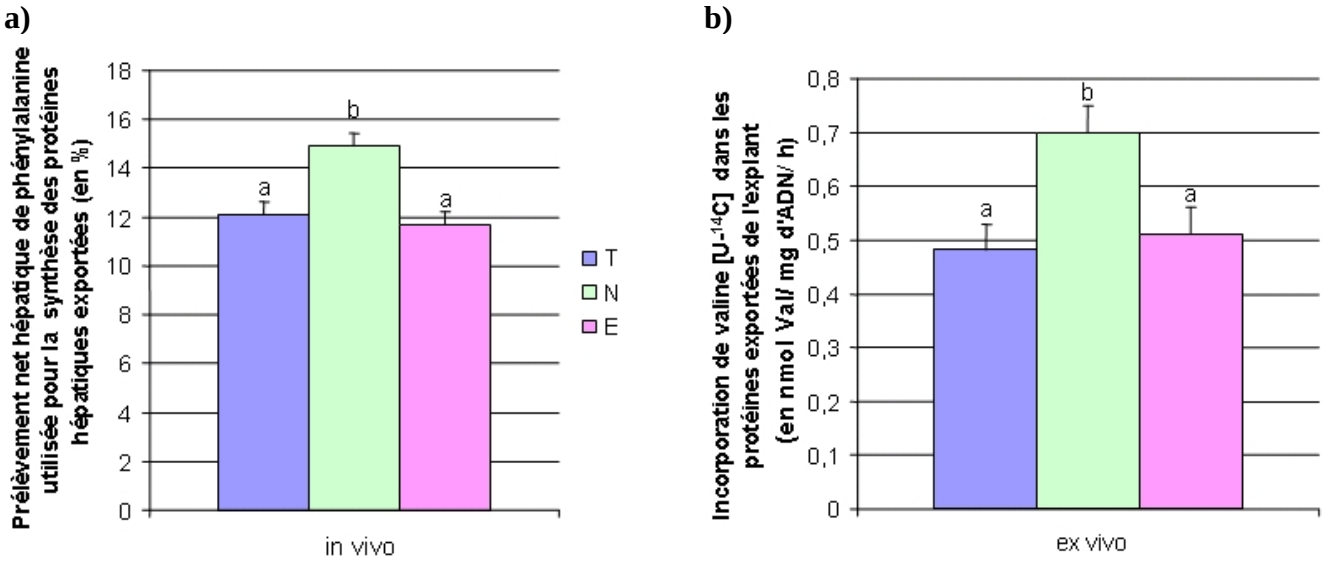
L'absence de modification de synthèse protéique dans les explants de foie issus des animaux E relativement à T est cohérente avec les résultats obtenus *in vivo* car dans le cas des hépatocytes incubés, l'insuline est absente dans les milieux d'incubation et la concentration en propionate est similaire dans les milieux utilisés pour les explants T et E.

3.2. Quels mécanismes de régulations sont mis en jeu pour expliquer le maintien de synthèse protéique hépatique dans le régime N ?

L'augmentation de synthèse des protéines exportées dans le cas des explants issus d'animaux nourris avec le régime N (Figure 49b) peut paraître surprenante en comparaison des résultats observés *in vivo*. Cependant, à partir des données de prélèvement net d'AA par le foie et des données de la synthèse des protéines exportées obtenues *in vivo* (et de leur teneur en AA (Ruot, 2001)), il est possible de calculer la part de phénylalanine prélevée qui est incorporée dans les protéines (Figure 49a). Nous avons utilisé la phénylalanine dans ce calcul car cet AA est fortement prélevé par le foie et il est très représenté dans les protéines plasmatiques. Ce pourcentage est de 12 % pour les régimes T et E et s'élève à 15 % dans le régime N (Figure 49a). Ces pourcentages sont cohérents avec les données de Connell et coll. (1997) sur moutons et Raggio et coll. (2007) sur vaches. De plus, une augmentation de ce

pourcentage est également constatée par Raggio et coll. (2007) lorsque les vaches sont nourries avec des apports diminués de protéines métabolisables dans la ration. Ainsi, dans le régime N, le foie des animaux utilise plus de phénylalanine pour la synthèse protéique (au détriment d'autres voies métaboliques). *Ex vivo* on observe une plus grande efficacité d'utilisation des AA pour la synthèse protéique où, à la différence des études *in vivo,* (dans ce cas l'apport d'AA au foie est diminué dans le régime N vs T), la concentration en AA dans le milieu d'incubation est identique pour les explants issus des animaux T et N (Figure 49b).

Figure 49 a) Proportion de phénylalanine (Phe) prélevée (sur une base nette) par le foie pour la synthèse des protéines totales exportées b) Incorporation de valine [U-^{14}C] dans les protéines exportées d'explant de voie (en nmol de Val incorporé / mg d'ADN de l'explants / h). Chez les agneaux nourris avec les régimes témoin (T), déficitaire en azote (N) et déficitaire en énergie (E).



Une dernière question reste cependant en suspens: quelles adaptations spécifiques du foie peuvent expliquer cette augmentation d'efficacité d'utilisation des AA pour la synthèse protéique ?

Nos résultats *ex vivo* montrent que l'augmentation concerne aussi bien la synthèse des protéines endogènes, exportées, que la néoglucogenèse et l'oxydation à partir de l'alanine. La modification du métabolisme hépatique est donc « ubiquitaire ». C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que l'adaptation se situait en amont des voies métaboliques avec une augmentation du transport des AA à l'intérieur des hépatocytes. Or Fehlmann et coll. (1979) ont montré, chez le rat à jeûn, une stimulation d'un transporteur d'AA (Fehlmann et coll., 1979). *In vitro*, une déplétion en AA stimule l'activité d'un des systèmes de transport des AA, le système A (Franchi-Gazzola et coll., 1999) ainsi que l'expression des ARNm de SNAT2 (qui synthétise la protéine de transport du système A) (Gaccioli et coll., 2006; Jones et coll.,

2006). Dans notre cas, une activation des systèmes de transport des AA (qui persisterait dans les explants au cours des quelques heures *post mortem*), pourrait se mettre en place chez les animaux nourris avec le régime N. *In vivo*, d'autres régulations additionnelles se mettent également probablement en place pour diriger prioritairement les AA vers la synthèse protéique (voie anabolique « protégeant » les AA de l'oxydation).

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Le travail de thèse s'était fixé trois objectifs :

- tester l'impact de régimes déséquilibrés en azote (N) ou en énergie (E) relativement à un régime témoin (T: apports équilibrés et recommandés) sur la rétention protéique corporelle, l'utilisation nette des acides aminés par l'aire splanchnique et les interactions entre l'aire splanchnique et les tissus périphériques pour l'utilisation des ces AA.

- déterminer les voies d'utilisation des AA dans le foie qui sont responsables des modifications de prélèvements nets observés.

- identifier certains mécanismes d'adaptation du foie aux régimes ainsi que des facteurs qui régulent les prélèvements nets en AA et les voies métaboliques d'utilisation des AA.

1. Quels apports adéquats en énergie et en azote pour les ruminants ?

Le premier objectif de ma thèse était de déterminer l'impact d'une ration déséquilibrée en azote ou déséquilibrée en énergie sur la croissance et la rétention d'azote d'agneaux en croissance. Nous avons montré que l'apport déséquilibré en azote, lorsqu'il n'est pas trop important, avait moins de conséquences délétères que le régime déséquilibré en énergie sur la croissance et le dépôt protéique des agneaux. Alors que des mécanismes d' « épargne » des AA semblent se mettre en place dans le régime N (dépôt protéique et croissance préservés, moindre utilisation nette des AA dans le tube digestif et surtout le foie), un anabolisme diminué et un catabolisme intense des AA surviennent dans le régime E (dépôt protéique et croissance diminués, excrétion urinaire d'azote augmentée). Ainsi, si on se place dans un contexte de limitation des rejets azotés par les Ruminants, il pourrait être envisagé de diminuer les apports azotés aux animaux relativement aux recommandation alimentaires (INRA, 1978) tout en préservant la croissance des animaux. Cependant, il est important de noter que les apports énergétiques seraient probablement à maintenir aux niveaux des recommandations.

Ces données, obtenues sur agneaux, mériteront d'être confirmées lors d'études sur **les bovins en production** (en croissance et en lactation) pour lesquels les enjeux d'un point de vue environnemental sont bien plus importants que dans le cas des ovins. Il serait en particulier essentiel de déterminer **des lois de réponses à différents niveaux d'apports en azote**, à apport énergétique non limitant.

2. Voies métaboliques d'utilisation des AA dans le foie

Nous avons montré que le **régime E induisait une diminution de la synthèse des protéines exportées par le foie**. A l'inverse, **en situation d'apports limitants en AA, le catabolisme des AA dans le foie est réduit** au profit du maintien de la synthèse des protéines exportées.

Pour confirmer ces hypothèses, il serait nécessaire de mesurer directement l'oxydation ou les prélèvements nets hépatiques en ammoniaque pour connaître la contribution des AA à l'uréogenèse. La détermination de la composante « oxydation » dans les flux d'AA traceurs mesurés au niveau des TDVP et du foie sur animaux cathétérisés est possible expérimentalement grâce à la détermination de la production de CO_2 par perfusion de bicarbonate-^{13}C (préalablement à la perfusion d'AA marqués). De plus, la mesure de l'oxydation des AA dans le foie permet de calculer la synthèse et la dégradation des protéines constitutives hépatiques (Annexe 1). Ces données d'oxydation et de protéolyse, associées à des mesures d'ammoniaque fiables permettraient d'aller plus loin dans la détermination du devenir catabolique des AA dans le foie.

3. Facteurs de régulation impliqués dans les adaptations du métabolisme hépatique aux régimes expérimentaux

Enfin le dernier objectif de la thèse était de connaître les régulations mises en jeu dans les phénomènes métaboliques décrits au niveau hépatique dans les paragraphes précédents.

Concernant l'impact d'un déficit relatif en azote de la ration, la baisse d'apparition nette portale en AA est compensée, au moins en partie, par une plus grande efficacité d'utilisation des AA mis à disposition des hépatocytes. Cette plus grande efficacité, mise en évidence *ex vivo*, se traduit par une stimulation de l'ensemble des voies métaboliques mesurées utilisant les AA (synthèse protéique, néoglucogenèse à partir de l'alanine, voire oxydation de l'alanine). Cette réponse à spectre large laisse supposer une **stimulation de l'activité d'un ou plusieurs transporteurs des AA hépatiques**. Bien que cohérente avec les données de la bibliographie (Fehlmann et coll., 1979; Fafournoux et coll., 1990; Gaccioli et coll., 2006), cette hypothèse nécessite d'être vérifiée. Experimentalement il est possible de mesurer l'activité des transporteurs *in vitro* en utilisant des analogues d'AA non métabolisés par les cellules (l'acide α-aminé isobutyrique ou la cycloleucine) dont le transport est similaire à celui de l'alanine et de la leucine. Une autre possibilité est de mesurer l'expression des gènes de certains de ces transporteurs (ex : SNAT2) dont l'expression est bien corrélée à

l'activité (Desforges et coll., 2005; Jones et coll., 2006; Fafournoux communication personnelle). Cette dernière démarche a été initiée au cours du dernier semestre de ma thèse. A partir d'échantillons de foie congelés prélevés sur les agneaux de l'Expérimentation 2, la quantification de l'expression de gènes impliqués dans le transport des AA par RT-PCR quantitative est en cours. Mon travail a consisté à choisir les « primers » des gènes étudiés (dont SNAT 2) chez l'ovin (ou à défaut chez le bovin), d'extraire les ARN des foies des agneaux et de mettre au point la PCR quantitative. Les résultats seront disponibles courant 2009.

Concernant l'impact d'une baisse relative des apports énergétiques, les facteurs de régulation mis en jeu sont différents. Sur la base de nos résultats, nous faisons l'hypothèse que les **nutriments énergétiques** en association (ou non) avec des modifications de **concentration en insuline portale** sont impliqués. Pour mettre en évidence le rôle potentiel de l'insuline (ou d'autres facteurs nutritionnels) sur le métabolisme hépatique, deux possibilités peuvent être envisagées. La détermination de la réponse et sensibilité à l'insuline ou aux AGV est réalisable sur des explants de foie issus d'animaux nourris avec des régimes T, N et E. *In vivo*, la technique des clamps insuliniques pourrait également être utilisée mais elle est plus délicate et lourde à mettre en place que les études *ex vivo*. Des résultats récents de Freyse et coll. (2006) montrent que le site d'infusion d'insuline (infusion portale ou systémique) induisait des effets variables sur la synthèse des protéines hépatiques (constitutives et exportées) sans impact sur le métabolisme du glucose chez le chien. L'existence d'un tel mécanisme mériterait d'être confirmée chez le Ruminant.

Les nutriments énergétiques peuvent également entrer en jeu dans les régulations métaboliques. Une autre piste de recherche plus prospective serait de déterminer si la nature des **sources d'énergie** peut avoir également un impact sur les voies métaboliques d'utilisation des AA et sur la croissance. Ce point a été très peu étudié jusqu'ici (Reynolds et coll., 2001).

4. Autres concepts et perspectives soulevés par ce travail

En suite de mes travaux de thèse, et afin de valider ou non certaines hypothèses soulevées dans les points 1, 2 et 3, un **programme Européen** (REDNEX : Innovative and practical management approaches to reduce nitrogen excretion in ruminants) a été récemment accepté pour la période 2009-2011. Il a pour but de proposer des pratiques d'élevage et d'alimentation des ruminants limitant l'excrétion d'azote dans l'environnement et plus précisément de tester la réponse des tissus splanchniques en terme d'utilisation nette et métabolique des AA à des apports variés en azote dans la ration (au dessus et au dessous des recommandations) ainsi qu'à la nature des composés énergétiques de la ration (régimes riches

en fibres ou en amidon) chez des Ruminants en production (vache laitière). L'utilisation nette des nutriments au niveau splanchnique ainsi que l'implication des AA dans certaines voies métaboliques au niveau des TDVP, du foie et de la mamelle seront mesurées sur ces animaux, en parallèle d'études sur la digestion et l'absorption des rations offertes aux animaux. En plus des mesures déjà réalisées sur nos agneaux, il paraît indispensable de pouvoir mesurer les bilans nets splanchniques en ammoniaque ainsi que l'oxydation de différents AA traceurs (le choix de la leucine et de la phénylalanine n'est pas remis en cause).

Un autre résultat intéressant de ce travail de thèse est la **part potentielle des protéines plasmatiques en terme d'apport d'AA aux muscles**. L'hypothèse que les muscles des Ruminants (ou d'autres espèces) puissent utiliser les protéines plasmatiques comme apport complémentaire d'acides aminés a été soulevée à de nombreuses reprises (De Feo et coll., 1992; Lapierre et coll., 2002). Cependant, tester cette hypothèse expérimentalement est complexe car il serait nécessaire d'utiliser de l'albumine marquée. Or, la disparition de l'albumine du compartiment plasmatique et son accumulation dans les tissus ne présage pas de son utilisation car l'albumine est présente en grandes quantités dans l'espace extra-vasculaire (Ruot, 2001). L'étude, par les traceurs, du devenir de l'albumine dans le muscle présente des difficultés méthodologiques importantes, ce qui explique pourquoi l'utilisation de l'albumine comme apport complémentaire d'AA au muscle *in vivo* a été très peu étudiée jusqu'ici (Maxwell et coll., 1990).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Adegoke O. A .J., McBurney M. I., Samuels S. E. & Baracos V. E. 1999. Luminal amino acids acutely decrease intestinal mucosal protein synthesis and protease mRNA in piglets. J. Nutr. 129:1871-1878.

Adegoke O. A. J., McBurney M. I., Samuels S. E. & Baracos V. E. 2003. Modulation of intestinal protein synthesis and protease mRNA by luminal and systemic nutrients. Am. J. Phys. 284:G1017-G1026.

Ahlman B., Charlton M., Fu A., Berg C., O'Brien P. & Nair K. S. 2001. Insulin's effect on synthesis rates of liver proteins. A swine model comparing various precursors of protein synthesis. Diabetes 50:947-954.

Ali A. M., Rossouw H. C., Silove M., & Van der Walt J. G. 2000. Development of an improved technique for the perfusion of the isolated caudal love of sheep liver. Exp. Physiol. 85:469-478.

Alio A., Theurer C. B., Lozano O., Huber J. T., Swingle R. S., Delgado-Elorduy A., Duneo P., de Young D. & Webb K. E. 2000. Splanchnic nitrogen metabolism by growing beef steers fed diets containing sorghum grain flaked at different densities. J. Anim. Sci. 78:1355-1363.

Anthony J. C., Anthony T. G., Kimball S. R. & Jefferson L. S. 2001a. Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. J. Nutr. 131:856S-860S.

Anthony J. C., Lang C. H., Crozier S. J., Anthony T. G., MacLean D. A., Kimball S. R. & Jefferson L. S. 2002. Contribution of insulin to the translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. Am. J. Physiol. 282:E1092-E1101.

Anthony T. G., Anthony J. C., Yoshizawa F., Kimball S. R. & Jefferson L. S. 2001b. Oral administration of leucine stimulates ribosomal protein mRNA translation but not global rates of protein synthesis in the liver of rats. J. Nutr. 131:1171-1176.

Atkinson R. L., Toone C. D. & Ludden P. A. 2007. Effects of supplemental ruminally degradable protein versus increasing amounts of supplemental ruminally undegradable protein on site and extent of digestion and ruminal characteristics in lambs fed low-quality forage. J. Anim. Sci. 85: 3322-30.

Attaix D. & Arnal M. 1987. Protein synthesis and growth in the gastrointestinal tract of the young preruminant lamb. Brit. J. Nutr. 58 :159-169.

Attaix D., Aurousseau E., Manghebati A., & Arnal M. 1988. Contribution of liver, skin and skeletal muscle to whole-body protein synthesis in the young lamb. Br. J. Nutr. 60:77-84.

Attaix D. 1988. Influence de l'âge et du sevrage sur la synthèse protéique chez l'agneau. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Blaise Pascal, Clermont II, France

Attaix D., Aurousseau E., Rosolowska-Huszcz D. & Arnal M. 1992. In vivo longitudinal variations in protein synthesis in developping ovine intestines. Am. J. Physiol. 263:R1318-R1323.

Attaix D. & Taillandier D. 1998. The critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle wasting in comparison to lysosomal and Ca2+-dependant systems. In Intracellular protein degradation. pp 235-266. [Bittar E.E. & Rivett A.J. eds.] JAI Press Inc. Greenwich, CT.

Attaix D., Combaret L. & Taillandier D. 1999. Mechanisms and regulation in protein degradation. In VIIIth International symposium on Protein Metabolism and Nutrition. pp 51-67 [Lobley G.E., White A. & Macrae J.C. eds.]. Wageningen Publisher, Wageningen, Pays-Bas.

Attaix, D., Rémond, D., Savary-Auzeloux, I. C. 2005. Protein metabolism and turnover. In Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition pp 373-397.

[J. Dijkstra, J.M. Forbes and J. France eds.] CABI Publishing. Cambridge, Royaume-Uni.

Bach A., Calsamiglia S., & Stern M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy. Sci. 88 : E9-E21.

Backwell F. R. C., Hipolito-Reis M., Wilson D., Bruce L. A., Buchan V., & MacRae J. C. 1997. Quantification of circulation peptides and assessment of peptide uptake across the gastrointestinal tract of sheep. J. Anim. Sci. 75:3315-3322.

Baird G.D., Lomax M.A., Symonds H.W. & Shaw S.R. 1980. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. Biochem. J. 186:47-57.

Balage M., Sinaud S., Prod'Homme M., Dardevet D., Vary T. Kimball S.R., Jefferson L.S. & Grizard J. 2001. Amino acids and insulin are both required to regulate assembly of the eIF4E IF4G complex in rat skeletal muscle. Am J. Physiol. 281: E565-E574.

Balch C. C. 1967. Problems in predictiong the value of non-protein nitrogen as a substitute for protein in rations for farm animals. World Rev. Anim. Prod. 3:84-91.

Ball R.O. 2002. Definition of the amino acid requirements in pigs: partitioning between gut and muscle. In Amino acids: Meat, Milk and More!, pp17-25. [H. lapierre et D.R. Ouellet Eds]. Quebec, Canada. Congrès CSAS 2002.

Ballmer P.E., McNurlan M.A., Essen P., Anderson S.E. & Garlick P.J. 1995. Albumin synthesis rates measured with [(2)H(5)ring]phenylalanine are not responsive to short-term intravenous nutrients in healthy humans. J. Nutr. 125:512-519.

Baracos V.E. Brun-Bellut J. & Marie M. 1991. Tissue protein synthesis in lactating and dry goats. Brit. J. Nutr. 66:451-465.

Baracos V. E. 2004. Animal models of amino acid metabolism: A focus on the intestine. J. Nutr. 134: 1656S-1659S.

Barle H., Nyberg B., Essen P., Andersson K., McNurlan M. A., Wernerman J., & Garlick P. J. 1997. The synthesis rates of total liver protein and plasma albumin determined simultaneously in vivo in humans. Hepatology. 25:154-158.

Barrazoni R., Meek S. E., Ekberg K., Wahren J. & Nair K. S. 1999. Arterial KIC as marker of liver and muscle intracellular pools in heathy and type 1 diabetic humans. Am. J. Physiol. 277:E238-E244.

Barnes R. J., Comline R. S., & Dobson A. 1986. The Control of splanchnic blood flow. In: Control of Digestion and Metabolism in Ruminants pp. 41-59 [Milligan, L. P., Grovum, W. L., & Dobson, A., editors]. Prentice Hall, Engelwood Cliffs, NJ.

Barrett E.J. & Gelfand R.A. 1989. The in vivo study of cardiac and skeletal muscle protein turnover. Diebetes Metab. Rev. 5:133-148.

Baumann P. Q., Stirewalt W. S., O'Rourke B. D., Howard D., & Nair K. S. 1994. Precursors pools of protein synthesis: a stable isotope study in a swine model. Am. J. Physiol. 267:E203-E209.

Bell A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. J. Anim. Sci. 73:2804-2819.

Bergman E. N., Katz M. L., & Kaufman C. F. 1970. Quantitative aspects of hepatic and portal glucose metabolism and turnover in sheep. Am. J. Physiol. 219:785-793.

Bergman E.N & Pell J.M. 1985. Integration of amino acid metabolism in the ruminant. Dans Herbivore nutrition in the subtropics and tropics. Pp613-628 [Gilchrist F.M.C. et Mackie R.I. eds].

Bequette B.J., Metcalf J.A., Wray-Cahen D., Backwell F.R.C., Sutton D., Lomax M.A., MacRae J.C. & Lobley G.E. 1996a. Leucine and protein metabolism in the lactating dairy cow mammary gland: Responses to supplemental dietary crude protein intake. J. Dairy Res. 63:209-222.

Bequette B.J., Backwell F.R.C., MacRae J.C., Lobley G.E., Crompton L.A.; Metcalf J.A. & Sutton J.D. 1996b. Effect of intravenous amino acid infusion on leucine oxidation across the mammary gland of the lactating goat. J. Dairy Sci. 79:2217-2224.

Bequette B. J., Sunny N. E., El-Kadi S. W., & Owens S. L. 2006. Application of stable isotopes and mass isotopomer distribution analysis to the study of intermediary metabolism of nutrients. J. Anim. Sci. 84:E50-E59.

Bergeron K., Julien P., Davis T.A., Myre A. & Thivierge M.C. 2007. Long-chain n-3 fatty acids enhance neonatal insulin-regulated protein metabolism in piglets by differentially altering muscle lipid composition. J. Lipid Res. 48:2396-2410.

Berry, MN, & Friend DS. 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J. Cell. Biol. 43:506-520.

Berthiaume R., Dubreuil P., Stevenson M., McBride B.W. & Lapierre H. 2001. Intestinal disappearance and mesenteric and portal appearance of amino acids in dairy cows fed ruminally protected methionine. J. Dairy Sci. 84:194-203.

Birchenall-Sparks M. C., Roberts M. S., Staecker J., Hardwick J. P., & Richardson A. 1985. Effect of dietary restriction on liver protein synthesis in rats. J. Nutr. 115:944-950.

Blouin J. P., Bernier J. F., Reynolds C. K., Lobley G. E., Dubreuil P., & Lapierre H. 2002. Effect of supply of metabolizable protein on splanchnic fluxes of nutrients and hormones in lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 85:2618-2630.

Bohnert D.W., Larson B.T., Lewis S.J., Richards C.J., Swanson K.C., Harmon D.L. & Mitchell G.E. Jr. 1999. Net nutrient flux in visceral tissues of lambs fed diets differing in supplemental nitrogen source. J. Anim. Sci. 77:2545-2553.

Boisclair Y.R., Bauman D.E., Bell A.W., Dunshea F.R. & Harkins M. 1994. Nutrient utilization and protein turnover in the hindlimb of cattle treated with bovine somatotropin. J. Nutr. 124:664-673.

Bonen A., Clark M. G., & Henriksen E. J. 1994. Experimental approaches in muscle metabolism: hindlinb perfusion and siolated muscle incubations. Am. J. Physiol. 266: E1-E16.

Bos C., Stoll B., Fouillet H., Gaudichon C., Guan X., Grusak M.A., Reeds P.J., Tomé D. & Burrin D.G. 2003. Intestinal lysine metabolism is driven by the enteral availability of dietary lysine in piglets fed a bolus meal. Am. J. Physiol. Endocr. Metab. 285:E1246-1257.

Bradford B.J. & Allen M.S. 2005. Phlorizin administration increases hepatic gluconeogenic enzyme mRNA abundance but not feed intake in late-lactation dairy cows. J. Nutr. 135:2206-2211.

Brockman R.P., & Bergman E.N. 1975. Effect of glucagon on plasma alanine and glutamine metabolism and hepatic gluconeogenesis in sheep. Am. J. Physiol. 228: 1627-1633.

Brockman R. P. 1990. Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. Br. J. Nutr. 64:95-101.

Brockman R.P. 1993. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. In: Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism Cambridge. Pp 249-265. [J.M. Forbes, editor].

Broderick GA & Merchen NR. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. J. Dairy Sci. 75: 2618-2632.

Broderick G. A., Stevenson M. J., Patton R. A., Lobos N. E., & Olmos Colmenero J. J. 2008. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 91:1092-1102.

Bruckental I., Huntington G. B., Baer C. K., & Erdman R. A. 1997. The effect of abomasal infusion of casein and recombinant somatotropin hormone injection on nitrogen balance and amino acid fluxes in portal-drained viscera and net hepatic and total splanchnic blood in Holstein steers. J. Anim. Sci. 75:1119-1129.

Bruins M. J., Deutz N. E. P., & Soeters P. B. 2003. Aspects of organ protein, amino acid and glucose metabolism in a porcine model of hypermetabolic sepsis. Clin. Sci. 104:127-141.

Burgess SC, He TH, Yan ZY, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, Browning JD & Magnuson M.A. 2007. Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. Cell Metab. 5:313-320.

Burrin D. G., Ferrell C. L., Britton R. A., & Bauer M. 1990. Level of nutrition and visceral organ size and metabolic activity in sheep. Br. J. Nutr. 64:439-448.

Burrin D. G., Ferrell C/ L/, Eisemann J. H., & Britton R. A. 1991. Level of nutrition and splanchnic metabolite flux in young lambs. J. Anim. Sci. 69:1082-1091.

Burrin D.G., Shulman R.J., Reeds P.J., Davis T.A. & Gravitt K.R. 1992. Porcine colostrum and milk stimulate visceral organ and skeletal muscle protein synthesis in neonatal piglets. J. Nutr. 122: 1205-13.

Burrin D.G., Stoll B. & Guan X. 2003. Glucagono-like peptide 2 function in domestic animals. Dom. Anim. Endocrinol. 24:103-122.

Bush J.A., Wu G., Suryawan A., Nguyen H.V. & Davis T.A. 2002. Somatotropin-induced amino acid conservation in pigs involves differential regulation of liver and gut urea cycle enzyme activity. J. Nutr. 132:59-67.

Bush J.A., Burrin D.G., Suryawan A., O'Connor P.M.J., Nguyen H.V., Reeds P.J., Steele N.C., Van Goudoever J.B. & Davis T.A. 2003. Somatotropin-induced protein anabolism in hindquarters and portal-drained viscera of growing pigs. Am. J. Physiol. 284:E302-E312.

Calder A. G., Garden K. E., Anderson S. E., and Lobley G. E. 1999. Quantitation of blood and plasma amino acids using isotope dilution electron impact gas chromatography/mass splectrometry with U-13C amino acids as internal standards. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 13:2080-2083.

Caperna T.J., Campbell R.G., Ballard M.R.M. & Steele N.C. 1991. Somatotropin enhances the rate of amino-acid deposition but has minimal impact on amino-acid balance in growing pigs. J. Nutr. 125:2104-2113.

Caso G., Scalfi L., Marra M., Covino A., Muscaritoli M., McNurlan M. A., Garlick P. J., & Contaldo F. 2000. Albumin synthesis is diminished in men consuming a prdominantly vegetarian diet. J. Nutr. 130:528-533.

Caso G., Ford G. C., Nair K. S., Garlick P. J. & McNurlan M. A. 2002. Aminoacyl-tRNA enrichement after a flood of labelled phenylalanine: inslin effect on muscle protein synthesis. Am. J. Physiol. 282:E1029-E1038.

Caso G., Feiner J., Mileva I., Bryan L. J., Kelly P., Autio K., Gelato M. C., & McNurlan M. A. 2007. Response of albumin synthesis to oral nutrients in young and eldery subjects. Am. J. Physiol. 282:E1029-1038.

Castillo A. R., Kebreab E., Beever D. E., Barbi J. H., Sutton J. D., Kirby H. C., & France J. 2001. The effect of energy supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. J. Anim. Sci. 79:240-246.

Cayol M. 1995. Pool précurseur de la synthèse protéique. Applictions à la mesure de la vitesse de synthèse de protéines particulières chez l'homme. Thèse de physiologie. Université d'Auvergne. France.

Cayol M., Boirie Y., Prugnaud J., Gachon P., Beaufrere B. & Obled C. 1996. Precursor pool for hepatic protein synthesis in humans: effects of tracer route infusion and dietary proteins. Am. J. Physiol. 270: E980-987.

Cayol M., Boirie Y., Rambourdin F., Prugnaud J., Gachon P., Beaufrère B., & Obled C. 1997. Influence of protein intake on whole body and splanchnic leucine kinetics in humans. Am. J. Physiol. 272:E584-E591.

Chandramouli V., Ekberg K., Schumann W.C., Kalhan S.C., Wahren J. & Landau B.R. 1997. Quantifying gluconeogenesis during fasting. Am. L. Physiol. 273: E1209-1215.

Cherrick G. R., Stein S. W., Leevy C. M., & Davidson C. S. 1960. Indoxyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. J. Clin. Invest. 39:592-600.

Chevalier R., Pelletier G., & Gagnon M. 1984. Sampling technique for collection of expired CO_2 in studies using naturally labelled ^{13}C in calves. Can. J. Anim. Sci. 64:495-498.

Chowdhury S. A. & Orskov E. R. 1997. Protein energy relationships with particular references to energy undernutrition: a review. Small. Rum. Res. 26:1-7.

Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MR. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. J. Dairy Sci. 75:2304-2323.

Combaret L., Tilignac T., Claustre A., Voisin L., Taillandier D., Obled C., Tanaka K., & Attaix D., 2002. Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. Biochem. J. 361:185-192.

Connell A., Calder A. G., Anderson S. E., & Lobley G. E. 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. Br. J. Nutr. 77:255-271.

Danfaer A., Tetens V., & Agergaard N. 1995. Review and an experimental study on the physiological and quantitative aspects of gluconeogenesis in lactating ruminants. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 111:201-210.

Dangin M., Desport J. C., Gachon P., & Beaufrere B. 1999. Rapid and accurate 13CO2 isotopic measurement in whole blood: comparison with expired gas. Am. J. Physiol. 276. E212-E216.

Dardevet D., Sornet C., Attaix D., Baracos V.E. & Grizard J. 1994. Insulin-like growth factor-1 and insulin resistance in skeletal muscles of adult and old rats. Endocrinol. 134:1475-1484.

Dardevet D., Sornet C., Vary T. & Grizard J. 1996. Phosphatidylinositol 3-kinase and p70 s6 kinase participate in the regulation of protein turnover in skeletal muscle by insulin and insulin-like growth factor I. Endocrinology. 137:4087-4094.

Dardevet D., Sornet C., Balage M. & Grizard J. 2000. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by insulin decreases with age. J. Nutr. 130:2630-2635.

Dardevet D., Moore M. C., Rémond D., Everett-Grueter C. A., Cherrington A. D. 2006. Regulation of hepatic metabolism by enteral delivery of nutrients. Nutr. Res. Rev. 19:161-173.

Dardevet D., Kimball S.R., Jefferson L.S., Cherrington A.D., Rémond D., DiConstanzo C.A. & Moore M.C. 2008. Portal infusion of amino acids is more efficient than peripheral infusion in stimulating liver protein synthesis at the same hepatic amino acid load in dogs. Am. J. Clin. Nutr. 88:986-996.

Davis T.A., Burrin D.G., Fiorotto M.L. & Nguyen H.V. 1996. Protein synthesis in skeletal muscle and jejunum is more responsive to feeding in 7- than in 26-day-old pigs. Am. J. Physiol. 270:E802-E809.

Davis T.A., Burrin D.G., Fiorotto M.L., Reeds P.J. & Jahoor F. 1998. Roles of insulin and amino acids in the regulation of protein synthesis in the neonate. J. Nutr. 128: 347S-350S.

Davis T.A., Nguyen H.V., Suryawan A., Bush J.A., Jefferson L.S. & Kimball S.R. 2000. Developmental changes in the feeding-induced stimulation of translation initiation in muscle of neonatal pigs. Am. J. Physiol. 279:E1226-1234.

Davis T.A., Fiorotto M.L., Beckett P.R., Burrin D.G., Reeds P.J., Wray-Cahen D & Nguyen H.V. 2001. Differential effects of insulin on peripheral and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs. Am J. Physiol. 280:E770-E779.

Davis T.A., Fiorotto M.L., Burrin D.G., Reeds P.J., Nguyen H.V., Beckett P.R., Vann R.C. & O'Connor P.M.J. 2002. Stimulation of protein synthesis by both insulin and amino acids is unique to skeletal muscle in neonatal pigs. Am J. Physiol. 282:E880:E890.

Davis T.A., Bush J.A., Vann R.C., Suryawan A., Kimball S.R. & Burrin D.G. 2004. Somatotropin regulation of protein metabolism in pigs. J. Anim. Sci. 82:E207-E213.

Debras E., Grizard J., Aina E., Tesseraud S., Champredon C. & Arnal M. 1989. Insulin sensitivity and responsiveness during lactation and dry period in goats. Am. J. Physiol. 256:E295-E302.

De Feo P. Gan Gaisano M.G. & Haymond M.W. 1991. Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. J. Clin. Invest. 88:833-840.

De Feo P., Horber F. F., & Haymond M. W. 1992. Meal stimulation of albumin synthesis: a significant contributor to whole body protein synthesis in humans. Am. J. Physiol. 263:E794-E799.

De Feo P., Volpi E., Lucidi P. Crucuani G. Reboldi G., Siepi D., Mannarino E., Santeusanio F., Brunetti P. & Bolli G.B. 1993. Physiological increments in plasma insulin concentrations have selective and different effect on synthesis of he patic proteins in normal humans. Diabetes 42:995-1002.

De Feo P. & Lucidi P. 2002. Liver protein synthesis in physiology and in disease states. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5: 47-50.

DeFronzo R.A., Ferrannini E., Hendler R., Wahren J. & Felig P. 1978. Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. Proc Natl Acad Sci 75: 5173-5177.

Delgado-Elorduy A., Theurer C.B., Huber J.T., Alio A., Lozano O., Sadik M., Cuneo P., De Young H.D., Simas I.J., Santos J.E.P., Nussio L., Nussio C., Webb K.E. Jr & Tagari H. 2002. Splanchnic and mammary nitrogen metabolism by dairy cows fed dry-rolled or steam-flaked sorghum grain. J. Dairy Sci. 85:148-159.

Demigne C., Yacoub C., Morand C. & Remesy C. 1988. Les orientations du métabolisme intermédiaire chez les ruminants. Reprod. Nutr. Dev. 28: 1-17.

Demigné C., Yacoub C., Morand C., & Remesy C. 1991. Interactions between propionate and amino acid metabolism in isoltaed sheep hepatocytes. Br. J. Nutr. 65:301-317.

Desforges M. Lacey H. A., Glazier J. D., Greenwood S. L., Mynett K. J., Speake P. F., & Sibley C. P. 2005. SNAT4 isoform of system A amino acid transporter is expressed in human placenta. Am. J. Physiol. 290:C305-C312.

Deutz N.E., Bruins M.J. & Soeters P.B. 1998. Infusion of soy and casein protein meals affects interorgan amino acid metabolism and urea kinetics differently in pigs. J. Nutr. 128:2435-2445.

DiConstanzo C.A., Dardevet D.P., Neal D.W., Lautz M., Allen E., Snead W. & Cherrington A.D. 2006. Role of the hepatic sympathetic nerves in the regulation of net hepatic glucose uptake and the mediation of the portal glucose signal. Am. J. Physiol. 290: E9-16.

Doepel L., Lobley G.E., Bernier J.F., Dubreuil P. & Lapierre H. 2007. Effect of glutamine supplementation on splanchnic metabolism in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 90:4325-4333.

Donkin S. S. & Armentano L. E. 1993. Preparation of extended in vitro cultures of bovine hepatocytes that are homonally responsive. J. Anial. Sci. 71:2218-2227.

Donkin S.S. & Armentano L.E. 1995. Insulin and glucagon regulation of gluconeogenesis in preruminating and ruminating bovine. J. Anim. Sci. 73: 546-51.

Donkin S. S., Bertics S. J., & Armentano L. E. 1997. Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagons in neonatal calf hepatocytes. J. Anim. Sci. 75:3082-3087.

Drucker D.J. 2001. Minireview: The glucagon-like peptides. Endocrinol. 142:521-527.

Dudley M. A., Nichols B. L., Rosenberg J., Perkinson J. S., & Reeds P. J. 1992. Feeding status affects in vivo prosucrase-isomaltase processing in rat jejunum. J. Nutr. 122:528-534.

Eisemann J.H., Hammond A.C. & Rumsey T.S. 1989. Tissue protein synthesis and nucleic acid concentrations in steers treated with somatotropin.

El-Kadi S. W., Baldwin 6th R.L., Sunny N.E., Owens S.L., & Bequette B.J.. 2006. Intestinal protein supply alters amino acid, but not glucose, metabolism by the sheep gastrointestinal tract. J. Nutr. 136:1261-1269.

Etherton T.D. & Bauman D.E. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. Physiol. Rev. 78:745-761.

Food and Agriculture Organization. 2006. World agriculture towards 2015/2030 : summary report. Rome Italy.

Fafournoux, P., C. Rémésy, and C. Demigné. 1990. Fluxes and membrane transport of amino acids in rat liver under different protein diets. Am. J. Physiol. 259:E614-E625.

Faure M., Choné F., Mettraux C., Godin J.P., Béchereau F., Vuichoud J., Papet I., Breuillé D. & Obled C. 2007. Threonine utilization for synthesis of acute phase proteins, intestinal proteins, and mucins is increased during sepsis in rats. J. Nutr. 37:1802-1807.

Fehlmann, M., A. Le Cam, P. Kitabgi, F. F. Rey, and P. Freychet. 1979. Regulation of amino acid transport in the liver. Emergence of a high affinity transport system in isolated hepatocytes from fasting rats. J. Biol. Chem. 254:401-407.

Ferland G., Audet M. & Tuchweber B. 1992. Effect of dietary restriction on lysosomal bodies and total protein synthesis in hepatocytes of aging rats. Mech Ageing Dev. 64:49-59.

Ferrell C. L., Kreikemeier K. K., & Freetly H. C. 1999. The effect of supplemental energy, nitrogen, and protein on feed intake, digestibility, and nitrogen flux across the gut and liver in sheep fed low-quality forage. J. Anim. Sci. 77:3353-3364.

Ferrell C. L., Freetly H. C., Goetsch A. L., & Kreikemeier K. K. 2001. The effect of dietary nitrogen and protein on feed intale, nutrient digestibility, and nitrogen flux across the portal drained viscera and liver of sheep consuming high-concentrate diets ad libitum. J. Anim. Sci. 79:1322-1328.

Flaim K.E., Hutson S.M., Lloyd C.E., Taylor J.M., Shiman R. & Jefferson L.S. 1985. Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 249:E447-E453.

Forsell J. H., Jesse B. W., & Shull L. R. 1985. A technique for isolation of bovine hepatocytes. J. Anim. Sci. 60:1597-1609.

Fouillet H., Bos C., Gaudichon C., & Tomé D. 2002. Approaches to quantifying protein metabolism in response to nutrient ingestion. J. Nutr. 132:3208S-3218S.

France J. & Siddons R. C. 1993. Volatile fatty acid production. In Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, pp. 107–121. [J. M. Forbes & J. France (eds.)]. CAB International, Wallingford, Royaume-Uni.

Franchi-Gazzola R., Visigalli R., Bussolati O., Dall'Asta V., & Gazzola G. C. 1999. Adaptative increase of amino acid transport system A requires ERK ½ activation. J. Biol. Chem. 274:28922-28928.

Frank J.W., Escobar J., Suryawan A., Kimball S.R., Nguyen H.V., Jefferson L.S. & Davis T.A. 2005. Protein synthesis and translation initiation factor activation in neonatal pigs fed increasing levels of dietary protein. J. Nutr. 135: 1374-81.

Freyse E.J., Fischer U., Knospe S., Ford G.C. & Nair K.S. 2006. Differences in protein and energy metabolism following portal versus systemic administration of insulin in diabetic dogs. Diabetologia 49: 543-551.

Fryburg D.A. & Barrett E.J. 1993. Growth hormone acutely stimulates skeletal muscle but not whole-body protein synthesis in humans. Metabolism 42:1223-1227.

Fuller M. F., & Reeds P. J. 1998. Nitrogen cycling in the gut. Annu. Rev. Nutr. 18: 385-411.

Gaccioli F., C. C. Huang, C. Wang, E. Bevilacqua, R. Franchi-Gazzola, G. C. Gazzola, O. Bussolati, M. D. Snider, and M. Hatzolglou. 2006. Amino acid starvation induces the SNAT2 neutral amino acid transporter by a mechanism that involves eukaryotic initiation factor 2 phorphjorylation and cap-independent translation. J. Biol. Chem. 281:17929-17940.

Garlick P. J., McNurlan M. A., & Preedy V. R. 1980. A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H]phenylalanine. Biochem. J. 192:719-723.

Garlick P. J. & Fern E. B. 1985. Whole-body protein turnover: theorical considerations. Dans : Substrate and Energy Metabolism in Man (Eds : Garrow J.S. & Halliday D.). pp 7-15, John Libbey London Paris.

Gebhardt R. 1992. Metabolic zonation of the liver. Regulation and implications for liver function. Pharmacol. Therapeut. 53: 275-354.

Geissler A., Kanamori K., & Ross B. D. 1996. Real-time study of urea cycle using 15N NMR in the isolated perfused liver. Biochem. J. 287:813-820.

Gingras A.A., White P.J., Chouinard P.Y., Julien P., Davis T.A., Dombrowski L., Couture Y., Dubreuil P., Myre A., Bergeron K., Marette A. & Thivierge C. 2007. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt-mTOR-S6K1 pathway and insulin sensitivity. J. Physiol. 579:269-284.

Giordano M., Castellino P., and De Fronzo R. A. 1996. Differential responsiveness of protein synthesis and degradation to amino acid availability in humans. Diabetes. 45:393-399.

Goetsch A. L., Ferrell C. L., & Freetly H. C. 1994. Effects of different supplements on splanchnic oxygen consumption and net fluxes of nutrients in sheep consuming bromegrass (Bromus inermis) hay ad libitum. Br. J. Nutr. 72:701-712.

Goetsch A. L., Patil A. R., Galloway D. L., Kouakou B., Wang Z. S., Park K. K., Rossi J. E. 1997. Net flux of nutrients across splanchnic tissues in wethers consuming grasses of different sources and physical forms ad libitum. Br. J. Nutr. 77:769-781.

Goodwin G. W., Gibboney W., Paxton R., Harris R. A., & Lemons J. A. 1987. Activities of branched-chain amino acid aminotransferase and branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in tissues of maternal and fetal sheep. Biochem J., 242:305-308.

Greenfield R.B., Cecava M.J. & Donkin S.S. 2000. Changes in mRNA expression for gluconeogenic enzymes in liver of dairy cattle during the transition to lactation. J. Dairy Sci. 83:1228-1236.

Gruffat-Mouty D., Graulet B., Durand D., Samson-Bouma M.E. & Bauchart D. 1999. Apolipoprotein B production and very low density lipoprotein secretion by calf liver slices. J. Biochem. 126:188-193.

Guerino F., Huntington G. B., & Erdman R. A. 1991. The net portal and hepatic flux of metabolites and oxygen consumption in growing beef steers given postruminal casein. J. Anim. Sci. 69:387-395.

Guillet C., Zangarelli A., Gachon P., Morio B., Giraudet C., Rousset P., and Boirie Y. 2004. Whole body protein breakdown is less inhibited by insulin, but still responsive to amino acid, in nondiabetic elderly subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89:6017-6024.

Halliday D., Bodamer O. A. F. 1997. Measurement of glucose turnover – implications for the study of inborn erros of metabolism. Eur. J. Pediatr. 156:S35-S38.

Hanigan M.D. 2005. Quantitative aspects of ruminant splanchnic metabolism as related to predicting animal performance. Anim. Sci. 80:23-32.

Harmon D.L. 1992. Impact of nutrition on pancratic exocrine and endocrine secretion in ruminants: a review. J. Anim. Sci. 70:1290-1301.

Harris P.M., Skene P.A., Buchan V., Milne E., Calder A.G., Anderson S.E., Connell A. & Lobley G.E. 1992. Effect of food intake on hind-limb and whole-body protein metabolism in young growing sheep: chronic studies based on arterio-venous techniques. Br J. Nutr. 68:689-407.

Häussinger D. & Gerok W. 1983. Hepatocyte heterogeneity in glutamate uptake by isolated perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 136: 421-5.

Häussinger D. 1983. Hepatocyte heterogeneity in glutamine and ammonia metabolism and the role of an intercellular glutamine cycle during ureagenesis in perfused rat liver. Eur. J. Biochem. 133:269-275.

Häussinger D. 1996. The role of cellular hydratation in the regulation of cell function. Biochem. J. 313:697-710.

Häussinger D., Graf D. & Weiergräber O.H. 2001. Glutamine and cell signaling in liver. J. Nutr. 131:2509S-2514S.

Hecketsweiler B. & Hecketsweiler P. 2004. Voyage en biochimie: Circuits en biochimie humain, nutritionelle et métabolique. Elesevier, Gap, France.

Heger J., Patras P., Nitrayova S., Dolesova P. & Sommer A. 2007. Histidine mlaintenance requirement and efficiency of its utilization in young pigs. Arch. Anim. Nutr. 61:179-188.

Heitmann R.N. & Bergman E.N. 1978. Glutamine metabolism, interorgan transport and glucogenicity in the sheep. Am. J. Physiol. 234:E197-E203.

Heitmann R.N. & Bergman E.N. 1981. Glutamate interconversions and glucogenicity in the sheep. Am. J. Physiol. 241:E465-E472.

Hoerr R. A., Yu, Y. M., Wagner D. A., Burke J. F., & Young V. R. 1989. Recovery of 13C in breath from NaH13CO3 infused by gut and vein : effect of feeding. Am. J. Physiol. 257:E426-E438.

Hornick J.L., Van Eenaeme C., Gérard O., Dufrasne I. & Istasse L. 2000. Mechanisms of reduced and compensatory growth. Dom. Anim. Endocrinol. 19:121-132.

Hoskin S. O., Gavet S., Milne E. & Lobley G. E. 2001. Does glutamine act as a substrate for transamination reactions in the liver of fed and fasted sheep? Br. J. Nutr. 85:591-597.

Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, & Pesch LA. 1967. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. J. Cell. Biol. 35:675-684

Huber J. T., & Kung Jr. L. 1981. Protein and nonprotein nitrogen utilization in dairy cattle. J. Dairy Sci. 64: 1170-1195.

Hunter K.A., Ballmer P.E., Anderson S.E., Broom J., Garlick P.J. & McNurlan M.A. 1995. Acute stimulation of albumin synthesis rate with oral meal feeding in healthy subjects measured with [ringH-2(5)]phenylalanine. Clin. Sci. 88:235-242.

Huntington G.B., 1984. Net absorption of glucose and nitrogenous compounds by lactating Holstein cows. J. Dairy Sci. 67:1919-1927.

Huntington G.B. & Prior R.L. 1985. Net absorption of amino acids by portal-drained viscera and hind half of beef fed a high concentrate diet. J. Anim. Sci. 60:1491-1499.

Huntington G.B. 1987. Net absorption from portal-drained viscera of nitrogenous compounds by beef heifers fed on diets differing in protein solubility or degradability in the rumen. Brit. J. Nutr. 57:109-114.

Huntington G.B., Varga G.A., Glenn B.P. & Waldo D.R. 1988. Net absorption and oxygen consumption by Holstein steers fed alfalfa or orchardgrass silage at two equalized intakes. J. Anim. Sci. 66:1292-1302.

Huntington G. B. 1989. Hepatic urea synthesis and site and rate of urea removal from blood of beef steers fed alfafa hay or a high concentrated diet. Can. J. Anim. Sci. 69:215-223.

Huntington G.B., Eisemann J.H. & Whitt J.M. 1990. Portal blood flow in beef steers: comparison of techniques and relation to hepatic blood flow, cardiac output and oxygen uptake. J. Anim. Sci. 68:1666-1673.

Huntington G. B., Zetina E. J., Whitt J. M., & Potts W. 1996. Effects of dietary concentrate level on nutrient absorption, liver metabolism, and urea kinetics of beef steers fed isonitrogenous and isoenergetic diets. J. Anim. Sci. 74:908-916.

Huntington G.B., Harmon D.L. & Richards C.J. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. J. Anim. Sci. 84:E14-E24.

Hutson N. J., Lloyd C. E., & Mortimore G. E. 1982. Degradation of intra- and extrahepatic protein by livers of normal and diabetic mice: differential responses to starvation. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:1737-1741.

Ide Y. & Shimbayashi K. 1968. Hepatic content of the urea cycle enzymes in goeats fed a high protein diet. Nipp. Juig. Zas. 30:125-130.

Innoviande, 2008. Les perspectives d'évolution des marchés de la viande et des produits carnés à l'échelle modiale. 28 Fevrier 2008. Clermont-Ferrand, France.

INRA.1978. Principes de la nutrition et de l'alimentation des ruminants. [Jarrige R. ed.]. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.

Issekutz B., Paul P., Miller H. I., and Bortz W. M. 1968. Oxidation of plasma FFA lean and obese humans. Metabolism. 17:62-73.

Isserty A., & Ortigues I. 1994. Methods of analysis relating to blood flow measurement of the viscera and aorta in sheep. Reprod. Nutr. Dev. 34:399-413.

Jahoor F., Jackson A.A. & Golden M.H.N. 1988. In vivo metabolism of nitrogen precursors for urea synthesis in the postprandial rat. Ann. Nutr. Metab. 32 : 240-244.

Jahoor F., Bhattiprolu S., Del Rosario M. Burrin D. G., Wykes L. & Frazer M. 1996. Chronic protein deficiency differentially affects the kinetics of plasma proteins in young pigs. J. Nutr. 126:1489-1495.

Jahoor F., Wykes L., Del Rosario M., Frazer M., & Reeds P. J. 1999. Chronic protein undernutrition and an acute inflammatory stimulus elicit different protein kinetic responses in plasma but not in muscle of piglets. J. Nutr. 129:693-699.

Jaleel A., & Nair K. S. 2004. Identification of multiple proteins whose synthetic rates are enhanced by high amino acid levels in rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 286:E950-E957.

Janeczko M.J., Stoll B., Chang X., Guan X. & Burrin D.G. 2007.Extensive gut metabolism limits the intestinal absorption of excessive supplemental dietary glutamate loads in infant pigs. J. Nutr. 137:2384-2390.

Jansman A.J.M., Smink W., van Leeuwen P. & Rademacher M. 2002. Evaluation through literature data of the amount and amino acid composition of basal endogenous crude protein at the terminal ileum in pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 98 :49-60.

Jarrige R., Ruckebush Y., Demarquilly C., Farce M.H. & Journet M. 1995. Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion. INRA Editions

Jeejeebhoy K.N., Ho J., Greenberg G.R., Phillips M.J., Bruce-Robertson A.B. & Sodtke U. 1975. Albumin, fibrinogen and transferrin synthesis in isolated rat hepatocyte suspensions. Biochem. J. 146:141-155.

Jones H. N., Ashworth C. J., Page K. R. & McArdle H. J. 2006. Expression and adaptive regulation of amino acid transport system A in a placental cell line under amino acid restriction. Reproduction. 131: 951-960.

Jungermann K., & Katz N. 1989. Functional specialization of different hepatocyte populations. Physiol. Rev. 69:708-764.

Jungermann K., & Kietzmann T. 1996. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. Annu. Rev. Nutr. 16:179-203.

Kamalzadeh A., Koops WJ., van Bruchem J., Tamminga S. & Zwart D. 1998. Feed quality restriction nd compensatory growth in growing sheep: development of body organs. Small Rum. Res. 29:71-82.

Katz M. L. and, Bergman E. N. 1969 Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. Am. J. Physiol. 216:946-952.

Kaufman C. F., & Bergman E. N. 1971. Renal glucose, free fatty acid, and ketone body metabolism in the unanesthetized sheep. Am. J. Physiol. 221:967-972.

Kelleher J.K. 1999. Estimating gluconeogenesis with [U-13C]glucose: molecular condensation requires a molecular approach. Am. J. Physiol. 277:E395-E400.

Kennedy P.M & Milligan L.P. 1980. The degradation and utilization of of endogenous urea from the blood to the rumen of sheep: A review. Can. J. Anim. Sci. 60:205-221.

Kimball S.R., Vary T.C. & Jefferson L.S. 1994. Regulation of protein synthesis by insulin. Annu. Rev. Physiol. 56 :321-348.

Kimball S.R., Horetsky R.L. & Jefferson L.S. 1995. Hormonal regulation of of albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. Am. J. Physiol. 268:E6-E14.

Koeln L.L., Schlagheck T.G. & Webb K.E. 1993. Amino acid flux across the gastrointestinal tract and liver of calves. J. Dairy Sci. 76:2275-2285.

Koenig K. M., Newbold C. J., McIntosh F. M., & Rode L. M. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. J. Anim. Sci. 78:2431-2445.

Landau B. R., Wahren J., Chandramouli V., Schumann W. C., Ekberg K. & Kalhan S. C. 1995. Use of 2H2O for estimating rates of gluconeogenesis. Application to the fasted state. J. Clin. Invest. 95:172-178.

Landau B. R., Wahren J., Ekberg K., Previs S. F., Yang D., & Brunengraber H. 1998. Limitations in estimating gluconeogenesis and Cori cycling from mass isotopomer distributions using [U-13C6]glucose. Am. J. Physiol. 274:E954-E961.

Lapierre H., Bernier J. F., Dubreuil P., Reynolds C. K., Farmer C., Ouellet D. R., & Lobley G. E. 1999. The effect of intake on protein metabolism across splanchnic tissues in growing beef steers. Br. J. Nutr. 81:457-466.

Lapierre H., Bernier J. F., Dubreuil P., Reynolds C. K., Farmer C., Ouellet D. R., & Lobley G. E. 2000. The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. J. Anim. Sci. 78:1084-1099.

Lapierre H. & Lobley G.E. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant : A review. J. Dairy Sci. 84: E223-E236.

Lapierre H., Blouin J.P., Bernier J.F., Reynolds C.K., Dubreuil P. & Lobley G.E. 2002. Effect of supply of metabolizable protein on whole body and splanchnic leucine metabolism in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85:2631-2641.

Lapierre H., Berthiaume R., Raggio G., Thivierge M . C., Doepel L., Pacheaco D., Dubreuil P. & Lobley G. E. 2005. The route of absorbed nitrogen into milk protein. Anim. Sci. 80:11-22.

Lapierre H., Pacheco D, Berthiaume R., Ouellet D.R., Schwab C.G., Dubreuil P., Holtrop G. & Lobley G.E. 2006. What is the true supply of amino acids for a dairy cow? J. Dairy Sci. 89:E1-E14.

Lapierre H., Vernet J., Martineau R., Sauvant D., Noziere P. & Ortigues-Marty I. 2007. Portal absorption of N : partition between amino acids and ammonia in relation with nitrogen intake in ruminants. 2nd International Symposium on Energy and Protein Metabolism and nutrition. (Ed I. Ortigues-Marty) Vichy, France Pp579-580.

Lapierre H., Ouellet D.R., Berthiaume R., Martineau R., Holtrop G. & Lobley G.E. 2008. Distribution of 15N in maino acids during 15N-Leucine infusion : Impact on the estimation of endogenous flows in dairy cows. J. Dairy Sci. 91:2702-2714.

Larbaud D., Debras E., Taillandier D., Samuels S.E., Temparis S., Champredon C., Grizard J. & Attaix D. 1996. Euglycemic hyperinsulinemia and hypermainoacidemia decrease skeletal muscle ubiquitin mRNA in goats. Am. J. Physiol. 271:E505-E512.

Law G.K., Bertolo R.F., Ajiri-Awere A., Pencharz P.B. & Ball R.O. 2007. Adequate oral threonine is critical for mucin production and gut function in neonatal piglets. Am J. Physiol. 292:G1293-G1301.

Layman D. K., and Wolfe R. R. 1987. Sample site selection for tracer studies applying a unidirectional circulatory approach. Am. J. Physiol. 253:E173-E178.

Leevy C. M., Mendenhall C. L., Lesko W. & Howard M. M. 1962. Estimation of hepatic blood flow with indocyanine green. J. Clin. Invest. 41:1169-1179.

Le Floc'h N., Obled C., & Seve B. 1995. In vivo threonine oxidation rate is dependent on threonine dietary supply in growing pigs fed low to adequate levels. J. Nutr. 125:2550-2562.

Le Floc'h N. & Seve B. 2000. Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du pors : de la digestion à l'apparition en veine porte. INRA Prod. Anim. 13:303-314.

Lemosquet S., Rigout S., Bach A., Rulquin H. & Blum J.W. 2004. Glucose metabolism in lactating cows in response to isoenergetic infusions of propionic acid or duodenal glucose. J. Dairy Sci. 87:1767-1777.

Leng R.A. & Annison E.F. 1963. Metabolism of acetate, propionate and butyrate by sheep-liver slices. Biochem. J. 86:319-327.

Lescoat P., Sauvant D. & Danfaer A. 1996. Quantitative aspects of blood and amino acid flow in cattle. Reprod. Nutr. Dev. 36:137-174.

Lindsay D. B. 1982. Relationship between amino acid catabolism and protein anabolism in the ruminant. Fed. Proc. 41:2550-2554.

Ling P.R., Bistrian B.R., Blackburn G.L. & Istfan N. 1987. Effect of fetal growth on maternal protein metabolism in postabsorptive rat. Am. J. Physiol. 252: E380-E290.

Lobley G. E., Milne V., Lovie J. M., Reeds P. J., & Pennie K. 1980. Whole body and tissue protein synthesis in cattle. Cr. J. Nutr. 43: 491-502.

Lobley G. E., Connell A., Milne E., Buchan V., Calder A. G., Anderson S. E., & Vint H. 1990. Muscle protein synthesis in response to testosterone administration in wether lambs. Br. J. Nutr. 64:691-704.

Lobley G. E. 1993. Species comparisons of tissue protein metabolism: effects of age and hormonal action. J. Nutr. 123:337-343.

Lobley, G. E., Connell A., Milne E., Newman A. M. & Ewing T. A. 1994. Protein synthesis in splanchnic tissues of sheep offered two levels of intake. Br. J. Nutr. 71:3-12.

Lobley G. E., Connell A., Lomax M. A., Brown D. S., Milne E., Calder A. G., & Farningham D. A. H. 1995. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. Br. J. Nutr. 73:667-685.

Lobley G. E., Connell A., Revell D. K., Bequette B. J., Brown D. S., and Calder A. G. 1996a. Splanchnic-bed transfers of amino acids in sheep blood and plasma, as monitored through use of a multiple U-13C-labelled amino acid mixture. Br. J. Nutr. 75:217-235.

Lobley G.E., Weijs P.J.M., Connell A., Calder, A.G., Brown D.S. & Milne E. 1996b. The fate of absorbed and exogenous ammonia as influenced by forage or forage-concentrate diets in growing sheep. Br. J. Nutr. 76:231-248.

Lobley G. E., & Milano G. D. 1997. Regulation of hepatic nitrogen metabolism in ruminants. Proc. Nutr. Soc. 56:547-563.

Lobley G.E., Bremner D.M., Nieto R., Obitsu T., Moore A.H., Brown D.S. 1998. Transfers of N metabolites across the ovine liver in response to short-term infusions of an amino acid mixture into the mesenteric vein. Br. J. Nutr. 80(4):371-9.

Lobley G. E., Milano G. D., & van der Walt J. G. 2000. The liver: Integrator of nitrogen metabolism. In Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction. Pp149-168. [Cronje P. B. ed]. CAB International, Willingford, UK.

Lobley G.E., Bremner D.M. & Brown D.S. 2001. Response in hepatic removal of amino acids by the sheep to short-term infusions of varied amounts of an amino acid mixture into the mesenteric vein. Br. J. Nutr. 85: 689-98.

Lobley G.E. 2003. Protein turnover: What does it mean for animal production? Can. J. Anim. Sci. 83:327-340.

Lobley G. E., Shen X., Le G., Bremner D. M., Milne E., Calder A. G., Anderson S. E., & Dennison N. 2003. Oxidation of essential amino acids by the ovine gastrointestinal tract. Br. J. Nutr. 89: 617-629.

Lobley G. E. & Lapierre H. 2003. Post-absorptive metabolism of amino acids. In Progress in research on energy and protein metabolism. Souffrant W. B. & Metges C. C. eds. EAAP Publication n° 109. EAAP, Rome, Italy.

Lomax M.A., Baird G.D., Mallienson C.B. & Symonds H.W. 1979. Differences between lactating and non-lactating dairy cows in concentration and secretion rate of insulin. Biochem. J. 190:281-289.

Lomax M. A. & Baird G. D. 1983. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. Brit J. Nutr. 49:481-496.

Lomax M.A., Donaldson I.A. & Pogson C.I. 1986. The effect of fatty acids and starvation on the metabolism of gluconeogenic precursors by isolated sheep liver cells. Biochem. J. 240: 277-80.

Loncke C., Ortigues-Marty I., Vernet J., Lapierre H., Sauvant D. & Nozière P. 2008. Capacité du système PDI à prédire les quantités d'azote α-aminé absorbés en veine porte chez les ruminants. In : 14ème Rencontres Recherches Ruminants.

Lozano O., Theurer C.B., Alio A., Huber J.T., Delgado-Elorduy A., Cuneo P., DeYoung D., Sadik M. & Swingle R.S. 2000. Net absorption and hepatic metabolism of glucose, L-lactate, and volatile fatty acids by steers fed diets containing sorghum grain processed as dry-rolled or steam-flaked at different densities. J. Anim. Sci. 78:1364-1371.

Luiking Y. C., & Deutz N. E. P. 2007. Interorgan exchange of amino acids: what is the driving force? In Energy and Protein Metabolism and Nutrition pp 319-328 [I Ortigues-Marty, ed.] EAAP Publication. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Luo Q.J., Maltby S.A., Lobley G.E., Calder A.G. & Lomax M.A. 1995. The effect of amino acids on the metabolic fate of 15NH4Cl in isolated sheep hepatocytes. Eur. J. Biochem. 228: 912-7.

MacRae J. C., Walker A., Brown D., & Lobley G. E. 1993. Accretion of total protein and individual amino acids by organs and tissues of growing lambs and the ability of nitrogen balance techniques to quantitate protein retention. Anim. Prod. 57:237-245.

MacRae J. C. 1996. Advancing our understanding of amino acid utilization and metabolism in ruminant tissues In : Nutrient management of food animals. pp 73-89. CRC Press Inc.

MacRae J. C., Bruce L. A., Brown D. S., & Calder A. G. 1997a. Amino acid use by the gastrointestinal tract of sheep given Lucerne forage. Am. J. Physiol. 273: G1200-G1207.

MacRae J. C., Bruce L. A., Brown D. S., Farningham D. A.H., and Franklin M. 1997b. Absorption of amino acids from the intestine and their net flux across mesenteric- and portal-drained viscera of lambs. J. Anim. Sci. 75:3307-3314.

MacRae J.C. Bruce L.A. & Yu F. 1999. The effect of Flavomycin on gastrointestinal leucine metabolism and liveweight gain in lambs. S. Afric. J. Anim. Sci. 29(ISRP):243-244.

Majdoub L. 2002. Orientation propionaique du profil fermentaire ruminal : consequences sur le métabolisme splanchnique des nutriments énergétiques et sur la fourniture et l'utilisation du glucose par le muscle chez l'Agneau recevant du fourrage vert. Thèse de Biologie et Agronomie. Ecole nationale supérieur agronomique de Rennes. France.

Majdoub L., Vermorel M. & Ortigues-Marty I. 2003. Intraruminal propionate supplementation modifies hindlimb energy metabolism without changing the splanchnic release of glucose in growing lambs. Br. J. Nutr. 89:39-50.

Maltby S. A., Reynolds C. K., Lomax M. A., & Beever D. E. 2005. Splanchnic metabolism of nutrients and hormones in steers fed alfalfa under conditions of increased absorption of ammonia and L-arginine supply across the portal-drained viscera. J. Anim. Sci. 83:1099-1096.

Marieb E. N., 1999. Anatomie et physiologie humaines. DeBoeck Université

Mariscal-Landin G., Sève B., Colléaux Y., Lebreton Y., 1995. Endogenous amino nitrogen collected from pigs with end-to-end ileorectal nastomosis is affected by the method of estimation and altered by dietary fiber. J. Nutr., 125, 136-146.

Martin A.K. 1966. Some errors in the determination of nitrogen retention of sheep by nitrogen balance studies. Br. J. Nutr. 20:325-337.

Matthews D. E., Schwartz H. P., Yang R. D., Motil K. J., Young V. R., & Bier D. M. 1982. Relationship of plasma leucine and α-ketoisocaproate during a L-[1-13C] leucine infusion in man: A method for measuring human intracellular leucine tracer enrichement. Metabolism. 31:1105-1112.

Maxwell J. L., Terracio L., Borg T. K., Baynes J. W., & Thorpe S. R. 1990. A fluorescent residualizing label for studies on protein uptake and catabolism in vivo and in vitro. Biochem. J. 267:155-162.

McDowell G. H. 1983. Hormonal control of glucose homeostasis in ruminants. Roc. Nutr. Soc. 42:149-167.

McNurlan M. A., Tomkins A. M., Garlick P. J. 1979. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. Biochem. J. 178:373-379.

McNurlan M.A. & Garlick P.J. 1980. The contribution of rat liver and gastrointestinal tract to whole body protein synthesis in the rat. Biochem. J. 186:380-383.

Meijer A.J., Blommaart E.F.C., Dubbelhuis P.F. & van Sluijters D.A. 1999. Regulation of hepatic nitrogen metabolism. Dans VIIIth International symposium on Protein Metabolism and Nutrition. [Lobley G.E., White A. & Macrae J.C., eds] pp 155-175.

Merry B.J., Holehan A.M., Lewis S.E. & Goldspink D.F. 1987. The effects of ageing and chronic dietary restriction on in vivo hepatic protein synthesis in the rat. Mech. Ageing Dev. 39: 189-99

Metcalf J. A., Beever D. E., Sutton J. D., Wray-Cahen D., Evans R. T., Humphries D. J., Backwell F. R., Bequette B. J. & MacRae J. C. 1994. The effect of supplementary protein on in vivo metabolism of the mammary gland in lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 77:1816-1827.

Milano G. D. 1997. Liver nitrogen transactions in sheep (*Ovis aries*). Thèse de l'Université d'Aberdeen. Ecosse.

Milano GD, Hotston-Moore A, Lobley GE. 2000. Influence of hepatic ammonia removal on ureagenesis, amino acid utilization and energy metabolism in the ovine liver. Br. J. Nutr. 83: 307-15

Miller L.L. 1962. The role of the liver and the non-hepatic tissues in the regulation of free amino acid levels in the blood. In Amino acid pools, pp 708-721 [Holden J.T. ed.]. Elsevier Publication. Amsterdam, Pays-Bas.

Miller D.S. 1969. Assessment of protein requirements by nitrogen balance. Biochem. J. 113:2

Moore M.C., Hsieh P.S., Flakoll P.J., Neal D.W. & Cherrington A.D. 1999a. Differential effect of amino acid infusion route on net hepatic glucose uptake in the dog. Am. J. Physiol. 276: E295-302.

Moore M.C., Hsieh P.S., Flakoll P.J., Neal D.W. & Cherrington A.D. 1999b. Net hepatic gluconeogenic amino acid uptake in response to peripheral versus portal amino acid infusion in conscious dogs. J. Nutr. 129: 2218-2224.

Mosoni L., Patureau Mirand P., Houlier M.L. & Arnal M. 1993a. Age-related changes in protein synthesis measured in vivo in rat liver and gastrocnemius muscle. Mech. Ageing Dev. 68:209-220.

Mosoni L., Houlier M.L., Mirand P.P., Bayle G. & Grizard J. 1993b. Effect of amino acids alone or with insulin on muscle and liver protein synthesis in adult and old rats. Am. J. Physiol. 264: E614-20.

Mosoni L., Malmezat T., Valluy M. C., Houlier M. L. & Patureau-Mirand P. 1996. Muscle and liver protein synthesis adapt efficiently to food deprivation and refeeding in 12-month-old rats. J. Nutr. 126:516-522.

Nair K.S. & Short K.R. 2005. Hormonal and signaling role of branched-chain amino acids. J. Nutr. 135:1547S-1552S.

Neutze S.A., Gooden J.M. & Oddy V.H. 1996. Uptake of labelled phenylalanine into different blood fractions in the portal vein and cranial mesenteric vein in lambs. J. Agric. Sci. Camb. 126:511-518.

Neutze S.A., Gooden J.M. & Oddy V.H. 1997. Measurements of protein turnover in the small intestine of lambs.2. Effects of feed intake. J. Agric. Sci. 128:233-246.

Newbold C. J., Teferedegne B., Kim H.-S., Zuur G., & Lobley G. E. 2000. Effects of protozoa on nitrogen metabolism in the rumen of sheep. Repr. Nutr. Dev. 40:189-228.

Nieto R., Calder A.G., Anderson S.E. & Lobley G.E. 1996. Method for the determination of 15NH3 enrichment in biological samples by gas chromatography/electron impact ionization mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 31: 289-94

Nolan JV & Leng RA. 1972. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. Br. J. Nutr. 27: 177-194.

Nozière P, Attaix D., Bocquier F. & Doreau M. 1999. Effects of underfeeding and refeeding on weight and cellularity of splanchnic organs in ewes. J. Anim. Sci. 77, 2279-2290.

Nozière P., Martin C., Rémond D., Kristensen N.B., Bernard R. & Doreau M. 2000. Effect of composition of ruminally-infused short-chain fatty acids on net fluxes of nutrients across portal-drained viscera in underfed ewes. Br. J. Nutr. 83: 521-31.

Nuttall F. Q., Ngo A., & Gannon M. C. 2008. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? Diabetes. Metab. Res. Rev. 24:438-458.

Nygren J. & Nair K.S. 2003. Differential regulation of protein dynamics in splanchnic and skeletal muscle beds by insulin and amino acids in healthy human sunjects. Diabetes 52:1377-1385.

O'Connor P.M.J., Kimball S.R., Suryawan A., Bush J.A., Nguyen H.V., Jefferson L.S. & Davis T.A. 2004. Regulation of neonatal liver protein synthesis by insulin and amino acids in pigs. Am. J. Physiol. 286:E994-E1003.

O'Riordain M.G., Ross J.A., Fearon K.C.H., Maingay J., Farouk M., Garden J. & Carter D.C. 1995. Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. Am J. Physiol. Endocrinol. Metab. 269:E323-E330.

Oba M., Baldwin 4th R. L., & Bequette B. J. 2004. Oxidation of glucose, glutamate and glutamine by isolated ovine enterocytes in vitro is decreased by the presence of other metabolic fuels. J. Anim. Sci. 82:479-486.

Oba M., Baldwin 4th R. L., Owens S. L. & Bequette B. J. 2005. Metabolic fates of ammonia-N in ruminal epithelial and duodenal mucosal cells isolated from growing sheep. J. Dairy. Sci. 88:3963-3970.

Obled C., Barré F., Millward D. J. & Arnal M. 1989. Whole body protein synthesis: studies with different amino acids in the rat. Am. J Physiol. 257:E639-646.

Obled C., Papet I. & Breuillé D. 2002. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 5:189-197.

Orskov E.R., MacLeod N.A. & Kyle D.J. 1986. Flow of nitrogen from the rumen and abomasum in cattle and sheep given protein-free nutrients by intragastric infusion. Br. J. Nutr. 56:241-248.

Ortigues-Marty I., Durand D. & Lefaivre J. 1994. Use of para-amino hippuric acid to measure blood flows through portal-drained-viscera, liver and hindquarters in sheep. Ann. Zootech. 122: 299-308.

Ortigues-Marty I., Obled C., Dardevet D., & Savary-Auzeloux I. 2003a. Role of the liver in the regulation of energy and protein status. In: Progress in research on energy and protein metabolism. pp 83-98. [Souffrant W. B. , Metges C. C. eds.]. EAAP Publication, Wageningen Academic publishers. Rostock-Warnenmünde, Allemagne.

Ortigues-Marty I., Vernet J. & Majdoub L. 2003b. Whole body glucose turnover in growing and non-productive adult ruminants : meta-analysis and review. Reprod. Nutr. Dev. 43:371-383.

Ouellet D.R., Demers M., Zuur G., Lobley G.E., Seoane J.R., Nolan J.V. & Lapierre H. 2002. Effect of dietary fiber on endogenous nitrogen flows in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85:3013-3025

Ouellet D.R., Berthiaume R., Holtrop G., Lobley G.E., Martineau R. & Lapierre H. 2005. Endogenous nitrogen (EN) flows : effect of methods of conservation of timothy in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 88(Suppl.1):317 (Abstr.)

Overton T.R., Drackley J.K.,Ottemann-Abbamonte C.J., Beaulieu A.D. & Clark J.H. 1998. Metabolic adaptation to experimentally increased glucose demand in ruminants. J. Anim. Sci. 76:2938-2946.

Overton T.R., Drackley J.K., Ottemann-Abbamonte C.J., Beaulieu A.D., Emmert L.S. & Clark J.H. 1999. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. J. Anim. Sci. 77:1940-1951.

Owens F. N., Dubeski P., & Hanson C. F. 1993. Factors that alter the growth and development of ruminants. J. Anim. Sci. 71:3138-3150.

Papet I., Lezebot N., Barre F., Arnal M. & Harper A.E. 1988. Influence of dietary leucine on the activities of branched-chain-amino acid aminotransferase (EC 2.6.1.42) and branched-chain-keto acid dehydrogenase (EC 1.2.4.4) complex in tissues of preruminant lambs. Br.J. Nutr. 59:475-483.

Parker D. S., Lomax M. A., Seal C. J. & Wilton J. C. 1995. Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. Proc. Nutr. Soc. 54:549-563.

Peak M., Al-Habori M. & Agius L. 1992. Regulation of glycogen synthesis and glycolysis by insulin, pH and cell volume. Interactions between swelling and alkalinzation in mediating the effects of insulin. Biochem. J. 282:797-805.

Pell J.M., Caldarone E.M. & Bergman E.N. 1986. Leucine and a-ketoisocaproate metabolism and interconversions in fed and fasted sheep. Metabolism 35:1005-1016.

Petit H. V. & Veira D. M. 1994. Digestion characteristics of beef steers fed silage and different levels of energy with or without protein supplementation. J. Anim. Sci. 72:3213-3220.

Pink D., Elango R., Dixon W. T., & Ball R. O. 2003. Lysine catabolism in the neonatal piglet during postnatal stages of growth and development. FASEB J. 17:A702.

Postic C., Dentin R. & Girard J. 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. Diabetes Metab. 30:398-408.

Prod'homme M., Rieu I., Balage M., Dardevet D., & Grizard J. 2004. Insulin and amino acids both strongly participate to the regulation of protein metabolism. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 7:71-77.

Prod'homme M., Balage M., Debras E., Farges M .C., Kimball S., Jefferson L. & Grizard J. 2005. Differential effects of insulin and dietary amino acids on muscle protein synthesis in adult and old rats. J. Physiol. 563:235-248.

Proud C.G. 2002. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. Eur. J. Biochem. 269:5338-5349.

Qureshi G. A. & Qureshi A. R. 1989. Determination of free amino acids in biological samples: Problems of quantitation. J. Chrom. B. 491:281-289.

Raggio G., Lobley G. E., Pellerin D., Allard G., Berthiaume R., Dubreuil P., Babkine M., & Lapierre H. 2002. Effect of protein intake on synthesis of albumin and plasma total protein in lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 85:243.

Raggio G., Pacheco D., Berthiaume R., Lobley G.E., Pellerin D., Allard G., Dubreuil P. & Lapierre H. 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 87:3461-3472.

Raggio G., Lobley G. E., Berthiaume R., Pellerin D., Allard G., Dubreuil P. & Lapierre H. 2007. Effect of protein supply on hepatic synthesis of plasma and constitutive proteins in lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 90:352-359.

Raggio G. 2006 Effet des apports protéique et énergétique sur le métabolisme protéique chez la vache laitière. Thèse de Biologie et Agronomie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. France.

Reeds P.J. 1992. Isotopic estimation of protein synthesis and proteolysis in vivo. Dans : Modern Methods in Protein Nutrition and Metabolism [Nissen S. ed] pp 249-273. Academic Press, Inc. San Diego.

Reeds P.J., Hachey D.L., Patterson B.W., Motil K.J. & Klein P.D. 1992. VLDL apolipoprotein B-100, a potential indicator of the isotopic labeling of the hepatic protein synthetic precursor pool in humans: studies with multiple stable isotopically labeled amino acids. J. Nutr. 122:457-466.

Reeds P.J., Burrin D.G., Jahoor F., Wykes L., Henry J. & Frazer E.M. 1996. Enteral glutamate is almost completely metabolized in first pass by the gastrointestinal tract of infant pigs. Am. J. Physiol. 270: E413-418.

Reeds P.J., Berthold H.K., Boza J.J., Burrin D.G., Jahoor F., Jaksic T., Klein P.D., Keshen T., Miller R., Stoll B. & Wykes L.J. 1997. Integration of amino acid and carbon intermediary metabolism: studies with uniformly labeled tracers and mass isotopomer analysis. Eur. J. Pediratr.156: S50-S58.

Reeds P.J., Burrin D.G., Stoll B. & van Goudoever J.B. 1999. Consequences and regulation of gut metabolism. In: VIIIth International symposium on Protein Metabolism and Nutrition. pp127-153. [Lobley G.E., White A. & Macrae J.C., eds]. Wageningen Publisher, Wageningen, Pays-Bas.

Reeds P.J. & Burrin D.G. 2001. Glutamine and the bowel. J. Nutr. 131: 2505S-2508S.

Rémond D., Chaise J.P., Delval E. & Poncet C. 1993. Net transfer of urea and ammonia across the ruminal wall of sheep. J. Anim. Sci. 71: 2785-2792.

Rémond D., Meschy F. & Boivin R. 1996. Metabolites; water and mineral exchanges across the rumen wall: mechanisms and regulation. Ann. Zoot. 45: 97-119.

Rémond D., Ortigues-Marty I., Isserty A., and Lefaivre J. 1998. Technical note: measuring portal blood flow in sheep using an ultrasonic transit time flow probe. J. Anim. Sci. 76:2712-2716.

Rémond D., Bernard L., & Poncet C. 2000a. Amino acid flux in ruminal and gastric veins of sheep : effects of ruminal and omasal injections of free amino acids and carnosine. J. Anim. Sci. 78:158-166.

Rémond D., Bernard L., & Poncet C. 2000b. free and peptide amino acid net flux across therumen and the mesenteric- and portal-drained viscera of sheep. J. Anim. Sci. 78: 1960-1972.

Rémond D., Bernard L., Chauveau B., Nozière P., & Poncet C. 2003. Digestion and nutrient net fluxes across the rumen and the mesenteric- and portal- drained viscera in sheep fed with fresh forage twice daily : net balance and dynamic aspects. Br. J. Nutr. 89: 649-666.

Rémond D., Bernard L., Savary-Auzeloux I. & Nozière P. 2008. Partitioning of nutrient fluxes across the portal-drained viscera in sheep feed twice daily : effect of dietary protein degradability. Soumis à Brit. J. Nutr.

Rennie M.J., Bohé J., Smith K., Wackerhage H. & Greenhaff P. 2006. Branched-chain amino acids as fuels and anabolic signals in human muscle. J. Nutr. 136:264S-268S.

Rerat A., Simoes-Nunes C., Mendy F., Vaissade P. et Vaugelade P. 1992. Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anesthetized pig. Br. J. Nutr. 68: 111-138.

Reynolds C. K., Tyrrell H. F., & Reynolds P. J. 1991. Effects of diet forage-to-concentrate ratio and intake on energy metabolism in growing beef heifers: whole body energy and nitrogen balance and visceral heat production. J. Nutr. 121: 994-1003.

Reynolds C. K., & Tyrrell H. F. 1991. Effects of mesenteric vein L-alanine infusion on liver metabolism in heifers fed on diets differing in forage:concentrate ratio. Br. J. Nutr. 66:437-450.

Reynolds C. K., Lapierre H., Tyrrell H. F., Elsasser T. H., Staples R. C., Gaudreau P., & Brazeau P. 1992a. Effects of growth hormones-releasing factor and feed intake on energy metabolism in growing beef steers : net nutrient metabolism by portal-drained viscera and liver. J. Anim. Sci. 70:752-763.

Reynolds C.K., Casper D.P., Harmon D.L. & Milton C.T. 1992b. Effect of CP and ME intake on visceral nutrient metabolism in beef steers. J. Anim. Sci. 70:315.

Reynolds C. K., Harmon D.L., Prior D.L. & Tyrrell H. F. 1994a. Effects of mesenteric vein L-alanine infusion on liver metabolism in heifers fed on diets differing in forage:concentrate ratio. J. Anim. Sci. 72:3196-3206.

Reynolds C. K. Harmon D. L. & Cecava M. J. 1994b. Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. J. Dairy. Sci. 77:2787-2808.

Reynolds C. K. 1995. Quantitative aspects of liver metabolism in ruminants. In: Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth, and reproduction: Proceedings of the 8th internation symposium on ruminant physiology. Pp.351-371. [Engelhardt W., Leonhard-Marek S., Breves G. & Giesecke D. eds]. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Allemagne.

Reynolds C.K., Cammell S.B., Humphries D.J., Beever D.E., Sutton J.D. & Newbold J.R. 2001. Effects of post-rumen starch infusion on milk production and energy metabolism in dairy cows. J. Dairy Sci. 84:2250-2259.

Reynolds C. K. 2002. Economics of visceral energy metabolism in ruminants: toll keeping or internal revenue service? J. Anim. Sci. 80:E74-E84.

Reynolds C.K. 2006. Splanchnic amino acid metabolism in ruminants Dans: Ruminant physiology : Digestion, metabolism and impact on gene expression, immunology and stress. pp 225-248 [Eds K Sejrsen, T Hvelplund & MO Nielsen] Wageningen Academic Publisher The Netherlands.

Rocha D.M., Faloona G.R. & Unger R.H. 1972. Glucagon-stimulatig activity of 20 amino acids in dogs. J. Clin. Invest. 51:2346-2351.

Rulquin H., Vérité R., Guinard-Flament J. 2001. Acides aminés digestibles dans l'intestin. Le système AADI et les recommandations d'apport pour la vache laitière. INRA Prod. Anim. 14 :265-274.

Ruot B. 2001. Synthèse des proteins de la reaction inflammatoire en réponse à l'infection. Determinisme de l'hypoalbuminémie. Thèse de Nutrition. Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé. Université d'Auvergne. Clermont-Ferrand, France.

Russell J. B., & Hespell R. B. 1981. Microbial rumen fermentation. J. Dairy. Sci. 64 : 1153-1169.

Russell J. B., O'Connor J. D., Fox D. G., Van Soest P. J., & Sniffen C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentations. J. Anim. Sci. 70: 3551-3561.

Samuels S.E., Taillandier D., Aurousseau E ., Cherel Y., Le Maho Y., Arnal M. & Attaix D. 1996. Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. Am. J. Physiol. 271:E232-238.

Sandek A. Krawielitzki K., Kowalczyk J., Kreienbring F., Gabel M., Zebrowska T. & Voigt J. 2001. Studies on N-metabolism in different gastrointestinal sections of sheep using the digesta exchange technique. 2. Passage of endogenous nitrogen. J. Anim. Feed. Sci. 10:605-618.

Sano H., Kajita M., and Fujita T. 2004. Effect of dietary protein intake on plasma leucine flux, protein synthesis, and degradation in sheep. Comp. Biochem. Phys. 139:163-168.

Sarraseca A., Milne E., Metcalf M. J., & Lobley G. E. 1998. Urea recycling in sheep: effects on intake. Br. J. Nutr. 79: 79-88.

Sauvant D. 2002 Cours 1ère année de physiologie comparée de la digestion et de la nutrition. Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Sauvant D. Perez J. M., & Tran G. 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des amtières premières destinées aux animaux d'elevage. INRA Editions, Paris, France.

Savary I. 1997. Effet des glucocorticoïdes sur le métabolisme protéique du rat au cours du vieillissement. Thèse. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. France

Savary I., Debras E., Dardevet D., Sornet C., Capitan P., Prugnaud J., Patureau Mirand P. & Grizard J. 1998. Effect of glucocorticoid excess on skeletal muscle and heart protein synthesis in adult and old rats. Brit. J. Nutr. 79 : 297-304.

Savary I., Debras E., Dardevet D., Rambourdin F., Vasson M.P., Obled C. & Grizard J. 2001. Evidence for an alteration of plasma and liver proteins response to dexamethasone in aging rats. Mech. Ageing Dev. 122:105-120.

Savary I.C., Hoskin S., Dennison, N., Lobley G., 2001. Lysine metabolism across the hindquarters of sheep; effect of intake on transfers from plasma and red blood cells. Brit. J. Nutr. 85: 565-573.

Savary-Auzeloux I., Majdoub L., Le Floc'h N. & Ortigues-Marty I. 2003a. Ryegrass-based diet and barley supplementation : partition of nitrogenous nutrients among splanchnic tissues and hind limb in finishing lambs. J. Anim. Sci. 81:3160-3173.

Savary-Auzeloux I., Majdoub L., LeFloc'H N. & Ortigues-Marty I. 2003b. Effects of intraruminal propionate supplementation on nitrogen utilisation by the portal-drained viscera, the liver and the hindlimb in lambs fed frozen rye grass. Br. J. Nutr. 90:939-952.

Savary-Auzeloux I., Hoskin S. O., & Lobley G. E. 2003c. Effect of intake on whole body plasma amino acid kinteics in sheep. Reprod. Nutr. Dev. 43:117-129.

Savary-Auzeloux I., Durand D., Gruffat D., Bauchard D., Ortigues-Marty I. 2008. Food restriction and refeeding in lambs influence muscle antioxydant status. Animal. 2:738-745.

Schliess F., Reinehr R. & Häussinger D. 2007. Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function. FEBS J. 274:5799-5803.

Schroeder G. F. & Titgemeyer E.C. 2008. Interaction between protein and energy supply on protéin utilization in growing cattle : a review. Livest. Sci. 114:1-10.

Seal C.J., Parker D.S. & Avery P.J. 1992. The effect of forage and forage-concentrate diets on rumen fermentation and metabolism of nutrients by the mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers. Br. J. Nutr. 67:355-370.

Seal C. J. & Reynolds C. K. 1993. Nutritional implications of gastrointestinal and liver metabolism in ruminants. Nutr. Res. Rev. 6:185-208.

Seal C. J., & Parker D. S. 1996. Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a forage diet: II. Ammonia, urea, amino acids, and peptides. J. Anim. Sci. 74:245-256.

Shah O.J., Antonetti D.A., Kimball S.R. & Jefferson L.S. 1999. Leucine, glutamine, and tyrosine reciprocally modulate the translation initiation factors eIF4F and eIF2B in perfused rat liver. J. Biol. Chem. 274:36168-36175.

Sinaud S. 1997. Régulation postprandiale de la synthèse protéique musculaire in vivo : effet d'une hyperinsulinémie transitoire. Thèse Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, Université Clermont Ferrand. France

Skjaerlund D. M., Mulvaney D. R., Mars R. H., Shroeder A. L., Stachiw M. A., Bergen W. G., & Merkel R. A. 1988. Measurement of protein turnover in skeletal muscle strips. J. Anim. Sci. 66:687-698.

Smith P. F., Gandolfi A. J., Krumdieck C. L., Putnam C. W., Zukoski III C. F., Davis W. M., & Brendel K. 1985. Dynamic organ culture of precision liver slices for in vitro toxicology. Life Sci. 36:1367-1375.

Stoll B., Burrin D. G., Henry J., Jahoor F., and Reeds P. J., 1997. Phenylalanine utilization by the gut and liver measured with intravenous and intragastric tracers in pigs. Am. J. Physiol. 273:G1208-G1217.

Stoll B., Burrin D.G., Henry J., Yu H., Jahoor F. & Reeds P.J. 1999a. Substrate oxidation by the portal drained viscera of fed piglets. Am. J. Physiol. 277:E168-E175.

Stoll B., Burrin D. G., Henry J. F., Jahoor F., and Reeds P. J., 1999b. Dietary and systemic phenylalanine utilization for muscosal and hepatic constitutive protein synthesis in pigs. Am. J. Physiol. 276:G49-G57.

Stoll B. & Burrin D.G. 2006. Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers. J. Anim. Sci. 84: E60-E72.

Storm E., & Orskov E. R. 1983. The nutritive value of rumen microorganisms in ruminant. I. Large-scale isolation and chemical composition of rumen microorganisms. Br. J. Nutr. 50: 463-470.

Surmacz C.A., Pösö A.R., Mortimore G.E. 1987. Regulation of lysosomal fusion during deprivation-induced autophagy in perfused rat liver. Biochem. J. 242: 453-8.

Suryawan A., O'Connor P.M.J., Bush J.A., Nguyen H.V. & Davis T.A. 2008. Differential regulation of protein synthesis by amino acids and insulin in peripheral and visceral tissues in neonatal pigs. Amino Acids. [Epub]

Tagari H. & Bergman E.N. 1978. Intestinal disappearance and portal blood appearance of amino acids in sheep. J. Nutr. 108,:790-803.

Tagari H., Webb K. Jr, Theurer B., Huber T., DeYoung D., Cuneo P., Santos J.E.P., Simas J., Sadik M., Alio A., Lozano O., Delgado-Elorduy A., Nussio L, Nussio C. & Santos F. 2004. Portal drained viscera flux, hepatic metabolism, and mammary uptake of free and peptide-bound amino acids and milk amino acid output in dairy cows fed diets containing corn grain steam flaked at 360 or steam rolled at 490 g/L. J. Dairy Sci. 87:413-430.

Takagi M., Yonezawa T., Haga S., Shingu H., Kobayashi Y., Takahashi T., Ohtani Y., Obara Y. & Katoh K. 2008. changes of activity and mRNA expression of urea cycle enzymes in the liver of developing Holstein calves. J. Anim. Sci. 86:1526-1532.

Takiguchi M. & Mori M. 1995. Transcriptional regulation of genes for ornithine cycle enzymes. Biochem. J. 312:649-659.

Tamminga S., Schulze H., Van Bruchem J., & Huisman J. 1995. The nutritional significance of endogenous N-losses along the gastro-intestinal tract of farm animals. Arch. Tierernach. 48:9-22.

Taniguchi K., Huntington G. B., & Glenn B. P. 1995. Net nutrient flux by visceral tissues of beef steers given abomasal and ruminal infusions of casein and starch. J. Anim. Sci. 73:236-249.

Tauveron I., Larbaud D., Champredon C., Debras E., Tesseraud S., Bayle G., Bonnet Y., Thiéblot P. & Grizard J. 1994. Effect of hyperinsulinemia and hyperaminoacidemia on muscle and liver protein synthesis in lactating goats. Am. J. Physiol. 267:E877-E885.

Tayek J.A & Katz J. 1996. Glucose production, recycling and gluconeogenesis in normals and diabetics: a mass isotopomer [U-13C] glucose study. Am. J. Physiol. 270:E709-717.

Teleni E., Annison E.F. & Lindsay D.B. 1986. Metabolism of valine and exchange of amino acids across the hind-limb muscles of fed and starved sheep. Aust. J. Biol. Sci. 39:379-393.

Tessari P., Zanetti M., Barazzoni R., Vettore M. & Michielan F. 1996. Mechanism of postprandial protein accretion in human skeletal muscle. J. Clin. Invest. 98:1361-1372.

Tesseraud S. 1991. Cotrol of protein metabolism in lactating and non-lactating goats. Assessment of the insulin and amino acid effects by using a new clamp technique. Thèse de Nutrition. Université Rennes-1, France.

Tesseraud S., Grizard J., Debras E., Papet I., Bonnet Y., Bayle G., Champredon C. 1993. Leucine metabolism in lactating and dry goats : effect of insulin and substrate availability. Am J. Physiol. 265:E402-E413.

Tesseraud S., Métayer S., Duchêne S., Bigot K., Grizard J. & Dupont J. 2007. Regulation of protein metabolism by insulin : value of different approaches and animal models. Dom. Anim. Endocrinol. 33:123-142.

Thalaker-Mercer A.E. Johnson C.A., Yarasheski K.E., Carnell N.S. & Campbell W.W. 2007. Nutrient ingestion, protein intake, and sex, but not age, affect the albumin synthesis rate in humans. J. Nutr. 137:1734-1740.

Thivierge M.C., Petitclerc D., Bernier J.F., Couture Y. & Lapierre H. 2002. Variations of mammary metabolism as the udder gradually fills with milk during a 12-h period following milking : leucine kinetics. 85:1839-1854

Theurer C.B., Huntington G.B., Huber J.T., Swingle R.S. & Moore J.A. 2002. Net absorption and utilization of nitrogenous compounds across ruminal, intestinal, and hepatic tissues of growing beef steers fed dry-rolled or steam-flaked sorghum grain. J. Anim. Sci. 80:525-532.

Tillman J. B., Dhabi J. M., Mote P. L., Walford R. L., & Spindler S. R. 1996. Dietary calorie restiction in mice induces carbamyl phosphate synthestase I gene transcription tisse specifically. J. Biol. Chem. 271:3500-3506.

Valkeners D., Thewis A., Amant S., & Beckers Y. 2006. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls fed a corn-silage-based diet. J. Anim. Sci. 84:877-885.

Van Bruchem J., Voigt J., Lammers-Wienhoven T. S., Schonhusen U., Ketelaars J. J., & Tamminga S. 1997. Secretion and reabsorption of endogenous protein along the small intestine of shee: Estimates derived from N-15 dilution of plasma non-protein-N. Br. J. Nutr. 77:273-286.

Van der Meulen J., Bakker J.G., Smits B., de Visser H., 1997. Effects of source of starch on net portal flux of glucose, lactate, volatile fatty cids and amino acids in the pig. Br. J. Nutr., 78, 533-544.

Van der Schoor S.R., Van Goudoever J.B., Stoll B., Henry J.F., Rosenberger J.R., Burrin D.G. & Reeds P.J. 2001. The pattern of intestinal substrate oxidation is altered by protein restriction in pigs. Gastroenterology 121:1167-1175.

Van Eijk H.M.H. & Deutz N.E.P. 2003. Plasma protein synthesis measurements using a proteomics strategy. J. Nutr. 133:2084S-2089S.

Van Goudoever J. B., Stoll B., Henry, J. F., Burrin D. G., & Reeds P. J. 2000 Adaptative regulation of intestinal lysine metabolism. Proc Natl Acad Sci USA. 97:11620-11625.

Vary T. C., & Kimball S. R. 1992. regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation ans sepsis. Am. J. Physiol. 262:C445-C452.

Veenhuizen J. J., Russell R. W., & Young J. W. 1988. Kinetics of metabolism of glucose, propionate and CO2 in steers as affected by injecting phlorizin and feeding propionate. J. Nutr. 118: 1366-1375.

Velez J. C., & Donkin S. S. 2005. Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. J. Dairy Sci. 88:2938-2948.

Velle W, Sjaastad OV, Aulie A, Grønset D, Feigenwinter K, Framstad T. 1997. Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows. J. Dairy Sci. 80: 3325-3332.

Vernet J., Nozière P., Sauvant D., Léger S. & Ortigues-Marty I. 2005. Regulation of hepatic blood flow by feeding conditions in sheep : a meta-analysis. 11th Seminar of the Sub-Nutrition FAI-CIHEAM on sheep and goat nutrition (8-10 sept). Catalia, Italie.

Veysset P., Agabriel J., Ingrand S., Bébin D., Constant I., Lherm M., & Dauphin L. 2007. La conduite de l'alimentation en élevage bovin allaitant : analyse des écarts entre partiques et recommendations. In : 14ème Encontres Recherches Ruminants. pp229-232. [Institut de l'Elevage – INRA eds.]. Paris, France.

Visscher M. B., and Johnson J. A. 1953 The Fick principle: analysis of potential errors in its conventional application. J. Appl. Physiol. 5:635-638.

Volpi E., Lucidi P., Cruciani G., Monacchia F., Reboldi G., Brunetti P., Bolli G.B. & De Feo P. 1996. Contribution of amino acids and insulin to protein anabolism during meal absorption. Diabetes 45:1245-1252.

Wahren J., Efendić S., Luft R., Hagenfeldt L., Björkman O. & Felig P. 1977. Influence of somatostatin on splanchnic glucose metabolism in postabsorptive and 60-hour fasted humans. J. Clin. Invest. 59: 299-307.

Wahren J., Wennlund A., Nilsson L.H. & Felig P. 1981. Influence of hyperthyroidism on splanchnic exchange of glucose and gluconeogenic precursors. J. Clin. Invest. 67: 1056-1063.

Wahren J. & Ekberg K. 2007. Splanchnic regulation of glucose production. Ann Rev Nutr 27: 329-345.

Waterlow J. C., & Stephen J. M. L. 1967. The measurement of total lysine turnover in the rat by intravenous infusion of L-[U14C]Lysine. Clin. Sci. 33:489-506.

Waterlow J.C., Garlick P.J. & Millward D.J. 1978. Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body. North Holland Company, Amsterdam New York Oxford. Pp 804.

Watt P. W., Lindsay Y., Scrimgeour C. M., Chien P. A. F., Gibson J. N. A. Taylor D. J., and Rennie M. J. 1991. Isolation of aminoacyl-tRNA and its labelling with stable-isotope tracers: Use in studies of human tissue protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:5892-5896.

Wester T. J., Lobley G. E., Birnie L. M., & Lomax M. A. 2000. Insulin stimulates phenylalanine uptake across the hind limb in fed lambs. J. Nutr. 130:608-611.

Wester T. J., Lobley G. E., Birnie L. M., Crompton L. A., Brown S., Buchan V., Calder A. G., Milne E., & Lomax M. A. 2004. Effect of plasma insulin and branched-chain

amino acids on skeletal muscle protein synthesis in fasted lambs. Br. J. Nutr. 92:401-409.

Wester T. J., Weiggraaf K., and Forsyth S. F. 2006. Measurement of whole body protein turnover in the adult cat (Felis catus). FASEB. J. 20:A1045

Wilson F.A., Suryawan A., Orellana R.A., Nguyen H.V., Jeyapalan A.S., Gazzaneo M.C. & Davis T.A. 2008. Fed levels of amino acids are required for the somatotropin-induced increase in muscle protein synthesis. Am. J. Physiol. 295:E876-E883.

Wilson S., MacRae J.C. & Buttery P.J. 1983. Glucose production and utilization in non-pregnant, pregnant and lactating ewes. Brit. J. Nutr. 50:303-316.

Windmueller H. G., & Spaeth A. E. 1976. Metabolism of absorbed aspartate, asparagine and arginine by the rat small intestine in vivo. Arch. Biochem. Biophys. 175:670-676.

Windmueller H. G., & Spaeth A. E. 1978. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. J. Biol. Chem. 253: 69-76.

Wolff J.E. & Bergman E.N. 1972. Gluconeogenesis from plasma amino acids in fed sheep. Am J. Physiol. 223:455-460.

Wray-Cahen D., Metcalf J.A., Backwell F.R., Bequette B.J., Brown D.S., Sutton J.D. & Lobley G.E. 1997. Hepatic response to increased exogenous supply of plasma amino acids by infusion into the mesenteric vein of Holstein-Friesian cows in late gestation. Br. J. Nutr. 78: 913-30

Wray-Cahen D., Nguyen H.V., Burrin D.G., Beckett P.R., Fiorotto M.L., Reeds P.J., Wester T.J. & Davis T.A. 1998. Response of skeletal muscle protein synthesis to insulin in suckling pigs decreases with development. Am. J. Physiol. 275: E602-E609.

Yoshizawa F., Hirayama S., Sekizawa H., Nagazawa T., Sugahara K. 2002. Oral administration of leucine stimulates phosphorylation of 4E-BP1 and S6K1 in skeletal muscle but not in liver of diabetic rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 48:59-64.

Yoshizawa F. 2004. Regulaion of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. Biochem. Biophys. Res. Com. 313:417-422.

Young C. R., Yu Y. M. & Krempf M. 1991. Protein and amino acid turnover using the stable isotopes 15N, 13C and 2H as probes. In: New Techniques in Nutritional Research pp. 17-72. [Whitehead R. G., Prentice A. eds.]. Academic Press, San Diego, USA.

Yu F., Bruce L.A., Calder A.G., Milne E., Coop R.L., Jackson F., Horgan G.W. & MacRae J.C. 2000. Subclinical infection with the nematode Trichostrongylus Culubriformis increases gastrointestinal tract leucine metabolism and reduces availability of leucine for other tissues. J. Anim. Sci. 78:380-390.

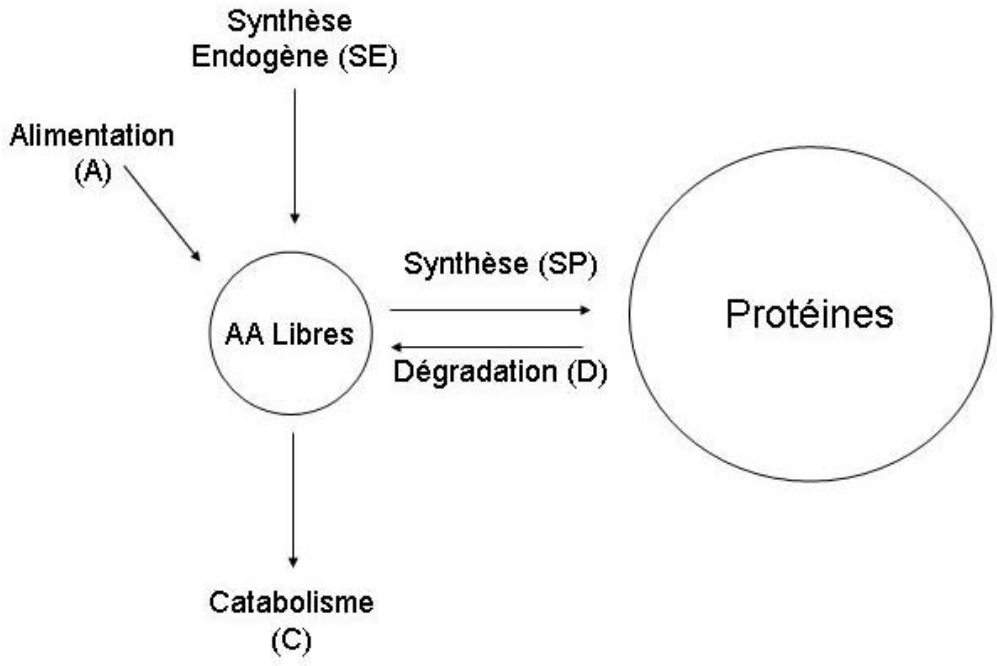
Annexes

Annexe n° 1

Mesure du flux d'un acide aminé traceur au niveau du corps entier.

Grâce à l'utilisation du modèle à deux compartiments (Figure 50), La relation (1) est obtenue.

Figure 50 Représentation schématique du modèle à deux compartiments et mesure du flux corporel d'un acide aminé (Cayol, 1995).



(1)

$$F = SP + C = D + A + SE$$

Par la perfusion continue d'un AA marqué (^{13}C pour la mesure de l'oxydation) à dose traceuse, il est possible de mesurer certaines des composantes de la relation (1).

1. Mesure du flux traceur (*F*)

Le flux traceur *F*, également désigné sous le terme de « irreversible loss rate » (ILR) en anglais, représente la vitesse d'utilisation (ou disparition) de l'AA perfusé au niveau corporel. Il tient compte de *Vi*, la vitesse de perfusion de l'AA marqué, de *Ei*, l'enrichissement initial de cet AA dans la solution perfusée ainsi que de *Eprel*,

l'enrichissement de l'AA présent dans le sang ou le plasma au niveau du site de prélèvement choisi, lorsque le plateau d'enrichissement est atteint (E*prel* correspond à l'enrichissement en AA dans le compartiment précurseur choisi) (Equation 2).

$$F = Vi \times (\frac{Ei}{Eprel} - 1) \quad (2)$$

2. Mesure de l'oxydation (*C*)

Mesure avec prélèvement d'air expiré :

La mesure du flux d'oxydation de l'AA ^{13}C perfusé nécessite la mesure de l'enrichissement du CO_2 expiré (ECO_2) ainsi que la quantité de CO_2 expiré (VCO_2) (en mmol/h) (Giordano et coll., 1996) (Equation 3). Le CO_2 marqué produit par oxydation de l'AA injecté est partiellement piégé par l'organisme, c'est pourquoi un coefficient *c* (en moyenne égal à 0,8 dans les études chez l'Homme, mais variable entre 0,7 et 0,94 ; Hoerr et coll., 1989)) doit être appliqué au calcul (Issekutz et coll., 1968). La valeur de *c* peut en effet différer d'un modèle animal à l'autre, d'une situation physiologique à l'autre ou selon l'état nutritionnel (Guillet et coll., 2004; Young et coll., 1991 dans Cayol, 1995). Chez les ruminants (chèvres), *c* est égal à 0,69 chez les chèvres en lactation et à 0,87 chez les chèvres taries (Tesseraud, 1991), prouvant ainsi que ce facteur *c* est également variable selon l'état physiologique chez les ruminants.

$$C = \frac{ECO_2 \times VCO_2}{Eprel \times c} \quad (3)$$

avec

- *ECO2* : enrichissement du CO2 expiré
- *VCO2* : volume de CO2 expiré
- *Eprel* : enrichissement en AA dans le compartiment précurseur de l'oxydation
- *c* défini dans le paragraphe précédent

<u>Mesure de ECO_2</u> : ECO_2 est généralement mesuré chez l'Homme en recueillant un échantillon de l'air expiré. Chez l'animal, la récupération d'échantillon d'air expiré est plus délicate du fait des mouvements des animaux mais a toutefois été réalisée dans diverses espèces : Chevalier et coll. 1984; Wester et coll. 2006 avec les chats; Layman and Wolfe,

1987 chez le chien; Sano et coll., 2004 chez le mouton; Tesseraud, 1991 chez la chèvre et Lapierre et coll. 2002 chez la vache.

Mesure de la quantité de CO_2 expiré (VCO_2), chez l'humain des systèmes de collection de l'air sur une longue période sont employés et permettent d'enregistrer les volumes de CO_2 expirés (avec une collecte simultanée de CO_2 pour les mesures d'enrichissment isotopique). Ceci a également été réalisé chez les animaux bien que la collecte de gaz sur des temps longs soit encore plus délicate que le prélèvement ponctuel d'air expiré nécessaire pour la mesure de l'enrichissement isotopique.

Mesure sans prélèvement d'air expiré :

Chez des animaux en général ou chez l'homme dans certaines situations particulières (nouveaux nés, problèmes respiratoires ….) la collecte de gaz peut être plus délicate et lourde à réaliser et une méthode alternative a été mise en place. Elle consiste à mesurer la production de CO_2 par une perfusion de bicarbonate de sodium ^{13}C. Cette perfusion est réalisée lorsque les individus ou animaux sont adaptés au régime ou traitement que l'on veut tester (généralement la veille du jour de mesure du flux d'AA traceur) (Lapierre et coll ., 1999 et 2001). Pour éviter les prélèvements de gaz, une mesure de l'enrichissement en CO_2 dans le sang et non plus dans l'air expiré est également réalisée (Lobley et coll, 2003; Dangin et coll., 1999).

La production totale de CO_2 est calculée lors de la perfusion de bicarbonate comme suit (Equation 4).

$$PCO_2 = ViHCO_3 \times \left(\frac{EiHCO_3}{EiCO_2H} - 1\right) \quad (4)$$

avec :

- $ViHCO_3$: vitesse de perfusion des bicarbonates marqués
- $EiHCO_3$: enrichissement de la solution de bicarbonate infusée
- $EiCO_2H$: enrichissement en CO_2 dans le sang (en général artériel) obtenu lors de la perfusion de bicarbonates

L'oxydation de l'AA ^{13}C peut ensuite être calculée le jour de la perfusion de l'AA :

$$AA^{13}C.Oxy = PCO_2 \text{ x } EICO_2AA \quad (5)$$

Avec :

- $EICO_2AA$ = enrichissement en CO_2 dans le sang (en général artériel) obtenu lors de la perfusion de l'AA ^{13}C

La proportion de l'AA qui est oxydée est donc déterminée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ AA.Oxy} = \left(\frac{\text{AA}^{13}\text{C.Oxy}}{Vi \times Ei}\right) \quad (6)$$

Avec *Vi* et *Ei* définis dans l'Equation (1) comme *Vi* : la vitesse de perfusion de l'AA marqué et *Ei* l'enrichissement de l'AA dans la solution perfusée.

Si on fait l'hypothèse que l'animal ne fait pas la différence entre les $AA^{12}C$ et les $AA^{13}C$ et que toute la leucine marquée perfusée l'est en excès et qu'une quantité de leucine correspondante sera oxydée dans l'animal (Lobley et coll., 2003), C (ou catabolisme irréversible de l'AA corporel) est calculé selon l'équation suivante :

$$C = \%\text{AA.Oxy x (F + Vi)} - \text{Vi} \quad (7)$$

Avec *F* et *Vi* définis dans l'Equation (2).

3. Calcul de la synthèse protéique (S)

D'après l'Equation (1), $SP = F - C$. Comme F et C peuvent être mesurés, SP peut donc être calculée par différence.

4. Calcul de la dégradation protéique (D)

D'après l'Equation (1), $D = F - A - SE$

Si un AA essentiel est utilisé pour la mesure de F, SE est égal à zéro car aucune synthèse *de novo* d'un AA essentiel n'est possible.

La difficulté réside dans l'estimation de A. Dans le cas des monogastriques, A = 0 et donc D = F si l'animal est à jeûn ou en période post-absorptive. Par contre, A doit être estimé chez le monogastrique en période post-prandiale par une estimation de l'apport de l'AA d'intérêt dans l'ingéré. Par contre, dans le cas des ruminants, l'estimation de A est complexe à cause des fermentations ruminales qui modifient le profil en AA mais aussi à cause de la vidange du rumen qui se fait en continu (Tesseraud, 1991). Cette valeur de A peut être déduite grâce à l'utilisation des données PDI des aliments fournis aux animaux (si possibles les valeurs PDI de l'AA perfusé) ingérées par jour par l'animal. Une autre approche consiste à utiliser l'apparition de l'AA d'intérêt en veine porte pour estimer A. Cependant, le sang en veine porte porte n'est pas toujours accessible (nécessité d'un cathéter) et la quantité d'AA utilisée par l'intestin n'est pas prise en compte alors qu'elle peut être importante pour certains AA comme la leucine (Tesseraud, 1991; Lobley et coll., 2003).

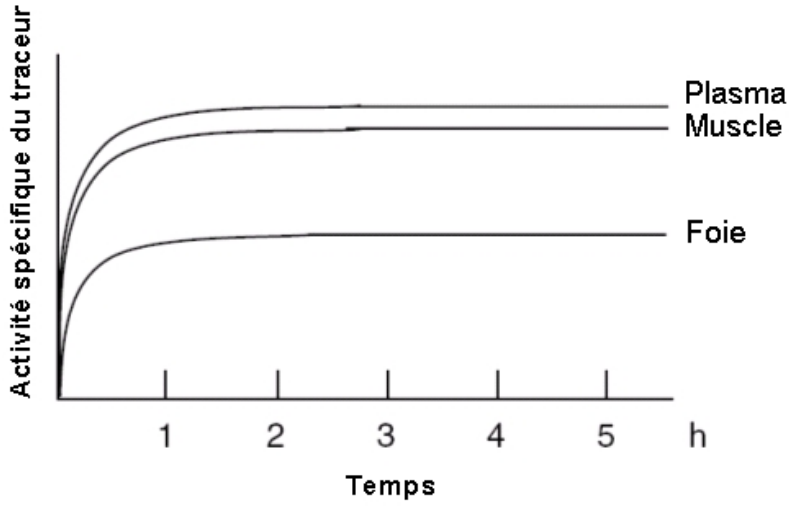
Annexe n° 2

Difficulté du choix du compartiment précurseur de la synthèse protéique lors de l'utilisation d'AA marqués perfusés à dose traceuse

A) Lors de la mesure des flux traceurs d'AA au niveau du corps entier

Lors du calcul du flux d'AA traceur au niveau du corps entier, le choix du compartiment d'AA libres choisi pour mesurer le flux est essentiel. Ce compartiment doit être représentatif à la fois du compartiment précurseur de la synthèse protéique mais aussi de l'oxydation. De plus, il doit également être représentatif d'une « moyenne » de l'ensemble des compartiments précurseurs de chaque tissu et organe. Or comme le montre la Figure 51, l'activité spécifique (ou enrichissement) du traceur dans les tissus est variable entre tissus et toujours inférieure à celle du plasma ou du sang à cause de la dilution des AA marqués infusés par les AA non marqués issus de la protéolyse. Plus un tissu aura un turnover protéique intense, plus le décallage entre l'enrichissement dans le tissu et le plasma sera grand. (Cayol, 1995, d'après Waterlow et coll., 1978; Attaix et coll., 2005). Le rapport entre l'activité spécifique (ou enrichissement) dans le plasma et le muscle est de l'ordre de 0,7 à 0,9 car le turnover protéique dans le muscle est relativement faible. Par contre, ce ratio n'est plus que de 0,3 à 0,6 dans le foie et le tube digestif (Figure 51). En général, le compartiment précurseur utilisé pour les études de flux traceur au niveau du corps entier est le plasma artériel ou, si le sang artériel n'est pas accessible, le plasma veineux prélevé en amont ou loin du site de perfusion (Lapierre et coll., 2002; Bequette et coll., 1996b).

Figure 51 Représentation schématique de l'activité spécifique du traceur suivant l'administration d'une perfusion d'AA marqué (D'après Attaix et coll., 2005)



L'utilisation de l'activité spécifique (ou enrichissement) des AA dans le plasma a donc des conséquences importantes sur les flux de dégradation et de synthèse qui sont tous deux sous-estimés. Lorsque l'AA traceur utilisé est un AA à chaine ramifiée (leucine, valine ou isoleucine), une correction partielle peut être apportée en assimilant le compartiment précurseur de l'oxydation à l'activité spécifique de l'α-cétoacide correspondant. En effet, dans le cas du KIC (ketoisocaproate, cétoacide de la leucine), il a été montré que l'enrichissement du KIC à l'état post absorptif était proche de l'enrichissement de la leucyl-ARNt musculaire (Watt et coll., 1991 dans Cayol, 1995). Cependant, ceci n'est pas vrai pour le foie où le KIC surestime de 60% l'enrichissement du leucyl-ARNt (Watt et coll., 1991).

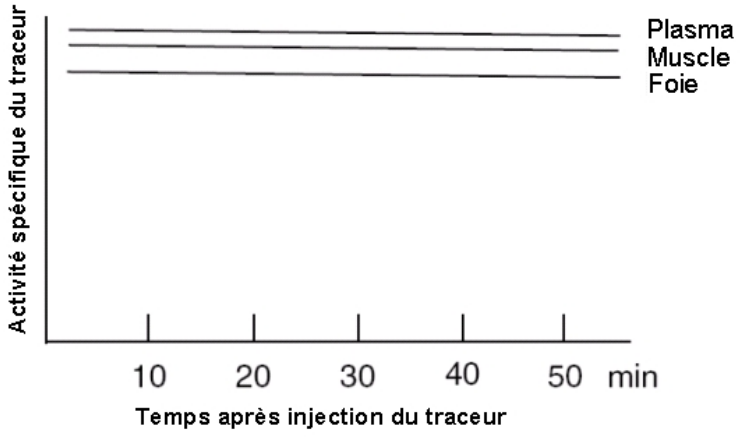
B) Lors de la mesure des flux traceurs d'AA au d'un tissu ou groupe de tissus particuliers : cas particulier du foie

Le choix du compartiment précurseur lors de la mesure du métabolisme protéique au niveau tissulaire est également essentiel et ce point a été particulièrement discuté dans le cas du foie. Cependant, et à la différence des études au niveau du corps entier, il est possible d'adapter le compartiment précurseur selon le tissu étudié. Le compartiment précurseur utilisé réellement pour la synthèse protéique est, comme précisé précédemment, les AA-ARNt (Watt et coll., 1991). Cependant, le compartiment n'est pas toujours directement accessible et est souvent techniquement délicat à mesurer. Toute autre mesure d'activité spécifique ou d'enrichissement (ex : AA intracellulaires, ou AA/métabolites prélevés dans différents sites sanguins) est donc nécessairement une estimation de ce compartiment précurseur. Le fait que le foie soit irrigué par du sang porte et du sang artériel ajoute de la complexité à cette mesure. Le foie est également un tissu présentant une zonation spatiale (avec une zonation des enzymes liées au catabolisme des AA, du métabolisme de l'ammoniaque et de l'urée et de la synthèse des protéines plasmatiques (Lobley et coll., 2000)). Ceci veut donc dire que le compartiment précurseur de la synthèse des protéines exportées et endogènes peut être différent (ainsi qu'entre les protéines exportées) (discuté par Cayol et coll., 1996). De plus, l'activité spécifique du compartiment précurseur peut varier en fonction de l'état nutritionnel, en particulier parce que des AA non marqués induisent une dilution isotopique qui affecte le calcul de la synthèse protéique hépatique dans le foie. Pour résumer, il n'y a donc pas un consensus clair sur un compartiment précurseur approprié pour la mesure de la synthèse des protéines hépatiques.

Cependant, et malgré ces difficultés, plusieurs auteurs ont comparé les enrichissements ou activités spécifiques en AA-ARNt avec les activités spécifiques (ou enrichissements) en AA dans le du plasma artériel, portal, issu d'une veine hépatique et dans l'apoprotéine B100 (ApoB-100) des VLDL afin de déterminer quel est le compartiment précurseur le plus proche des AA-ARNt. L'ApoB-100 est utilisée par de nombreux auteurs comme un indicateur fiable du compartiment précurseur (Reeds et coll., 1992; Cayol et coll., 1996; Connell et coll., 1997). Les AA libres en veine sus hépatiques sont également utilisés dans les études sur animaux cathétérisés car il a été montré que l'enrichissement dans ce compartiment était proche de celui des AA intracellulaires hépatiques et de l'ApoB-100 (Connell et coll., 1997; Raggio et coll., 2007; Barazzoni et coll., 1999). Cependant, l'ApoB-100 peut, en particulier à l'état nourri chez les monogastriques, incorporer plus d'AA d'origine portale qu'artérielle, ce qui suggère donc que l'enrichissement en ApoB-100 pourrait représenter divers compartiments précurseurs selon l'état nutritionnel (Stoll et coll., 1997 et 1998). Enfin, Ahlman et coll (2001) montrent que l'enrichissement artériel en ketoisocaproate (KIC) pourrait être un marqueur de l'enrichissement du compartiment précurseur de la synthèse des protéines hépatiques chez le monogastrique. Cependant, le fait que le KIC soit émis par les muscles en grande quantité rend son utilisation comme précurseur de la synthèse des protéines hépatique difficile à justifier (Cayol et coll., 1996; Baumann et coll., 1994; Connell et coll., 1997).

Pour contourner ces problèmes de mesure de l'enrichissement du compartiment précurseur de la synthèse protéique, certains auteurs ont utilisé la technique de surcharge (Figure 52) qui homogénéise les enrichissements dans les compartiments précurseurs (du foie par exemple), incluant les AA-ARNt (Caso et coll., 2000; Barle et coll., 1997). L'impact de cette surcharge sur la synthèse protéique musculaire est suspecté (Cayol et coll., 1995). Cependant, des études de Caso et coll. (2002) et Barle et coll. (1997) montrent que la vitesse de synthèse fractionnaire de l'albumine n'est pas différente suite à une perfusion ou surcharge de traceur.

Figure 52 Représentation schématique de l'activité spécifique du traceur suivant l'administration d'une surcharge d'AA marqué (D'après Attaix et coll., 2005)



Annexe n° 3

Calcul des bilans nets en acides aminés dans les tissus splanchniques : Tissus drainés par la veine porte, foie et tissus splanchniques

$[AA]_x$: la concentration plasmatique en acides aminés dans le vaisseau x

D_x : le débit plasmatique dans le vaisseau x

x peut correspondre à : A = Artère

AH = Artère hépatique

VP = Veine porte

VSH = Veine sus-hépatique

Tissus drainés par la veine porte (TDVP) :

Flux afférent TDVP = $[AA]_A$ x D_{VP}

Flux efférent TDVP = $[AA]_{VP}$ x D_{VP}

→ Bilan net TDVP = Flux efférent TDVP – Flux afférent TDVP

= $([AA]_{VP} - [AA]_A)$ x D_{VP}

Foie :

Flux afférent Foie = $([AA]_{VP}$ x $D_{VP}) + ([AA]_A$ x $D_{AH})$

Flux efférent Foie = $[AA]_{VSH}$ x D_{VSH}

→ Bilan net Foie = $[AA]_{VSH}$ x D_{VSH} - $([AA]_{VP}$ x $D_{VP})$ - $([AA]_A$ x $D_{AH})$

Tissus splanchniques (TS)

Flux afférent TSP = $[AA]_A$ x D_{VSH}

Flux efferent TSP = $[AA]_{VSH}$ x D_{VSH}

→ Bilan net TSP = $([AA]_{VSH} - [AA]_A)$ x D_{VSH}

Si seul le débit en veine porte est connu, il est possible d'accéder aux autres débits par la relation :

$D_A = k \times D_{VP}$

Et $D_{VSH} = D_{VP} + D_A$

$= D_{VP} (1 + k)$

Avec k = 0.0526, d'après Barnes et coll.(1986).

Le débit en artère hépatique est proportionnel au débit en veine porte et la proportion reste constante lorsque la matière sèche ingérée est augmentée.

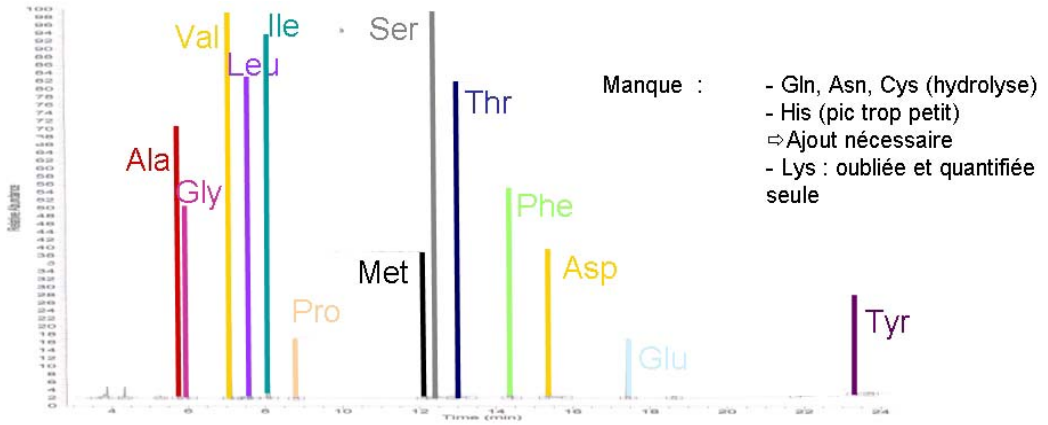
Annexe n° 4

Détermination de la concentration en acides aminés (AA) de plasma (ovin) par la technique de dilution isotopique

Principe de mesure

Le principe de cette technique repose sur l'ajout d'une quantité constante d'AA marqués (sur le ou les ^{13}C) à des quantités variables d'AA non marqués. Pour déterminer la concentration en AA d'une solution inconnue, la réalisation d'une gamme est nécessaire et est obtenue par la réalisation de points de gammes dans lesquels des concentrations croissantes en acides aminés non marqués sont ajoutés une quantité fixe d'AA marqués (principe du standard interne). Ceci aura pour conséquence de modifier le rapport carbone 13 / (carbone 12 + carbone 13)), rapport isotopique, selon la quantité d'AA non marqués présents dans l'échantillon. Chaque point de gamme est ensuite analysé par Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse (GC-MS, spectrométrie de masse organique). Avant séparation par GC, les AA sont préalablement dérivés pour les rendre volatils. Différents dérivés peuvent être employés mais suivant les recommandations de Calder et coll. (1999), nous avons choisi le tert-butyldimethylsilyl (tBDMS). Les AA marqués utilisés comme standards internes au cours de ce travail de thèse proviennent d'un hydrolysat d'algues cultivées dans une atmosphère contenant du $^{13}CO_2$. Les AA utilisés sont donc marqués uniformément sur tous les carbones (AA [U-^{13}C]).

Figure 53 Exemple de chromatogramme obtenu en chromatographie gazeuse couplé à la spéctrométrie de masse (GC-MS) sur un échantillon de plasma ovin



Les AA dans les échantillons de plasma ou des gammes sont séparés par chromatographie selon leurs temps de rétention caractéristiques et détectés par le spectromètre de masse (Figure 53). L'analyse en mode SIM (Selected Ion Monitoring : analyse sur des ions sélectionnés) permet de focaliser le spectromètre de masse sur des ions pré-déterminés et caractéristiques des acides aminés d'intérêt (Tableau 14). Pour l'alanine par exemple, deux pics sont obtenus pour les 2 ions caractéristiques, le premier étant spécifique de l'AA marqué sur les carbones (^{13}C) (ion 263) et le second de l'AA non marqué (ion 260) (Figure 54). Les aires des deux pics étant déterminées, le rapport isotopique est calculé pour chaque point de gamme. Ainsi, une droite de régression de gamme peut être réalisée, associant un rapport isotopique à une concentration en AA (Figure 55). Une droite de régression identique est réalisée pour chaque AA (Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Ser, Thr, Phe, Asp, Glu, Tyr, Gln, Asn, Cys, His, Lys).

Tableau 14 Liste des ions caractéristiques des différents acides aminés ^{12}C et des mêmes acides aminés [U-^{13}C] qui ont été quantifié par spectrométrie de masse.

Acide Aminé	Ion spécifique ^{12}C (m/z)	Ion spécifique ^{13}C (m/z)
Alanine	260	263
Aspartate	302	304
Glutamate	432	437
Glycine	246	248
Histidine	440	446
Isoleucine	274	279
Leucine	274	279
Méthionine	218	222
Phénylalanine	234	242
Proline	286	291
Sérine	390	393
Thréonine	404	408
Tyrosine	302	304
Valine	288	293

Au cours des prélèvements d'échantillons sanguins en artère, veine porte et veine sus-hépatique, effectués sur les agneaux, une quantité de solution d'AA provenant des algues marquées identique à celle utilisée pour la réalisation des points de gamme est rajoutée dans le plasma. La détermination du rapport isotopique pour chaque échantillon et chaque acide

aminé peut ainsi être déterminée. La valeur du rapport obtenu pour chaque AA est confrontée aux gammes afin de déterminer la concentration en chaque acide aminé dans l'échantillon plasmatique.

Figure 54 Dilution isotopique : mesure du ratio entre l'ion m et m+3 exemple de l'alanine)

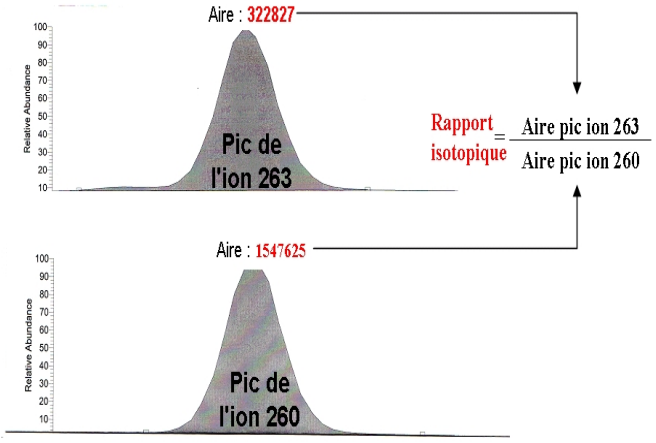
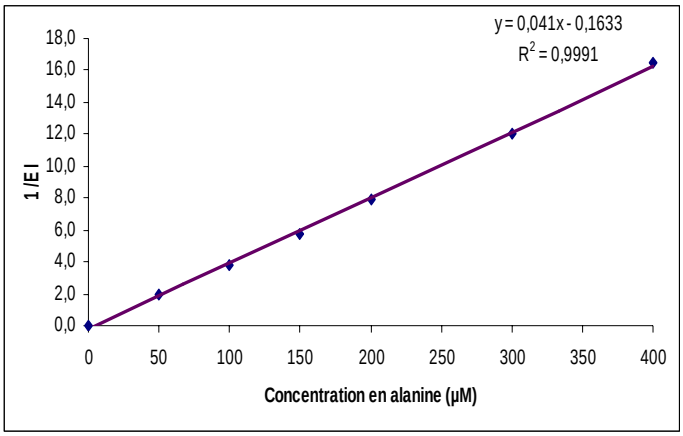


Figure 55 Droite de régression (gamme) associant un rapoort isotopique à une concentration en AA



Conséquences sur la mesure de la concentration en phénylalanine et leucine dans les échantillons plasmatiques

Une dernière remarque concerne l'infusion simultanée de traceurs dans cette expérimentation. Les ions étant différents entre la leucine [1-^{13}C] infusée et la phénylalanine [$^{2}H_5$] et ceux dosés pour la détermination des concentrations (molécules [U-^{13}C]), une erreur dans la mesure des concentrations n'est pas possible de ce point de vue. Cependant, du fait de l'injection des traceurs (AA marqués) chez les agneaux et la méthode de mesure de concentration utilisée (ne mesurant que les AA non marqués), les concentrations en phénylalanine mesurées par dilution isotopiques ne mesurent pas les quantités de phénylalanine et leucine marquées injectées au cours de la perfusion. Les concentrations en Leucine et Phénylalanine plasmatiques utilisées dans les ***Publications 1 et 2*** correspondent à la leucine et phénylalanine marquées + non marquées présentes dans les échantillons plasmatiques.

La maîtrise de l'efficacité de production des ruminants est un enjeu majeur dans le contexte international de production de viande. Une amélioration des recommandations alimentaires et notamment l'équilibre entre PDI et EM dans la ration, pourrait permettre de favoriser l'efficacité d'utilisation de l'azote par les animaux. Les tissus de l'aire splanchnique (tissus drainés par la veine porte + foie) sont des compétiteurs vis à vis des muscles pour l'utilisation d'azote car ils ne représentent que 6 % des protéines corporelles mais 35 % de la synthèse protéique corporelle.

Le premier objectif de thèse était de connaître l'impact d'un déséquilibre d'apport azoté (N) ou énergétique (E) relativement à un régime couvrant les besoins des animaux (T) sur l'efficacité d'utilisation des acides aminés (AA) au niveau splanchnique et corporel chez des agneaux en croissance. Le régime N s'est traduit par une rétention azotée et une croissance des animaux peu ou pas modifiée relativement à T associée à une augmentation de l'efficacité d'utilisation de l'azote. Au contraire, le régime E s'est traduit par une baisse de rétention azotée et de croissance des animaux. Le second objectif était de connaître les voies métaboliques à l'origine des modifications de prélèvements hépatiques d'AA. Pour cela des animaux cathétérisés et des infusions de traceurs ont permis de mesurer des bilans nets hépatique et des flux traceurs en AA. Avec le régime N, une baisse de l'utilisation nette des AA dans le foie, liée à une baisse probable du catabolisme hépatique de certains AA associée à un maintien de la synthèse des protéines exportées permettent une épargne globale des AA. A l'inverse, dans le régime E, une augmentation de l'utilisation des AA pour la néoglucogenèse et du catabolisme des AA dans le foie (avec augmentation de l'uréogenèse) peuvent expliquer la baisse de rétention azotée.

Le dernier objectif était de mettre en évidence certains facteurs de régulation expliquant les adaptations métaboliques constatées chez les animaux nourris avec les régimes N et E. Une étude sur explants de foie provenant d'agneaux nourris avec les mêmes régimes a permis de mettre en évidence la plus grande efficacité d'utilisation des AA par les hépatocytes des agneaux nourris avec le régime N pour l'ensemble des voies métaboliques utilisant les AA. Une augmentation de l'activité des transporteurs d'AA est supposée. En revanche, avec le régime E, l'absence de différence avec T dans la synthèse protéique, la néoglucogenèse et l'oxydation semble signifier que des mécanismes de régulation externes (nutriments, hormones (insuline, glucagon)) sont probablement responsable de la baisse de synthèse des protéines exportées observée *in vivo*.

Ainsi, une réévaluation des apports recommandés en azote mériterait d'être réalisée chez les ruminants en croissance car nos résultats suggèrent que les recommandations semblent surestimer les besoins en azote des animaux. A l'inverse, les recommandations en terme d'apport énergétique ne devront pas être diminuées afin de ne pas pénaliser l'accrétion protéique des animaux.

Mots clés : Foie ; Agneau ; Isotopes stables ; Explants de foie ; Synthèse protéique ; Néoglucogenèse

Title: Nutritionnal regulation of hepatic metabolism of amino acids in growing ruminant: consequences on supply of nitrogenous nutrients to the muscle.

The management of production efficiency is an important issue in meat producing ruminants. An improvement of the feeding allowances (including the ratio between nitrogen and energy supply) could increase the efficiency of nitrogen utilisation by animals. The splanchnic bed (portal drained viscera + liver) is in competition with the muscle for nitrogen utilisation because it represents only 6 % of body protein but contributes to 35% of whole body protein synthesis.

The first aim of this thesis was to know the consequence of an imbalanced nitrogen (N) or energy (E) supply compared with a diet offering balanced supply necessary for growth (T) on the efficiency of amino acid (AA) utilisation by the splanchnic bed and the whole body of growing lambs. No (or small) alteration of nitrogen retention or growth was observed for the N fed animals compared with T, which led to an increased efficiency of nitrogen utilisation. On the contrary, lower nitrogen retention and growth were observed in E fed lambs. The second aim of this work was to determine which metabolic pathways were involved in the alterations of net hepatic AA removal. Labelled AA infusion in catheterised animals allowed the measurement of net fluxes of nutrients and irreversible loss rates of the labelled AA across the splanchnic bed (and hepatic export protein synthesis). In N fed lambs, the lower hepatic removal of AA was connected with a probable decreased hepatic catabolism of AA (except for branched chain AA) associated with a maintained protein synthesis, allowing an overall sparing of AA. On the opposite, in E fed lambs, an increased gluconeogenesis from AA and hepatic catabolism of AA (increased ureagenesis) could explain the lower nitrogen retention observed.

The last aim of this thesis was to highlight some regulatory factors that could explain the metabolic adaptations observed in the splanchnic area. An *ex vivo* study using liver slices taken from lambs fed the 3 experimental diets, showed a higher efficiency for AA utilisation in all metabolic pathways using AA in N fed lambs. This might be related to a higher AA transport activity. On the other hand, with E diet, no significant difference was observed for protein synthesis, gluconeogenesis and oxidation compared with T, which means that external regulatory mechanisms (such as nutrients, hormones (insulin, glucagon)) are probably involved in the decrased hepatic protein synthesis observed *in vivo*.

Thus, the nitrogen allowances should be re-evaluated for growing ruminants since our results suggest that INRA allowances overestimate the nitrogen requirements for lambs. On the opposite, energy allowances seem to fit well with the requirements and should not be reduced in order to maintain protein retention in animals.

Keywords : Liver ; Lambs ; Stables isotopes ; Liver slices ; Protein synthesis ; Gluconeogenesis.